

Изучение ростовых характеристик штаммов рода *Delftia*, содержащих последовательность гена салицилат 5-гидроксилазы и нафталин-1,2-диоксигеназы

Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Соколов С.Л.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН);
sazonova_oi@rambler.ru

В работе исследовали три штамма рода *Delftia* (ULwDis2, ULwDis3, ULwNAH1), способных к катаболизму полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Данные бактериальные штаммы были изолированы методом накопительных культур из проб морской воды Финского залива Балтийского моря, отобранных в летний период у порта Усть-Луга [1]. Два штамма – ULwDis2 и ULwDis3 – были выделены на дизельном топливе в качестве единственного источника углерода и энергии, штамм ULwNAH1 – на нафталине. Данные штаммы способны к росту на средах с нефтью, дизельным топливом, фенантроном, и нафталином. Нафталин, являясь двухкольцевым углеводородом, представляет собой самое простое соединение среди ПАУ. Биохимические пути и генетические системы катаболизма нафталина наиболее изучены у бактерий рода *Pseudomonas* и родственных им бактериям. Известно, что нафталин через серию реакций окисляется до салицилата, последний может утилизироваться двумя способами: трансформацией в катехол с помощью салицилат гидроксилазы, либо, посредством салицилат 5-гидроксилазы, в гентизат. В исследуемых штаммах *Delftia* spp. методом ПЦР с последующим секвенированием полученных ампликонов было показано наличие последовательностей генов, характерных для оперонов деградации нафталина через салицилат и гентизат (*nag*-оперонов) [1]. У деструкторов, относящимся к β -протеобактериям, распространены катаболические опероны, контролирующие альтернативный путь деградации нафталина через гентизат, тем не менее для штаммов *Delftia* spp. наличие *nag*-генов показано нами впервые. Для изучения функциональности выявленных генов мы изучали физиологические свойства этих штаммов, а именно их ростовые характеристики на минеральных средах (Эванса [2] и Канада [3]) с одним из следующих субстратов: 1) нафталин; 2) салицилат натрия; 3) сукцинат натрия.

Несмотря на то, что во всех трех штаммах *Delftia* spp. присутствует ген, кодирующий салицилат 5-гидроксилазу, роста на минеральной среде с салицилатом натрия в качестве единственного источника углерода и энергии не наблюдалось.

Для эффективной деградации трудно разлагаемых полициклических углеводородов (нафталина) необходимо подобрать оптимальные условия для роста бактериальной культуры. Одним из важных условий является подбор минимальной среды для наращивания биомассы бактериальных штаммов в целях их дальнейшего использования в биоремедиации загрязнённых сайтов. В качестве критериев оптимальности сред использовали значения следующих параметров:

- 1) удельная скорость роста
- 2) максимальная оптическая плотность
- 3) длительность лаг-фазы

Чем выше удельная скорость роста, максимальная оптическая плотность и меньше длительность лаг-фазы, тем более оптимальной считается среда для роста микроорганизмов.

Как видно из таблицы 1, удельные скорости роста на нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии у штаммов *Delftia* sp. ULwDis2 и ULwDis3 на минимальной среде Канада выше на 35%, чем на среде Эванса, а у штамма *Delftia* sp. ULwNAH1 остаётся на том же уровне. Максимальная оптическая плотность также на среде Канада выше на 15% (как минимум), чем на среде Эванса. Длительность лаг-фазы у всех исследуемых штаммов меньше на среде Канада. Анализ всех этих данных говорит о том, что минимальная среда Канада более

оптимальная для наработки биомассы исследуемых штаммов, чем наиболее часто используемая в нашей лабораторной практике минимальная среда Эванса. Наиболее очевидным фактом является различие исследуемых сред по количеству источника азота - в среде Канеда азота в 6 раз больше, чем в среде Эванса. Этим можно объяснить более оптимальные условия для роста штаммов именно в среде Канеда.

Табл. 1. Анализ роста культур *Delftia* spp. на различных минимальных средах

Параметры	Среда	<i>Delftia</i> sp. ULwDis2	<i>Delftia</i> sp. ULwDis3	<i>Delftia</i> sp. ULwNAH1
Удельная скорость роста	Среда Эванса (Нафталин)	0.13	0.12	0.16
	Среда Канеда (Нафталин)	0.2	0.2	0.16
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	0.45	0.48	0.57
Максимальная оптическая плотность	Среда Эванса (Нафталин)	1.78	2.0	2.0
	Среда Канеда (Нафталин)	2.36	2.35	2.39
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	1.74	1.77	1.72
Длительность лаг-фазы	Среда Эванса (Нафталин)	13 часов	14 часов	16 часов
	Среда Канеда (Нафталин)	11 часов	12 часов	12 часов
	Среда Канеда (Сукцинат, 20 мМ)	6 часов	6 часов	7 часов

Для сравнения полученных результатов в дальнейшем исследовании в качестве единственного источника углерода был использован более легкодоступный субстрат, такой как сукцинат (табл. 1). Как видно из таблицы, удельная скорость роста на сукцинате на оптимальной минимальной среде выше более, чем в два раза по сравнению с ростом на нафталине. Также меньше в два раза длительность лаг-фазы. Но для достижения такого выхода биомассы, как на среде с нафталином, необходимо увеличить концентрацию сукцината до 30 мМ. Также было показано, что максимальная оптическая плотность на среде Эванса с 10 мМ сукцината на 30% меньше, чем на минимальной среде Канеда в тех же условиях (данные не приводятся).

Таким образом, изучение ростовых характеристик исследуемых штаммов *Delftia* spp. указывает на то, что для наращивания биомассы штаммов в целях их дальнейшего использования в биоремедиации загрязнённых сайтов наиболее оптимальной является среда Канеды.

Литература

1. Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний периоды // Микробиология, 2018. Т.87. №2. С. 204-214.

2. *Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W.* The continuous cultivation of microorganisms: II. Construction of a chemostat // *Methods Microbiol.* 1970. V. 2. P. 277–327.
3. *Doronina N.V., Kaparullina E.N., Bykova T.V., Trotsenko Yu.A.* *Methylopila musalis* sp. nov., a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1847–1852.