

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ НАФТАЛИНУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

М.И. Чернявская

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: mm-cher@tut.by

Введение

Актинобактерии рода *Rhodococcus* представляют собой разнородную группу микроорганизмов, обнаруживаемых во многих экологических нишах (почва, морская вода, патогены растений и животных). Большие размеры генома родококков, разнообразные катаболические пути, способность поглощать и метаболизировать гидрофобные субстраты, формировать биопленки обеспечивает их широкое использование для биотрансформации и биodeградации многих органических соединений [1-2]. Особый интерес представляет способность родококков деградировать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), поскольку для данного класса соединений установлено канцерогенное действие. Попадание ПАУ в экосистемы связано с разливами нефти, продуктами неполного сгорания топлива, отходами химического производства. Нафталин представляет собой модельный объект для изучения путей деградации ПАУ, поскольку известно, что нафталиндиоксигеназы (ключевые ферменты катаболизма нафталина) участвуют в окислении многих моно- и полициклических ароматических углеводородов [3].

Наилучшим образом изучена генетическая организация путей катаболизма нафталина у бактерий рода *Pseudomonas*. У них гены утилизации нафталина чаще всего локализованы на плаزمиде IncP-7 и IncP-9 групп [4-5]. Организация кластера генов катаболизма нафталина бактерий рода *Rhodococcus* принципиально отличается от таковой псевдомонад [3]. Способность бактерий рода *Rhodococcus* утилизировать нафталин может определяться генами, имеющими как хромосомную (*Rhodococcus* sp. P200), так и внехромосомную (*Rhodococcus* sp. NCIMB12038, *R. opacus* B4 и др.) локализацию [6-7]. Гены, кодирующие α - и β -субъединицы нафталиндиоксигеназы (*narAa* и *narAb*) и цис-нафталиндигидродиолдегидрогеназу (*narB*), входят в состав одного оперона и транскрибируются как одна единица при индукции нафталином [6, 8]. Помимо этих трех генов в состав нафталинового кластера входят гены рубредоксина (один или два) и два гена транскрипционных регуляторов. У бактерий, способных утилизировать о-ксилол, обнаружен дополнительный ген (*nidF*), продукт которого взаимодействует с нафталиндиоксигеназой и рубредоксином [9]. Нафталинутилизирующие бактерии принадлежат к виду *R. opacus* либо не идентифицированы до вида [6-13].

Целью данной работы был сравнительный анализ нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus*, выделенных из различных природных источников, а также определение локализации путей катаболизма нафталина.

Методы исследования

Объектами исследования являлись 6 штаммов бактерий *R. pyridinivorans*, выделенных из различных источников (почва, отобранная на территории Беларуси – штамм AL18, Ливии – штаммы 5Ar (L5A-BSU), 7A-3A-2, 8A-3A, 15-4A, Антарктиды - A31-2d) и 1 штамм *R. opacus* (GP1), выделенный с территории Беларуси.

Культивирование бактерий и изучение их способности утилизировать различные углеводороды осуществляли на агаризованной минеральной среде M9 [14]. Исследуемые углеводороды после стерилизации вносили непосредственно в среду (антрацен, фенантрен, бифенил, пирен – 0,02%; фенол – 0,1%) или в виде паров (гексан, нонан, нафталин, толуол, ксилолы, бензол, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, гексадекан).

Стабильность наследования признака утилизации нафталина при культивировании в неселективных условиях изучали с использованием полноценной пептонно-дрожжевой среды ПДБ и ПДА (г/л: пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 9, для плотной среды ПДА агар - 15) в течение 80 генераций. Бактерии культивировали в полноценной жидкой среде при температуре 28°C (штамм *R. opacus* GP1) или 37°C (штаммы *R. pyridinivorans* AL18, 5Ap (L5A-BSU), 7A-3A-2, 8A-3A, 15-4A). Общий титр клеток определяли при высеве на плотную полноценную среду, а титр клеток, способных утилизировать нафталин - при высеве на среду M9 с нафталином в качестве единственного источника углерода.

Отбор Nah⁻-вариантов (не способных утилизировать нафталин) после 80 генераций осуществляли с полноценной питательной среды.

Обработку бромистым этидием (2–10 мкг/мл) проводили в жидкой питательной среде LB [14].

Выделение тотальной ДНК осуществляли саркозиловым методом [15].

Для анализа генов катаболизма нафталина (*narAa*, *narAb*, *narB*) использовали праймеры, описанные в работе [11], и реактивы производства “Thermoscientific” (ЕС). Реакционная смесь содержала 1x буфер для Taq- или Pfu-полимеразы, 1,5 ммоль/л Mg²⁺, смесь дНТФ (0,2 ммоль/л каждого нуклеотида), 0,25 мкмоль/л каждого праймера из соответствующей пары, 1 ед. Taq-полимеразы или 1,25 ед. Pfu-полимеразы, 100 нг матричной ДНК. ПЦР проводили с использованием следующих режимов: 94°C – 5 мин; 94°C – 1 мин, 52°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин.

Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле согласно методике, приведенной в руководстве [16].

Для секвенирования продукты амплификации элюировали из геля с помощью набора DNA Extraction Kit производства “Thermoscientific” (ЕС), а затем клонировали в составе вектора pK18mob [17]. Для этого векторную ДНК линейаризовали с помощью рестриктазы SmaI, “Thermoscientific” (ЕС), используя буферы и режимы, рекомендованные производителем.

Лигирование векторных молекул с очищенными продуктами амплификации осуществляли с помощью T4 ДНК-лигазы, “Thermoscientific” (ЕС), придерживаясь рекомендаций фирмы-изготовителя.

Трансформацию бактерий *E. coli* XL1-Blue [18] и *E. coli* BW19851 [19] осуществляли с использованием кальциевого метода, приведенного в работе [16]. Для отбора трансформантов *E. coli* XL1-Blue использовали плотную полноценную среду LB с добавлением канамицина (50 мкг/мл), IPTG (1 ммоль/л) и X-Gal (50 мкг/мл); трансформантов *E. coli* BW19851 - LB с добавлением канамицина (50 мкг/мл).

Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit производства “Thermoscientific” (ЕС).

Для постановки секвенирующей реакции использовали набор DNA Cycle Sequencing Kit (для секвенирования по Сэнгеру) производства “Jena Bioscience” (Германия) и праймеры с флюоресцентной меткой M13 Forward IRDye 800 и M13 Reverse IRDye 700, “Li-COR” (США). Разделение продуктов секвенирующей реакции осуществляли с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer, “Li-COR” (США). Полученные результаты анализировали, используя программы eSeq Version 3.1, BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), MEGA4.

Для того чтобы пометить плазмиду катаболизма нафталина, осуществляли направленный инсерционный мутагенез с использованием суицидального вектора pK18mob (не поддерживается в клетках бактерий рода *Rhodococcus*), несущего фрагмент гена *narAa*. Вектор вносили в клетки бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU) Rif^r (получены в результате спонтанного мутагенеза) путем конъюгации. За основу была взята методика, описанная у Geize и соавторов [20]. В качестве донора использовали мобилизующий штамм *E. coli* BW19851, трансформированный вышеупомянутым суицидальным вектором

(pK18mob+narAa). Реципиентные бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU) Rif^r выращивали в течение 5 суток на плотной среде с рифампицином (100 мкг/мл) при 28°C. Донорные бактерии *E. coli* BW19851/pK18mob+narAa в течение суток культивировали на среде ПДА с канамицином (50 мкг/мл) при температуре 37°C, а затем в течение суток доращивали при комнатной температуре. Одну колонию клеток донора и одну колонию клеток реципиента ресуспендировали отдельно в 1 мл физиологического раствора. Смешивали суспензии клеток донора и реципиента (по 750 мкл) и осаждали центрифугированием (6500 об/мин, 5 мин). Осадок клеток ресуспендировали в 750 мкл физиологического раствора, аликвоты (250 мкл) высевали на плотную питательную среду ПДА и инкубировали в течение 24 ч при 28°C. Биомассу смывали 2 мл физиологического раствора, готовили разведения и высевали на селективные среды. Для учета количества жизнеспособных клеток донора использовали ПДА с канамицином (50 мкг/мл), реципиента - ПДА с рифампицином (100 мкг/мл) и трансконъюгантов - ПДА с рифампицином (100 мкг/мл) и канамицином (25 мкг/мл). Культивирование осуществляли при 28°C до появления хорошо различимых колоний. Полученные мутантные клоны проверяли на способность к росту на среде M9 с нафталином в качестве единственного источника углерода.

ПЦР-анализ результатов инсерционного мутагенеза осуществляли с использованием пары праймеров M13 Forward и NarAa Forward [11] и режимов: 94°C – 5 мин; 94°C – 30 с, 48°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (5 циклов); 94°C – 30 с, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (25 циклов); 72°C – 10 мин.

Конъюгационный перенос плазмиды биодegradации нафталина у бактерий *R. pyridinivorans* наблюдали в гомологичной системе. Для этого получали (путем спонтанного мутагенеза) устойчивые к рифампицину (100 мкг/мл) плазмидосодержащие доноры и устойчивые к стрептомицину (200 мкг/мл) бесплазмидные реципиенты. Донорные и реципиентные бактерии выращивали в течение 5 суток на плотной среде с соответствующим антибиотиком. Скрещивание осуществляли по схеме, описанной выше. Для учета количества жизнеспособных клеток донора использовали ПДА с рифампицином 100 мкг/мл, реципиента - ПДА со стрептомицином 200 мкг/мл и трансконъюгантов - M9 со стрептомицином 200 мкг/мл и нафталином в качестве единственного источника углерода (или ПДА со стрептомицином 200 мкг/мл и канамицином 25 мкг/мл при использовании доноров с меченой канамициновым маркером плазмидой). Культивирование осуществляли при 28°C до появления хорошо различимых колоний.

Результаты и обсуждение

Изучаемые бактерии рода *Rhodococcus* характеризовались широким спектром утилизируемых субстратов, среди которых были алифатические углеводороды, моноциклические и полициклические (ПАУ) ароматические углеводороды (таблица 1). Как и большинство описанных в литературе *R. pyridinivorans*, изучаемые штаммы были способны утилизировать пиридин, бензол, этилбензол, толуол, ксилолы [21–22]. Наиболее широким спектром утилизируемых субстратов обладал штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU). Он единственный среди штаммов *R. pyridinivorans* был способен утилизировать 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, а также наряду со штаммами AL18 и 8A-3A был способен к росту с использованием трех видов ксилолов (о-, п-, м-ксилол).

Все изученные штаммы *R. pyridinivorans*, а также *R. opacus* GP1 характеризовались способностью к росту на среде с фенолом (таблица 1), который является опасным поллютантом, образующимся в результате деятельности нефтеперерабатывающей, металлургической промышленности, при производстве пластмасс, резины, пестицидов и др. [23–24].

Balázs Kriszt и соавторы при секвенировании генома *R. pyridinivorans* AK37 обнаружили гены ключевых ферментов деградации бифенила [25]. Способностью утилизировать бифенил характеризовались все штаммы *R. pyridinivorans*.

Нафталин, фенантрен, антрацен и пирен, относящиеся к ПАУ, также служили субстратом для штаммов *R. pyridinivorans*. Штамм *R. opacus* GP1 не утилизировал пирен. Способность утилизировать нафталин описана для многих штаммов вида *R. opacus* [7, 12-13], тогда как среди *R. pyridinivorans* в опубликованных работах не отмечается деструкторов данного ПАУ. В связи с этим определенный интерес представлял сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов деградации нафталина исследуемых бактерий с уже известными, а также определение их локализации.

Таблица 1 – Спектр углеводов, утилизируемых бактериями рода *Rhodococcus*

Углеводородные субстраты	Штаммы															
	гексан	нонан	2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан	гексадекан	фенол	бензол	этилбензол	толуол	о-ксилил	м-ксилол	п-ксилол	нафталин	антрацен	фенантрен	бифенил	пирен
<i>R. opacus</i> GP1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>R. pyridinivorans</i> AL18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 7A-3A-2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 8A-3A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 15-4A	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> A31-2d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Известно, что гены катаболизма нафталина у бактерий рода *Rhodococcus* могут иметь хромосомную или плазмидную локализацию [6]. К настоящему времени известны плазмиды биodeградации нафталина pROB02 (AP011117.1), pWK301 (AB110633.1), pPDG4 (CP008951.1) бактерий вида *R. opacus*. У бактерий вида *R. pyridinivorans* были обнаружены линейные мегаплазмиды (имеется полная последовательность генома штамма *R. pyridinivorans* SB3094, CP006996.1), однако они не содержат генов биodeградации нафталина. Для того чтобы установить локализацию генов утилизации нафталина, исследуемые штаммы культивировали в течение 80 генераций в неселективных условиях (полноценная среда ПДА).

У бактерий *R. opacus* GP1 признак утилизации нафталина наследовался стабильно. При их культивировании с бромистым этидием (до 10 мкг/мл) элиминанты также не были получены. Штаммы, относящиеся к виду *R. pyridinivorans*, утрачивали способность утилизировать нафталин после 80 генераций в неселективных условиях с различной частотой (от 32 до 71%). Потеря способности утилизировать нафталин частью популяции при длительном культивировании в неселективных условиях может быть результатом двух процессов: 1) отсутствие экспрессии генов, 2) полная утрата генов катаболизма нафталина вследствие их внехромосомной локализации.

Для всех штаммов *R. pyridinivorans* были получены Nah⁻-варианты (производные штаммы не способные утилизировать нафталин). Был проведен анализ спектра утилизируемых ими углеводов по сравнению с исходными Nah⁺-вариантами. Как видно из таблицы 2, Nah⁻-варианты утрачивали способность расти на среде с фенантеном в

качестве источника углерода и энергии, что подтверждает известный факт об общности путей утилизации нафталина и фенантрена [3]. В то же время они сохраняли способность расти на среде с антраценом, о-ксилолом, толуолом и гексадеканом. Maruyama и соавторы [9] связывают способность бактерий рода *Rhodococcus* утилизировать о-ксилол с функционированием нафталиндиоксигеназы в комплексе в продуктом гена *nidF*. Однако совершенно очевидно, что в клетках бактерий *R. pyridinivorans* существует альтернативный путь деградации этого соединения, независимый от генов катаболизма нафталина.

Таблица 2 – Спектр утилизируемых углеводов

Штаммы		Источник углерода					
		нафталин	фенантрен	антрацен	о-ксилол	толуол	гекса-декан
<i>R. pyridinivorans</i> AL18	Nah ⁺	+	+	+	+	+	+
	Nah ⁻	-	-	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (L5A-BSU)	Nah ⁺	+	+	+	+	+	+
	Nah ⁻	-	-	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 7A-3A-2	Nah ⁺	+	+	+	+	+	+
	Nah ⁻	-	-	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 8A-3A	Nah ⁺	+	+	+	+	+	+
	Nah ⁻	-	-	+	+	+	+
<i>R. pyridinivorans</i> 15-4A	Nah ⁺	+	+	+	+	+	+
	Nah ⁻	-	-	+	+	+	+

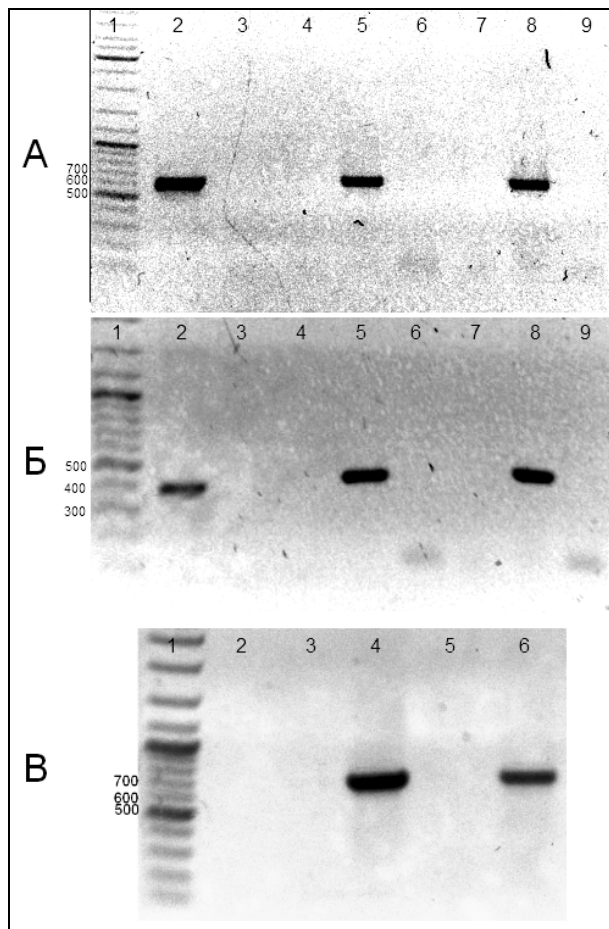
Для доказательства утраты генов *nar*, отвечающих за утилизацию нафталина, был проведен ПЦР-анализ неспособных утилизировать нафталин (Nah⁻) вариантов штаммов *R. pyridinivorans*. При использовании в качестве матрицы ДНК Nah⁻-штаммов *R. pyridinivorans* специфических продуктов амплификации генов *narAa*, *narAb* и *narB* получено не было, как видно из рисунка 1, что может свидетельствует об их утрате, вероятнее всего, вследствие их внехромосомной локализации.

Полученный фрагмент гена *narAa* бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU) был клонирован и секвенирован в составе вектора pK18mob. Наибольшая степень сходства (99%) была выявлена с соответствующими генами нафталинутилизующих бактерий *Rhodococcus* sp. DB11 (GQ503239.1) и *Rhodococcus* sp. I24 (AF121905.1). Следует отметить, что эти бактерии не являются близкими к виду *R. pyridinivorans* в филогенетическом отношении [10]. Кроме того, в базе данных ГенБанк (GenBank NCBI) не обнаружено депонированных последовательностей генов катаболизма нафталина бактерий вида *R. pyridinivorans*.

В результате направленного инсерционного мутагенеза был инактивирован ген *narAa* в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU), одновременно предполагаемая плаزمиды была помечена маркером канамицинрезистентности. Полученные клоны были устойчивы к рифампицину и канамицину, а при добавлении в среду M9 нафталина в качестве единственного источника углерода рост в течение 7 суток культивирования не наблюдался (исходный штамм формировал колонии на среде с нафталином в течение 3–4 суток). Помимо этого наличие целевой вставки детектировали с использованием ПЦР с праймерами M13 Forward (гибридуется с ДНК вектора pK18mob) и NarAa Forward [11] (гибридуется с участком гена *narAa*). При использовании в качестве матрицы ДНК исходного штамма продуктов амплификации не наблюдалось, тогда как при использовании ДНК мутантного штамма был получен ПЦР-продукт ожидаемого размера (около 650 п.н.).

При скрещивании бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU), несущих плазмиду катаболизма нафталина (исходную и меченую канамициновым маркером), с бесплазмидным штаммом *R. pyridinivorans* 5Ap-6 Nah⁻ Sm^r было показано, что путь катаболизма нафталина локализован на конъюгативной плазмиде. Частота ее переноса в гомологичной системе без оптимизации условий составляла $(2,16 \pm 0,34) \times 10^{-6}$ относительно количества клеток донора.

Меченая канамициновым маркером плазида передавалась с частотой того же порядка - $(3,65 \pm 0,06) \times 10^{-6}$.



Рисисунок 1 - Электрофореграмма продуктов амплификации генов *narAa* (А), *narAb* (Б), *narB* (В). Продукты амплификации получены с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из штаммов, способных утилизировать нафталин (Nah^+):

A2, Б2, В4 – *R. pyridinivorans* 15-4А; А5, Б5, В6 – *R. pyridinivorans* AL18;

А8, Б8 – *R. pyridinivorans* 8А-3А;

не способных утилизировать нафталин (Nah^-): А3, Б3, В2 – *R. pyridinivorans* 15-4А-1;

А4, Б4, В3 – *R. pyridinivorans* 15-4А-2; А6, Б6, В5 – *R. pyridinivorans* AL18-2;

А7, Б7 – *R. pyridinivorans* AL18-3; А9, Б9 – *R. pyridinivorans* 8А-3А-6;

А1, Б1, В1 – маркер GeneRuler DNA Ladder Mix, “Thermoscientific” (ЕС).

Выводы

Таким образом, впервые были обнаружены нафталинутилизирующие штаммы, принадлежащие к виду *R. pyridinivorans*, выделенные из различных источников. С помощью молекулярно-генетических, микробиологических и генетических методов определена локализация кластера катаболизма нафталина на конъюгативной плазмиде, частота передачи которой в гомологичной системе составляет порядка 10^{-6} относительно количества клеток донора. Клетки, утратившие данную плазмиду, помимо нафталина не утилизировали фенантрен. У бактерий *R. opacus* GP1 способность деградировать нафталин наследовалась стабильно, что может свидетельствовать о локализации связанных с этим процессом генов в составе хромосомы. Изученные бактерии рода *Rhodococcus* представляют интерес в качестве перспективных деструкторов ксенобиотиков, в частности ПАУ, фенолов и пиридина.

Список литературы

1. Applied aspects of *Rhodococcus* genetics / M.J.Larkin [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. - 1998. - № 74. - P. 133–153.

2. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martinkova [et al.] // Environmental International. - 2009. - № 35. - P. 162–177.
3. Habe, H. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria / H. Habe, T. Omori // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. - 2003. - Vol. 67, № 2. - P. 225–243.
4. Molecular classification of IncP-9 naphthalene degradation plasmids / T. Yu. Izmalkova [et al.] // Plasmid. - 2006. - Vol. 56, I. 1. - P. 1–10.
5. The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5 / T. Yu. Izmalkova [et al.] // Research in Microbiology. - 2013. - Vol. 164, I. 3. - P. 244–253.
6. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene / L. A. Kulakov [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. - 2005. - Vol. 71, № 4. - P. 1754–1764.
7. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains / K. Na [et al.] // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2005. - Vol. 99, I. 4. - P. 378–382.
8. Larkin, M. J. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility / M. J. Larkin, L. A. Kulakov, Ch. C. R. Allen // Current Opinion in Biotechnology. - 2005. - № 16. - P. 282–290.
9. Isolation and characterization of *o*-xylene oxygenase genes from *Rhodococcus opacus* TKN14 / T. Maruyama [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. - 2005. - Vol. 71, I. 12. - P. 7705–7715.
10. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia / L. N. Anan'ina [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. - 2011. - Vol. 100. - P. 309–316.
11. Detection of genes for alkane catabolism in *Rhodococcus sp.* strain 1BN / V. Andreoni [et al.] // Environmental Microbiology. - 2000. - Vol. 2, № 5. - P. 572–577.
12. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and *o*-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil / P. Di Gienarro // Research in Microbiology. - 2001. - Vol. 152, I. 7. - P. 641–651.
13. Uz, I. Characterization of naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213 / I. Uz, Y. P. Duam, A. Ogram // FEMS Microbiology Letters. - 2000. - Vol. 185, I. 2. - P. 213–238.
14. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. / Дж. Миллер. - М.: Мир, 1976. - 436 с.
15. te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. - 1986. - Vol. 83, № 8. - P. 2541–2545.
16. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis - 2nd ed. - NY: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Publications, 1989. - 468 p.
17. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* / A. Schgfer [et al.] // Gene. - 1994. - Vol. 145. - P. 69–73.
18. Bullock, W. O. XL1-Blue: high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection / W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short // Biotechniques. - 1987. - Vol. 5. - P. 376–378.
19. Metcalf, W. W. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers / W. W. Metcalf, W. Jiang, B. L. Wanner // Gene. - 1994. - Vol. 138. - P. 1–7.
20. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker / R. van der Geize [et al.] // FEMS Microbiology Letters. - 2001. - Vol. 205. - P. 197–202.

21. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium / J.-H. Yoon [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 2000. - Vol. 50. - P. 2173–2180.

22. A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain [Electronic resource] / R. Kriszt [et al.] // PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7, I. 9. - Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043608>. - Date of access: 16.01.2016.

23. Phenol degrading ability of *Rhodococcus pyridinivorans* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from activated sludge plants in South Africa / S. Kumari [et al.] // Journal of Environmental Science and Health. - 2013. - Vol. 13, Part A. - P. 947–953.

24. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol / J. Q. Sun [et al.] // Journal of Hazardous Materials. - 2011. - Vol. 191. - P. 62–68.

25. *De novo* genome project for the aromatic degrader *Rhodococcus pyridinivorans* strain AK37 / B. Kriszt [et al.] // Journal of Bacteriology. - 2012. - Vol. 194, № 5. - P. 1247–1248.

CHARACTERIZATION OF STRAINS OF NAPHTHALENE-UTILIZING BACTERIA BELONGING TO *RHODOCOCCUS* GENERA

M.I. Charniauskaya

Belarusian State University, Minsk, The Republic of Belarus

e-mail: mm-cher@tut.by

Seven naphthalene-utilizing *Rhodococcus* strains with broad substrate specificity were investigated. They can degrade different xenobiotics such as aliphatic and aromatic (including polycyclic) hydrocarbons, phenol and pyridine. It is the first data about naphthalene-degrading strains belonging to species *R. pyridinivorans*. The catabolic pathway of this PAH is located on a conjugative plasmid in *R. pyridinivorans* strains. *R. opacus* strain GP1 did not lose the ability of naphthalene utilization both under nonselective condition and after ethidium bromide treatment. This fact can indicate the chromosomal location of naphthalene catabolic cluster in this strain.