

УДК 575.13:577.21

Ф. Д. Х. АЛ-ШАММАРИ, М. А. ТИТОК

**ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ БИОДЕГРАДАЦИИ ПРИРОДНЫХ
НАФТАЛИНУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

(Представлено академиком Н. А. Картелем)

Белорусский государственный университет, Минск

Поступило 06.10.2010

Введение. Транспозонная организация катаболитных оперонов, локализованных в составе конъюгативных плазмид, обуславливает их горизонтальный перенос между природными бактериальными популяциями, повышая адаптивные свойства содержащих их микроорганизмов [1]. Рекомбинационные события, а также факторы внешней среды и различное генетическое окружение могут приводить к изменению нуклеотидных последовательностей генов биodeградации, в результате чего образуются полиморфные локусы, а также появляются дублицированные гены [2]. Знание процессов и закономерностей, лежащих в основе преобразований систем биodeградации, способствует пониманию возможных путей их эволюции и создает предпосылки для их практического использования. В частности, целенаправленного создания эффективных экологически безопасных технологий очистки окружающей среды и микробиологического синтеза биотехнологически значимых соединений.

Цель работы – анализ нуклеотидных последовательностей генов *nahAc* и *nahG*, определяющих синтез ключевых ферментов деградации нафталина с широкой субстратной специфичностью (соответственно нафталин-1,2-диоксигеназы и салицилат-1-гидроксилазы) и особенностей их распространения среди природных нафталинутилизирующих бактерий, выделенных из загрязненных природных источников на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 102 штамма нафталинутилизирующих бактерий, выделенных из загрязненных нефтепродуктами почв на территории Беларуси (табл. 1).

Среда. Бактерии выращивали в минимальной среде M9 [3]. Источником углерода служил нафталин в концентрации 100 мкг/мл.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозилового метода [4].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в термоциклере Thermo Hybaid (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов TaKaRa Ex TaqTM (Япония) либо Taq полимеразы производства Fermentas (Литва). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 1 ед. полимеразы, 200 мкМ каждого праймера, 200 мкМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, буфер и в некоторых случаях 5 % диметилсульфоксида (Sigma, США).

Для амплификации генов большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы (*nahAc*) и салицилат-1-гидроксилазы (*nahG*) использовали, соответственно, олигонуклеотидные праймеры: Ac149f (5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3') и Ac1014r (5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3') [5]; shc1_up (5'-CGG CKT THG GTG ARG TCG GTG C-3') и shc1_lo (5'-GGC GAG GAA RTA GGC GTC CTC AAG 3') [6].

Для получения ампликонов генов гена *nahAc* размером 865 п. н. использовали режимы амплификации, предложенные в работе [5]. Для получения специфических продуктов ПЦР гена *nahG* размером 893 п. н. использовали модифицированный в ходе выполнения работы режим

Т а б л и ц а 1. Источники выделения природных нафталинутилизирующих бактерий

Штамм	Количество штаммов	Источник выделения
NL1–NL3, NL7–NL14, NL16–NL18, NL20, NL21, NL23, NL24, NL26–NL28, NL30, NL33, NL34, NL36–NL39, NL55–NL58, NL61, NL64, NL65–NL72, AL1–AL17 AL24–AL31 AL33–AL43	81	Выделены из 205 проб почвы на территории Минска (завод «Кристалл», АвтоВаз, тракторный завод, автомобильный завод, завод медпрепаратов, «Литмаш», станция аэрации, ж/д станции, автобусные станции, автобусные остановки, заправочные станции, автостоянки) и Минской области (ж/д станции, автобусные станции, автобусные остановки, заправочные станции, автостоянки).
NL40–NL46, NL52, NL54, AL23, AL32, AL44	12	Выделены из 29 проб почвы на территории Витебской области (доломитовый завод, нефтебаза г. Витебск, «Нафтан», «Полимир» г. Полоцк, нефтеперерабатывающий завод г. Новополоцк, автобусные остановки и автостоянки).
NL47–NL51, NL62, NL63	7	Выделены из 18 проб почвы на территории Брестской области (автобусные остановки, заправочные станции, автостоянки).
NL73	1	Выделен из 6 проб почвы на территории Гомельской области (предприятие «Центролит» г. Гомель)
NL59	1	Выделен из 14 проб, отобранных на территории Могилевской области (гидролизный завод г. Бобруйск)

амплификации: 94 °С – 5 мин (1 цикл); 94 °С – 30 сек, 64 °С – 30 сек, 72 °С – 1,5 мин (7 циклов); 94 °С – 30 сек, 68 °С – 30 сек, 72 °С – 1,5 мин (23 цикла), 72 °С – 10 мин (1 цикл).

Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью ферментов *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* в условиях, рекомендованных фирмой изготовителем (Fermentas, Литва). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали синтетический DNA Ladder Mix (Fermentas, Литва).

Электрофоретический анализ проводили согласно [6]. Гель фотографировали, используя систему документации ImageMaster VDS-CL (Amersham Biosciences, США).

Результаты и их обсуждение. Из различных загрязненных нефтепродуктами почв на территории Республики Беларусь были выделены бактерии, способные утилизировать нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии. В ходе выполнения данной работы осуществлен анализ нуклеотидных последовательностей генов *nahAc* и *nahG*. Для этого из клеток всех изолированных бактерий выделяли тотальную ДНК, которую вносили в качестве матрицы в полимеразную цепную реакцию с использованием праймеров, обеспечивающих амплификацию детерминант *nahAc* и *nahG*. Полученные специфические продукты амплификации подвергали рестрикции мелкощепящими рестриктазами *HaeIII*, *MspI* и *RsaI*.

Для изучения последовательностей ДНК генов *nahAc*, кодирующих синтез большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы, проводили рестрикцию продуктов амплификации размером 865 п. н. ферментом *HaeIII*. Подобного рода исследования, проведенные для нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Средиземноморья и различных регионов России, позволили выявить три типа последовательностей гена *nahAc*: AN10, C18 и A88 [5]. Следует отметить, что выявленный полиморфизм генов *nahAc* не оказывает значительного влияния на аминокислотный состав детерминируемых ими белков (различия в аминокислотных последовательностях не превышали 8 %). Тем не менее, имеющиеся различия могут свидетельствовать о дивергенции данных генетических детерминант, обусловленной влиянием факторов внешней среды и определенного генетического окружения.

Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси, с использованием эндонуклеазы *HaeIII* позволил обнаружить все известные типы данной детерминанты, а именно AN10, A88 и C18 (рис. 1, а). Исключение составил штамм NL16, для которого не было получено продукта амплификации гена *nahAc*, что может быть обусловлено отсутствием достаточной гомологии между концевыми участками исследованной детерминанты с последовательностью использованных праймеров.

Обработка продуктов амплификации генов *nahAc* рестриктазой *MspI* показала, что тип C18 представляет собой гетерогенную группу, которую можно разделить на три подтипа: C18_V1, C18_V2 и C18_V3. На рис. 1, б представлены рестрикционные профили генов *nahAc* для штаммов NL4 (C18_V1), NL36 и AL22 (C18_V2) и NL26 (C18_V3). Следует отметить, что нуклеотидная последовательность подтипа C18_V1 гена *nahAc* входит в состав Nah-плазмид рDTG1 бактерий *P. putida* NCIB 9816-4 (AF491307), рND6-1 – бактерий *P. species* ND6 (AY208917) и рFKY4 – бактерий *P. putida* KTSK2 (AB257758). В то же время ген *nahAc* наиболее изученной плазмиды биодеградации нафталина NAN7 бактерий *P. putida* G7 (AB237655) имеет последовательность подтипа C18_V2.

Различий в последовательностях генов *nahAc* типов A88 и AN10 с использованием рестриктаз *MspI* и *RsaI* выявлено не было. Анализ полученных данных позволил установить, что среди нафталинутилизирующих бактерий, выделенных на территории Беларуси, преобладают гены *nahAc* типа C18_V1 (37 штаммов) и A88 (35 штаммов), реже встречаются типы C18_V2 (19 штаммов) и AN10 (9 штаммов), а тип C18_V3 выявлен только для двух проанализированных штаммов (табл. 2).

Рестрикционный анализ продуктов амплификации гена *nahG*, детерминирующего синтез салицилат-1-гидроксилазы, проводился с использованием рестриктаз *MspI* и *RsaI*. Подобного рода исследования, проведенные ранее, позволили описать 6 типов детерминант *nahG*: NAN7, A88, рDTG1, AN10, KF715 и NKNS3, обеспечивающих синтез белков, аминокислотные последовательности которых характеризуются высокой степенью гомологии (более 70 %) [6].

С использованием праймеров *shc1_up* и *shc1_lo* были получены специфические продукты амплификации размером 893 п. н. для 101 штамма (исключение составил штамм NL57). Сравнительный анализ полученных рестрикционных фрагментов с описанными позволил отнести исследованные детерминанты к четырем известным типам *nahG*-гена: NAN7, AN10, рDTG1 и KF715 (на рис. 2 показано, соответственно, для штаммов AL20, AL11,

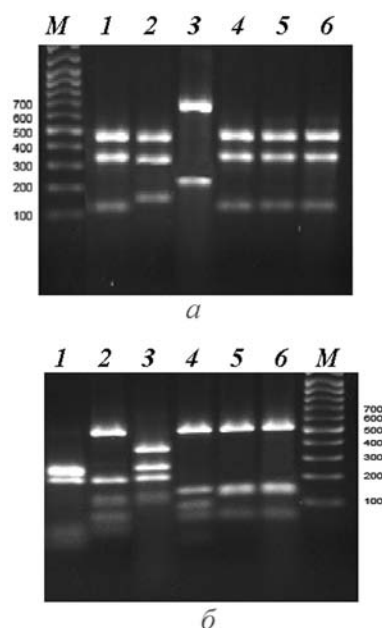


Рис. 1. Рестрикционный анализ продуктов амплификации *nahAc*-гена. Продукты амплификации, обработанные рестриктазами *HaeIII* (а) и *MspI* (б), получены с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК штаммов: 1 – NL4 (тип C18_V1), 2 – NL8 (тип A88), 3 – NL23 (тип AN10), 4 – NL26 (тип C18_V3), 5 – NL36 (тип C18_V2), 6 – AL22 (тип C18_V2). Дорожка М соответствует реперу DNA Ladder Mix

Т а б л и ц а 2. Сочетания *nah*-генов у природных нафталинутилизирующих бактерий

Тип <i>nahAc</i> -гена	Тип <i>nahG</i> -гена	Штаммы с данным сочетанием <i>nah</i> -генов	Всего штаммов
AN10	AN10	NL1, AL11	2
	KF715	NL23, NL30, NL62, AL37, AL38, AL39, AL40	7
A88	A88-NAN7	NL7, NL8, NL9, NL10, NL11, NL12, NL13, NL17, NL18, NL20, NL24, NL27, NL34, NL39, NL40, NL41, NL42, NL44, NL45, NL46, NL47, NL48, NL50, NL51, NL54, NL56, NL57*, NL58, NL59, NL61, NL63, NL64, NL65, NL70, NL71	35
C18_V1	рDTG1	NL2, NL3, NL14, NL16**, NL21, NL28, NL33, NL37, NL43, NL49, NL52, NL66, NL67, NL68, NL69, NL72, NL73, AL1, AL2, AL3, AL5, AL6, AL7, AL8, AL9, AL12, AL21, AL23, AL24, AL25, AL26, AL29, AL32, AL33, AL36, AL42, AL43	37
C18_V2	NAN7	NL36, NL38, AL4, AL13, AL14, AL15, AL16, AL17, AL19, AL20, AL22, AL27, AL28, AL30, AL31, AL34, AL35, AL41, AL44	19
C18_V3	NL26	NL26, AL10	2

П р и м е ч а н и е: * – для штамма NL57 не было получено продукта амплификации гена *nahG*; ** – для штамма NL16 не было получено продукта амплификации гена *nahAc*.

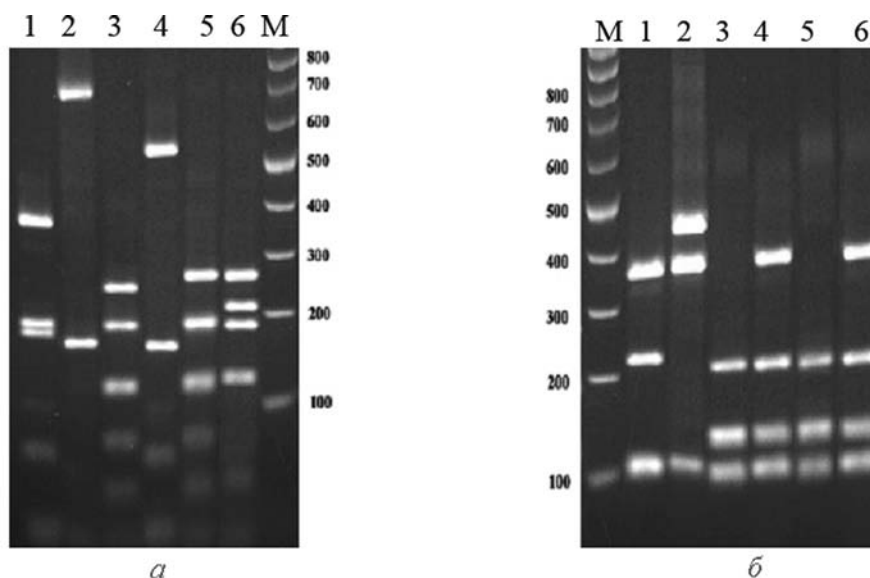


Рис. 2. Рестрикционный анализ продуктов амплификации *nahG*-гена. Продукты амплификации, обработанные рестриктазами *MspI* (а) и *RsaI* (б), получены с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК штаммов: 1 – AL2 (тип рDTG1), 2 – NL26 (тип NL26), 3 – AL11 (тип AN10), 4 – AL20 (тип NАН7), 5 – AL39 (тип KF715), 6 – NL8 (тип А88-NAН7). Дорожка М соответствует реперу DNA Ladder Mix

AL2 и AL39). Картина рестрикции гена *nahG* большого числа штаммов (35 штаммов) соответствовала типу А88 в случае рестриктазы *MspI* (рис. 2, а, дорожка б) и типу NАН7 в случае рестриктазы *RsaI* (рис. 2, б, дорожка б) (обозначен как тип А88-NAН7). Для двух штаммов AL10 и NL26 рестрикционные профили продуктов амплификации *nahG*-гена отличались от всех ранее описанных типов (обозначен как тип NL26) (рис. 2). Таким образом, наиболее распространенными типами *nahG*-гена среди нафталинутилизирующих бактерий белорусской коллекции являются типы рDTG1 (37 штаммов), А88-NAН7 (35 штаммов) и NАН7 (19 штаммов). Реже встречались типы KF715 (7 штаммов), AN10 (2 штамма) и NL26 (2 штамма) (табл. 2).

Анализ полученных результатов позволил установить, что различные типы генов *nahAc* и *nahG* встречаются в определенных сочетаниях. В частности, типы А88, C18_V1, C18_V2 и C18_V3 гена *nahAc* совместно наследуются с типами А88-NAН7, рDTG1, NАН7 и NL26 гена *nahG* соответственно. Исключение составляет тип AN10 гена *nahAc*, сочетающийся с двумя близкородственными последовательностями *nahG*-гена типа AN10 и KF715 [6] (табл. 2). Несмотря на высокую консервативность аминокислотных последовательностей ключевых ферментов метаболизма нафталина NahAc и NahG, наличие нуклеотидных замен в детерминируемых их генах свидетельствует о происходящих в природе процессах дивергенции. Сопряженный характер наследования определенных типов генетических детерминант может быть обусловлен рекомбинационными перестройками, приводящими к локализации в одном репликоне адаптированных относительно друг друга нуклеотидных последовательностей, обеспечивающих оптимальный уровень ферментативной активности. Выявленные закономерности не противоречат данным, полученным другими авторами. Анализ известных нуклеотидных последовательностей генов *nahAc* и *nahG* (данные GenBank) свидетельствует об определенных сочетаниях данных детерминант, входящих в состав одного репликона. Например, данные гены в комбинации C18_V1/рDTG1 входят в состав плазмид рDTG1 (AF491307), рND6-1 (AY208917), C18_V2/NAН7 – плазмиды NAН7 (AB237655), сочетание AN10/AN10 характерно для хромосомы *P. stutzeri* AN10 (AF039534), А88/А88 – для хромосомы *P. fluorescens* А88 (AY433938). Данные, полученные для бактерий *P. fluorescens*, большинство из которых содержат Nah-плазмиды, свидетельствуют о том, что ген *nahAc* типа AN10 встречается с типами AN10, KF715 и NKNS гена *nahG*, но не с типами рDTG1 и NAН7, для которых характерно совместное наследование с геном *nahAc* типа C18 [6]. Таким образом, наличие определенных закономерностей в сочетаниях генов, детерминирующих утилизацию нафталина, может свидетельствовать о сопряженном характере их изменений в ходе дивергенции.

Тем не менее, гены *nahAc* и *nahG*, входящие в состав двух *nah*-оперонов, в целом характеризуются высокой степенью консервативности. Одиночные замены нуклеотидов, присутствующие в данных локусах, не приводят к смене функций. Определенные комбинации данных детерминант в составе одного репликона могут лишь свидетельствовать о сопряженном характере их изменений и являться результатом ограниченного числа рекомбинационных перестроек. Эволюционные преобразования систем биодegradации, скорее всего, могут быть связаны с возникновением дубликаций определенных *nah*-генов с последующей их дивергенцией. В пользу этого свидетельствуют данные о присутствии дополнительных генов, сходных с *nah*-детерминантами в составе плазмидных [2] и хромосомных геномов [8].

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б08Р-102) и задания 1.08 ГНТП «Новые биотехнологии».

Авторы выражают благодарность фирме «Праймтех» за любезно предоставленные реактивы.

Литература

1. Sayler G. S., Hooper S. W., Layton A. C., Henry King J. M. // Microbiol. Ecol. 1990. Vol. 19, N 1. P. 1–20.
2. Li W., Shi J., Wang X. et al. // Gene. 2004. Vol. 336, N 2. P. 231–240.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. – 436 с.
4. Teriele H., Michel B., Ehrlich S. D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 8, N 8. P. 2541–2545.
5. Ferrero M., Lobet-Brossa E., Lalucat L. et al. // Appl. Environm. Microbiol. 2002. Vol. 68, N 2. P. 957–962.
6. Измалкова Т. Ю., Сазонова О. И., Соколов С. Л. и др. // Микробиология. 2005. Т. 74, № 1. С. 60–68.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование М., 1984. – 479 с.
8. Bosch R., Moore E. R., Garcia-Valdes E., Pieper D. H. // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181, N 8. P. 2315–2322.

AL-SHAMMARY F. J., TITOK M. A.

titok@bsu.by

ORGANISATION PROPERTIES OF DEGRADATION GENES OF NATURALLY NAPHTHALENE-UTILIZING BACTERIA

Summary

We performed the analysis of genetic determinants *nahAc* and *nahG*, coding for key enzymes in naphthalene catabolism (large subunit of naphthalene-1,2-dioxygenase and salicylate-1-hydrolase, respectively) using 102 strains of naturally occurring naphthalene-utilizing bacteria isolated from oil-derivative contaminated soils in Belarus. Apart from the previously known nucleotide sequences (types AN10, C18 and A88 of the gene *nahAc* and types NAH7, AN10, pDTG1, KF715 of *nahG*), for the first time the polymorphism inside C18-type of the gene *nahAc* was shown (designated as C18_V1, C18_V2 and C18_V3), and a new, not described before, sequence of *nahG* was identified (designated as NL26). For 35 strains we had shown that the restriction profile of the type of *nahG* bore a resemblance with type A88 in the case of restrictase MspI and with type NAH7 in the case of restrictase RsaI (designated as A88-NAH7). The data obtained let us suggest that genes *nahAc* and *nahG* occur in unique matches (the exception is type AN10 of *nahAc*, which is found in combination with two types of *nahG*), so we can speculate about correlated changes of DNA sequences of given determinants.