

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ДЕГРАДАЦИЮ НАФТАЛИНА
БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP**

**М. И. ЧЕРНЯВСКАЯ¹, М. В. ДИТЧЕНКО¹, А. Э. ОХРЕМЧУК¹,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ², М. А. ТИТОК¹**

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,*
titok@bsu.by

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,*
valentovich@mbio.bas-net.by

Определена молекулярно-генетическая организация отдельных локусов (NODE_25 размером 79 979 п. н., NODE_44 размером 15 592 п. н., NODE_46 размером 14 372 п. н. и NODE_50 размером 9405 п. н.), входящих в состав коньюгативной плазиды, определяющей деградацию нафталина и фталевой кислоты бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap. Выявлено, что ряд ферментов «нижнего» пути деградации нафталина кодируются несколькими копиями генов, локализованными в плазмиде и хромосоме (например, катехол-2,3-диоксигеназа, 4-гидрокси-2-оксовалератальдолаза, ацетальдегиддегидрогеназа), либо только в хромосоме (например, катехол-1,2-диоксигеназа). Установлено, что инактивация гена *narAa*, кодирующего большую субъединицу нафталиндиоксигеназы, либо утрата плазиды биодеградации нафталина приводит к снижению эффективности деградации нефти бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap на 65 и 96% соответственно.

Введение. Бактерии рода *Rhodococcus* широко используются для биоремедиации природной среды обитания от загрязнений различной химической природы (в частности, нефти, нефтепродуктов,mono- и полициклических ароматических углеводородов и их производных, тяжелых металлов и др.) [1–6]. Биодеградативные свойства этих микроорганизмов генетически детерминированы и определяются генами хромосомного и внехромосомного происхождения [7–9]. При этом в одной клетке может присутствовать несколько типов плазмид биодеградации, в том числе коньюгативных, которые представлены линейными и колышевыми молекулами ДНК большого размера (до 1000 тыс. п. н.) [10–12]. Внесение бактерий, содержащих D-плазиды, позволя-

ет активизировать процессы биоремедиации в почве за счет интродуцированных микроорганизмов-деструкторов и аборигенной микробиоты, воспринявшей плазиды биодеградации.

Цель исследования – молекулярно-генетический и функциональный анализ генов, определяющих деградацию нафталина бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap.

Материалы и методы. Объектом исследования служили бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *R. pyridinivorans* БИМ В-986 Г). В работе были использованы штаммы *E. coli* XL1-Blue [13], *E. coli* BW19851 [14] и вектор pK18mob [15].

Для культивирования бактерий использовали среды LB и M9 [16]. В качестве источника углерода использовали нефть (4 об.%, высокосернистая обессоленная нефть, нефтеперерабатывающий завод «Наftан», Беларусь), гексадекан и нафталин (пары).

Концентрацию нефти в среде культивирования оценивали гравиметрически после экстракции трихлорметаном [17].

Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозиловым методом [18]. Для выделения плазидной ДНК использовали набор реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit («Jena Bioscience», Германия).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали реактивы производства «Thermo Scientific» (Литва) и праймеры производства ОДО «Праймтех» (Беларусь).

Для амплификации гена *narAa* использовали праймеры NarAa Forward и NarAa Reverse при режимах, описанных в работе [19]. Очистку фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью набора реактивов Agarose Gel Extraction Kit («Jena Bioscience», Германия). Вектор pK18mob линеаризовали с помощью рестриктазы *Sma*I («Thermo Scientific», Литва). Для проведения реакции лигирования использовали реактивы производства «Thermo Scientific», Литва.

Трансформацию бактерий *E. coli* проводили стандартным методом, изложенным в руководстве [20]. Для отбора трансформантов *E. coli* XL1-Blue в среду добавляли канамицин (50 мкг/мл), IPTG (0,5 ммоль/л) и X-Gal (50 мкг/мл); *E. coli* BW19851 – канамицин (50 мкг/мл).

Метод конъюгационного переноса и инсерционного мутагенеза для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap описан в работе [21]. Анализ мутантов с инактивированным геном *narAa* осуществляли методом ПЦР с использованием праймеров M13 Forward и NarAa Forward [18] при режиме амплификации: 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.

Библиотеку ДНК для полногеномного секвенирования готовили с использованием набора реактивов Nextera XT library prep kit («Illumina»). Секвенирование проводили с использованием системы MiSeq («Illumina»).

Полученные данные обрабатывались с помощью программы Trimmomatic-0.36 [22], в результате чего были удалены адаптерные последовательности и последовательности с низким качеством (недостоверные). Оставшиеся последовательности ДНК были собраны в контиги с помощью программы SPAdes-3.8.1 [23]. Полученные 287 файлов со средним покрытием k-мерами 27,5618 были проанализированы с помощью программы BLASTN2.2.1 [24], после чего для дальнейшей сборки генома были отобраны 76 контигов. Автоматическую аннотацию генома осуществляли с использованием программ RAST [25] и RASTtk [26] (<http://www.rast.nmpdr.org>). Аннотированные нуклеотидные последовательности доступны на сайте http://bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap спонтанно утрачивают способность деградировать нафталин при длительном культивировании в неселективных условиях, что предполагает внекромосомную локализацию генов, детерминирующих утилизацию этого полициклического ароматического соединения [21]. При этом варианты *R. pyridinivorans* 5Ap-6 (*nah*⁻) утрачивали способность утилизировать не только нафталин, но и фенантрен в качестве источника углерода.

С использованием метода направленного мутагенеза были получены мутанты бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap с нарушенным геном, кодирующим большую субъединицу нафталиндиоксигеназы (*narAa*). Следует отметить, что данный белок в составе сложного ферментного комплекса определяет первый этап окис-

ления нафталина. Для мутагенеза использовали суициdalный вектор pK18mob, определяющий устойчивость к канамицину и содержащий фрагмент гена *narAa* бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, который вводили в клетки исследуемых микроорганизмов путем конъюгации [21]. Отбор мутантов осуществляли на среде с канамицином. Предполагали, что образующиеся на селективной среде клоны формируются за счет встраивания вектора (определяет устойчивость к канамицину) в состав детерминанты *narAa* путем гомологичной рекомбинации (идентичные последовательности *narAa* присутствовали в составе вектора и геноме *R. pyridinivorans* 5Ap). Установлено, что отобранные мутантные варианты утрачивали способность использовать нафталин в качестве единственного источника углерода (обозначены как nah⁻Km^R). Наличие вставки в целевом гене оценивали с помощью ПЦР. Для этого использовали праймеры, способные комплементарно связываться с нуклеотидной последовательностью вектора (праймер M13 Forward) и геном *narAa* бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (праймер NarAa Forward [19]), обеспечивая образование продуктов амплификации размером около 650 п. н. Ампликоны ожидаемого размера регистрировали при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток инсерционных мутантов nah⁻Km^R (дорожка 2 на рис. 1), либо плазмидной ДНК вектора pK18mob со встроенным геном *narAa* (дорожка 1 на рис. 1). При использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток исходных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (дикий тип, nah⁺) продуктов амплификации получено не было.

Установлено, что гены деградации нафталина локализованы в составе коньюгативной плазмида. Показано, что исходная НАН-плазмида (в качестве селектируемого маркера использовали нафталин) передавалась в изогенной системе скрещиваний с частотой $(2,16 \pm 0,34) \times 10^{-6}$, а ее канамицинрезистентный вариант, полученный путем встраивания вектора pK18mob в состав гена *narAa*, с частотой $-(3,65 \pm 0,06) \times 10^{-6}$ (в качестве селектируемого маркера использовали канамицин). В качестве реципиентов в скрещиваниях использовали вариант, спонтанно утративший способность утилизировать нафталин (nah⁻) и устойчивый к стрептомицину (отобран в результате спонтанного мутагенеза).

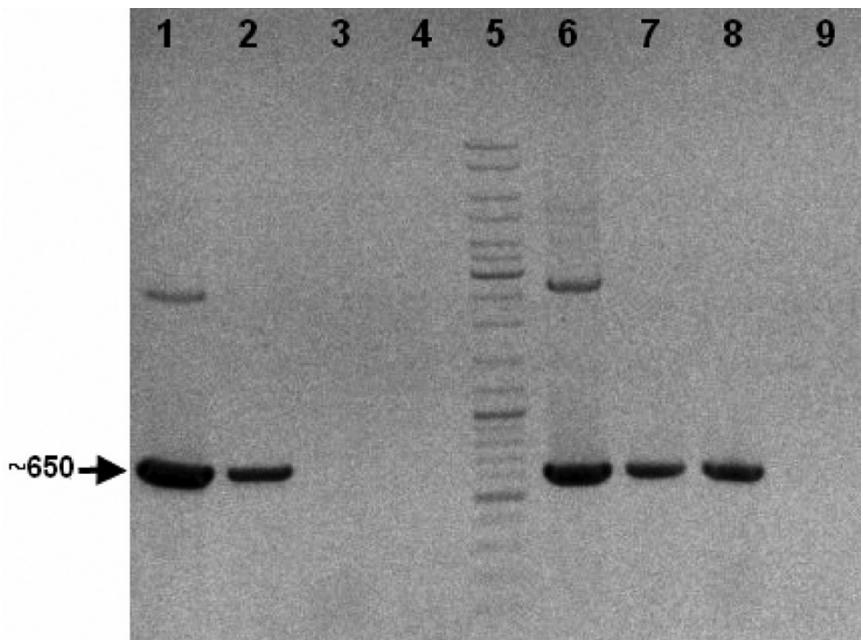


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа мутантных вариантов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap: номера дорожек соответствуют продуктам амплификации, полученным с праймерами M13 Forward, NarAa Forward (дорожки 1–4) и NarAa Forward, NarAa Reverse (дорожки 6–9) при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток: 2, 7 – nah[–]Km^R; 3, 8 – nah⁺. Дорожки 1, 6 соответствуют продуктам амплификации при использовании в качестве матрицы ДНК плазмида pK18mob со встроенным геном narAa. Дорожки 4, 9 – матрица не добавлялась. Дорожка 5 – маркер GeneRuler DNA Ladder Mix

Таким образом, были получены варианты, спонтанно утратившие плазмиду деградации нафталина (обозначены как nah[–]), а также трансконъюганты, отобранные в результате конъюгационного переноса исходной НАН-плазмиды в клетки бактерий nah[–] (обозначены как 8nah⁺). Все вышеперечисленные варианты, а также бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа (nah⁺) были использованы для локализации генов, детерминирующих утилизацию нафталина, в составе фрагментов внекромосомного происхождения, нуклеотидные последовательности которых определены в результате полноразмерного секвенирования.

В результате полногеномного секвенирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap был выявлен 21 фрагмент внекромосомного происхождения, при этом только два из них (протяженностью 79 979 п. н. – NODE_25 и 35 911 п. н. – NODE_35) содержали гены, определяющие конъюгационный перенос (в частности,

ген *traA*), но в их составе отсутствовали детерминанты деградации нафталина. Поскольку плазмида биодеградации нафталина передавалась путем конъюгации, предполагали, что один из этих фрагментов через ряд промежуточных последовательностей ДНК связан с генами деградации нафталина (гены деградации нафталина выявлены в составе фрагментов NODE_46 и NODE_50). На основании нуклеотидной последовательности гена *traA* были сконструированы специфические праймеры 35trwC_F2936 (5'-TGCAGAGCGTATCGACGAC-3'), 35trwC_3626R (5'-TGGACGAAGCGTTGGAGTGG-3') и 25trwC_3039F (5'-AGCGCTTGGACTCGAGCTG-3'), 25trwC_4022R (5'-TCGCCGAGTACAC TGATAACCCAC-3'), обеспечивающие амплификацию фрагментов ДНК размерами 691 и 984 п. н., локализованных в составе NODE_35 и NODE_25 соответственно. Искомые последовательности ДНК амплифицировали с использованием *Taq*-полимеразы при режиме: 95 °C – 5 мин; 95 °C – 1 мин, 57 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 5 мин.

В результате ПЦР с использованием праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагмента размером 691 п. н. (NODE_35), ампликоны ожидаемого размера были получены при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток nah⁺, nah⁻ и 8nah⁺ (дорожки 4–6 на рис. 2). На данном фрагменте не было выявлено генов, определяющих фенотипические признаки, что не позволило отнести его к определенному типу плазмид. Тем не менее конъюгативная плазмида, содержащая NODE_35, характеризовалась стабильностью наследования в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap при их длительном культивировании в неселективных условиях (выявлялся продукт ПЦР при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток nah⁻).

Вторая пара праймеров, обеспечивающая амплификацию гена *traA*, локализованного в составе фрагмента протяженностью 79 979 п. н. (NODE_25), позволила получить ампликоны ожидаемой длины (984 п. н.) при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток nah⁺ и 8nah⁺ (дорожки 1, 3 на рис. 2). При использовании в качестве матрицы тотальной

ДНК, выделенной из клеток nah^- , продуктов амплификации получено не было (дорожка 2 на рис. 2). Данные результаты свидетельствуют в пользу локализации фрагмента (NODE_25) в составе плазмида деградации нафталина.

Следует отметить, что *rep*-ген, обнаруженный в составе этого фрагмента, кодирует белок инициации репликации внехромосомных генетических элементов, выявляемых в клетках представителей разных видов бактерий рода *Rhodococcus* (в частности, в бактериях *R. gordoniae*, *R. phenolicus*, а также в клетках ряда бактерий с неопределенным таксономическим статусом *Rhodococcus* sp.) (рис. 3). Данные Rep-белки образуют семейство ДНК-связывающих полипептидов (Pfam: PF01051). В форме мономеров они связываются с молекулой ДНК в области повторов и обеспечивают ее локальное расплетение, а в форме димеров

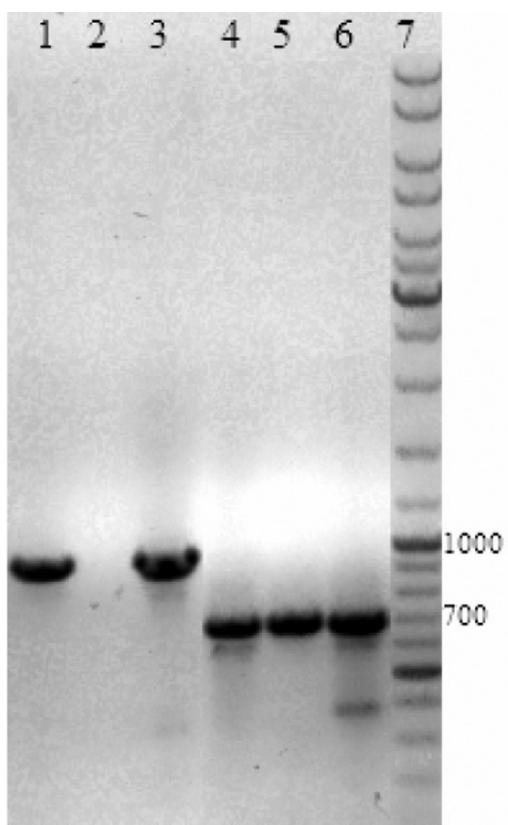


Рис. 2. Электрофорограмма продуктов амплификации генов *traA*, входящих в состав фрагментов NODE_25 и NODE_35: номера дорожек соответствуют продуктам амплификации генов *traA*, входящих в состав NODE_25 (дорожки 1–3) и NODE_35 (дорожки 4–6) при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из клеток: 1, 5 – nah^+ ; 2, 6 – nah^- ; 3, 4 – 8 nah^+ , 7 – маркер GeneRuler DNA Ladder Mix

взаимодействуют с операторной областью *rep*-гена и ингибируют его транскрипцию. Подобного типа системы инициации репликации широко распространены среди плазмид грамотрицательных бактерий [27]. Выявление плазмид в клетках бактерий разных систематических групп, содержащих сходные *rep*-гены, позволяет отнести их к внекромосомным генетическим элементам широкого круга хозяев.

Помимо генов, кодирующих белки, обеспечивающие репликацию и распределение плазмидной ДНК между дочерними клетками, а также конъюгационный перенос, фрагмент NODE_25 содержал гены, кодирующие синтез ферментов биодеградации фталевой кислоты и ее эфиров.

В литературе описано несколько путей биодеградации нафталина. В результате первичного окисления с участием нафтилдиоксигеназы образуется 1,2-дигидроксинафталин, который через ряд промежуточных продуктов превращается в салициловую кислоту, которая, в свою очередь, может окисляться через катехол или через гентизат [28]. При орто-расщеплении 1,2-дигидроксинафталина может образовываться 2-карбоксициннамовая кислота, которая через кумарин превращается во фталевую кислоту [29].

Гены, кодирующие ферменты деградации нафталина, имеют хромосомную и внекромосомную локализацию (NODE_25,

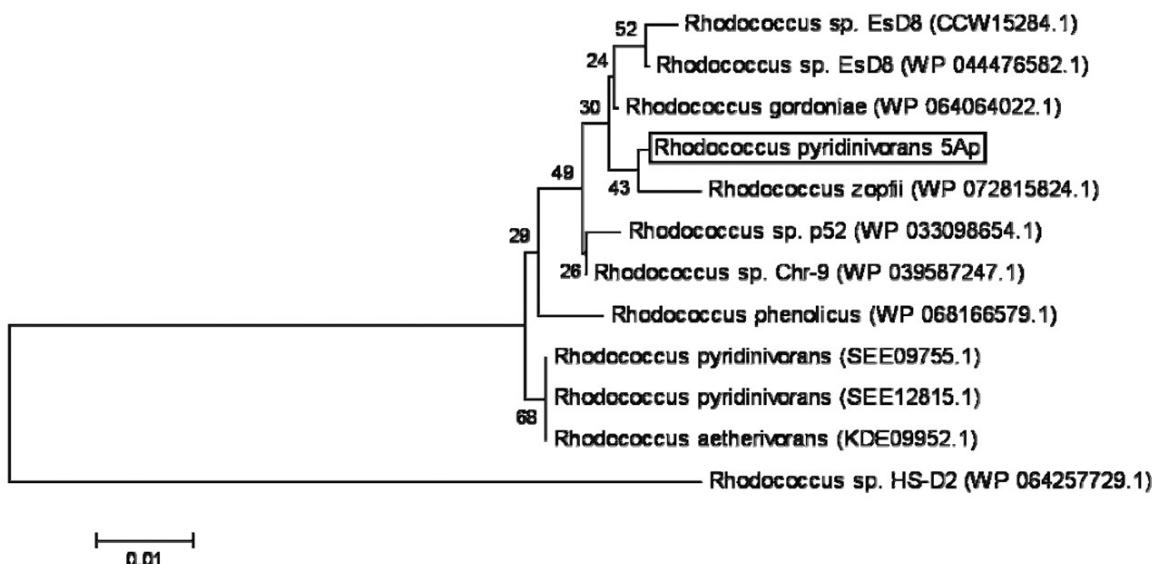


Рис. 3. Филогенетическое древо Rep-белков плазмид бактерий рода *Rhodococcus* (исследуемый штамм выделен рамкой)

Ферменты деградации нафталина бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

| Фермент | Локализация | Координаты, п. н. |
|---|--------------------|---|
| Нафталиндиоксигеназа (большая и малая субъединицы) | Плазмида (NODE_46) | 5045–6451, 5041–4523 |
| Цис-нафталиндигидродиолдегидрогеназа | Плазмида (NODE_46) | 3416–4231 |
| Салицилатгидроксилаза | Хромосома | 4 284 535–4 286 154 |
| Катехол-2,3-диоксигеназа | Хромосома | 4 604 532–4 605 626 |
| | Плазмида (NODE_50) | 7203–8084 |
| Дегидрогеназа 2-гидроксимуконового альдегида | Хромосома | 4 607 794–4 609 272 |
| 4-Оксалокротонаттаутомераза | Хромосома | 4 615 708–4 615 905 |
| 4-Оксалокротонатдекарбоксилаза | Хромосома | 4 615 908–4 616 666 |
| Гидролаза 2-гидроксимуконового полуальдегида | Плазмида (NODE_50) | 3588–4451 |
| 2-Кето-4-пентеноатгидратаза | Хромосома | 5 060 489–5 061 334 |
| 4-Гидрокси-2-оксовалератальдолаза | Хромосома | 5 058 508–5 059 563 |
| | Плазмида (NODE_46) | 12 194–13 063 |
| Ацетальдегиддегидрогеназа | Хромосома | 5 059 560–5 060 492 |
| | Плазмида (NODE_46) | 13 129–13 851 |
| Катехол-1,2-диоксигеназа | Хромосома | 2 627 164–2 628 096 4 282 536–4 283 441 4 865 763–4 866 605 |
| Муконатциклоизомераза | Хромосома | 4 836 411–4 837 760 4 864 484–4 865 611 |
| Муконолактонизомераза | Хромосома | 4 864 165–4 864 446 |
| β-Кетоадипат-енол-лактонгидролаза | Хромосома | 639 210–640 010 |
| 3-Оксоадипат-коэнзим А-трансфераза (субъединицы А и В) | Хромосома | 4 461 977–4 462 894, 4 462 891–4 463 667 |
| 3-Кетоацил-коэнзим А-тиолаза | Хромосома | 159 653–160 846 |
| Гентизат-1,2-диоксигеназа | Плазмида (NODE_50) | 6716–7195 |
| Фталат-3,4-диоксигеназа (большая и малая субъединицы) | Плазмида (NODE_25) | 36 345–37 579, 37 576–38 163 |
| Протокатехат-4,5-диоксигеназа (большая и малая субъединицы) | Плазмида (NODE_44) | 12 379–13 308, 13 350–14 180 |

NODE_46, NODE_50, NODE_44) (см. таблицу). Следует отметить, что окисление нафталина бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar может осуществляться не только через образование салицилата, который затем окисляется по двум альтернативным путям (через гентизат или катехол), но и через 2-карбоксициннамоновую кислоту, а затем фталат и протокатехат. При этом ряд ферментов «нижнего» пути кодируется дуплицированными генами, локализованными в плазмиде и хромосоме (например, катехол-2,3-диоксигеназа, 4-гидрокси-2-оксовалератальдолаза, ацетальдегиддегидрогеназа) либо имеющими несколько копий в составе хромосомы (например, катехол-1,2-диоксигеназа) (см. таблицу).

Детерминанты плазмидного происхождения, определяющие синтез ферментов, участвующих в окислении фталевой кислоты, локализованы на разных фрагментах ДНК (NODE_25 и NODE_44), что позволяет их отнести к внекромосомному генетическому элементу, обеспечивающему бактериям *R. pyridinivorans* 5Ar деградацию нафталина (см. таблицу).

Исследование влияния отдельных генетических детерминант на процесс биодеградации нефти имеет значение для понимания механизмов и путей утилизации этого сложного, многокомпонентного химического соединения, а также лежит в основе отбора штаммов-деструкторов с увеличенной биодеградативной активностью. В результате проведенного анализа было установлено, что в отсутствие плазмиды деградации нафталина (вариант nah⁻) эффективность деградации нефти бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar в жидкой среде снижалась на 96%, а при нарушении гена narAa – на 65% по сравнению с диким типом. Полученные результаты позволяют предположить, что в составе изучаемой плазмиды могут присутствовать дополнительные генетические детерминанты, определяющие синтез ферментов, участвующих в биодеградации нефти, либо характеризующиеся широкой субстратной специфичностью.

Заключение. В результате проведенного исследования установлена молекулярно-генетическая организация отдельных локусов (NODE_46, NODE_50, NODE_25, NODE_44), входящих в состав конъюгативной плазмиды биодеградации нафталина и фталевой кислоты у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar. Для обе-

спечения деструкции нефти бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap требуется наличие в их геноме плазмиды биодеградации нафталина. Поскольку плазмида биодеградации нафталина является конъюгативной и, вероятно, может наследоваться в широком круге бактериальных хозяев рода *Rhodococcus*, внесение бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в почву, загрязненную нефтью, может расширить адаптивный потенциал автохтонной микробиоты.

Литература

1. Биопрепарат для ликвидации аварийных разливов нефти на воде и почве : пат. 8260 Респ. Беларусь : МПК C02F3/34 (2001) / А. С. Самсонова, З. М. Алещенкова, Н. Ф. Семочкина, С. Г. Котов, А. Ю. Лупей. – Опубл. : 30.06.2003.
2. Самсонова, А. С. Биосорбционный препарат Родобел-ТН: состав, эффективность применения / А. С. Самсонова, Н. Г. Клишевич // Интер-медикал. – 2014. – № 4. – С. 63–67.
3. Сравнительная эффективность деградации нефтепродуктов консорциумом плазмидсодержащих штаммов-деструкторов и биопрепаратами «МикробАк», «Биоойл» / А. А. Ветрова [и др.] // Известия ТулГУ. Естеств. науки. – 2013. – Вып. 2, ч. 1. – С. 258–272.
4. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения : пат. 2378060 РФ : МПК C12N1/26, B09C1/10 (2009) / А. Е. Филонов, А. Н. Шкидченко, Т. В. Якшина, А. А. Кошелева, К. В. Петриков, И. Ф. Пунтус, А. М. Боронин, И. А. Нечаева, А. Б. Гафаров, В. А. Самойленко. – Опубл. : 10.01.2010.
5. Биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов : пат. 2174496 РФ : МПК C02F3/34, B09C1/10, C12N1/26, C12N1/26, C12R1/01 (1999) / В. П. Мурыгина, Н. Е. Войшвилю, С. В. Калюжный. – Опубл. : 10.10.2001.
6. Биопрепарат Микрозим™ «ПЕТРО ТРИТ» – биодеструктор нефтяного загрязнения почвы и воды [Электронный ресурс] // ООО «РСЭ-трейдинг» МИКРОЗИМ™. – Режим доступа: <http://www.microzym.ru/oilspills.htm>. – Дата доступа: 21.02.2016.
7. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene / L. A. Kulakov [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 4. – P. 1754–1764.
8. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martinkova [et al.] // Environ. Int. – 2009. – № 35. – P. 162–177.
9. Larkin, M. J. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility / M. J. Larkin, L. A. Kulakov, Ch. C. R. Allen // Curr. Opin. Biotechnol. – 2005. – № 16. – P. 282–290.

10. Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276 / H. Saeki [et al.] // Microbiol. – 1999. – Vol. 145. – P. 1721–1730.
11. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse / M. P. McLeod [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, № 42. – P. 15582–15587.
12. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 / D. Kim [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, № 7. – P. 3270–3278.
13. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection / W. O. Bullock [et al.] // BioTechniques. – 1987. – Vol. 5. – P. 376–378.
14. Metcaff, 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. Metcaff, W. Jiang, B. L. Wanner // Gene. – 1994. – Vol. 138. – P. 1–7.
15. 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. Schäfer [et al.] // Gene. – 1994. – Vol. 145. – P. 69–73.
16. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер ; пер. с англ. Ю. Н. Зографа [и др.] ; под ред. и с предисл. С. И. Алиханяна. – М. : Мир, 1976. – 436 с.
17. Другов, Ю. С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 270 с.
18. te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83, № 8. – P. 2541–2545.
19. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN / V. Andreoni [et al.] // Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 2, is. 5. – P. 572–577.
20. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрябина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
21. Чернявская, М. И. Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus* / М. И. Чернявская // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11. – С. 190–197.
22. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [Electronic resource] / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Mode of access: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/04/12/bioinformatics.btu170.full>. – Date of access: 01.09.2016.
23. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich [et al.] // J. Comp. Biol. – 2012. – Vol. 19, is. 5. – P. 455–477.

24. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology [Electronic resource] / R. K. Aziz [et al.] // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – Article number: 75. – Mode of access: <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>. – Date of access: 01.09.2016.
25. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotating batches of genomes [Electronic resource] / T. Brettin [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – Article number: 8365. – Mode of access: <http://www.nature.com/articles/srep08365>. – Date of access: 01.09.2016.
26. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. – 1990. – Vol. 215, is. 3. – P. 403–404.
27. Thomas, C. M. The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread / C. M. Thomas. – CRC Press, 2003. – 444 p.
28. Habe, H. Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria / H. Habe, T. Omori // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003. – Vol. 67, № 2. – P. 225–243.
29. Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* M213 particularly for naphthalene degradation [Electronic resource] / A. Pathak [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 8. – e0161032. – Mode of access: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161032>. – Date of access: 10.09.2016.

MOLECULAR GENETIC AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF LOCI DETERMINING NAPHTHALENE DEGRADATION IN BACTERIA *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

*M. I. CHARNIAUSKAYA¹, M. V. DITCHENKO¹, A. E. AKHREMCHUK¹,
L. N. VALETOVICH², M. A. TITOK¹*

¹Belarusian State University, Minsk, Belarus, titok@bsu.by

*²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
valentovich@mbio.bas-net.by*

Molecular genetic organization of separate loci (NODE_25 – 79 979 kb; NODE_44 – 15 592 kb; NODE_46 – 14 372 kb; NODE_50 – 9405 kb) belonging to conjugative naphthalene and phthalate biodegradation plasmid of *R. pyridinivorans* 5Ap is represented. It was shown that some enzymes of “lower” pathway of naphthalene degradation were coded by several gene copies. They were localized in plasmid and in chromosome (for example, catechol 2,3-dioxygenase, 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase, acetaldehyde dehydrogenase), or in chromosome only (for example, catechol 1,2-dioxygenase). Inactivation of *narAa* gene coding large subunit of naphthalene dioxygenase or losing of naphthalene biodegradation plasmid leaded to decreasing of oil-degradation efficiency by *R. pyridinivorans* 5Ap on 65 and 96% respectively.

Поступила в редакцию 09.03.2017