

УДК 579.242;579.222.2

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ МЕТАБОЛИЗМА НАФТАЛИНА У ШТАММА *Rhodococcus opacus* 3D, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ОБРАЗОВАНИЕ *орто*-ФТАЛЕВОЙ И ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 Т.О. Анохина, Т.З. Есикова, А.Б. Гафаров,
В.Н. Поливцева, Б.П. Баскунов, И.П. Соляникова*

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: innas@IBPM.Pushchino.ru

Поступила в редакцию 01.11.2019

После доработки 06.12.2019

Принята к публикации 06.12.2019

Нафталин, как один из компонентов нефти, относится к широко распространенным в окружающей среде поллютантам. Биохимические и генетические аспекты деградации нафталина наиболее полно изучены у бактерий рода *Pseudomonas*. Известно, что салицилат является ключевым интермедиатом деградации этого соединения у псевдомонад. В данной работе исследована способность штамма *Rhodococcus opacus* 3D использовать нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии. Особенностью этого штамма является отсутствие роста в минеральной среде с салицилатом, типичным интермедиатом биodeградации нафталина у грамотрицательных бактерий. Отсутствие активности фермента салицилатгидроксилазы и динамика накопления салицилата при культивировании штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином свидетельствуют об альтернативном пути окисления нафталина данной культурой. Показана способность исследуемого штамма использовать в качестве ростовых субстратов моноароматические соединения – соли гентизиновой, протокатеховой, *орто*-фталевой, 2-гидроксикоричной кислот и кумарин. На основании определения активности ферментов, идентификации интермедиатов, анализа генетических детерминант и определения спектра ростовых субстратов было сделано заключение, что штамм *R. opacus* 3D осуществляет деструкцию нафталина по альтернативному, не характерному для псевдомонад, пути, включающему образование *орто*-фталевой кислоты. В данной работе методом масс-спектрометрии впервые показано, что образующийся в следовых количествах и неметаболизируемый далее ассоциат салициловой кислоты накапливался в ростовой среде в виде димера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rhodococcus opacus*, нафталин, салициловая кислота, *орто*-фталевая кислота, 2-гидроксикоричная кислота, гены биodeградации, ферментативная активность.

DOI: 10.31857/S0320972520030112

В ряду полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) нафталин представляет собой самое простое соединение. Учитывая его высокую токсичность и присутствие в отходах химической и нефтеперерабатывающей промышленности, нафталин следует рассматривать как поллютант приоритетного значения. Нафталин, как и другие ПАУ, попадает в окружающую среду также в результате неполного сгорания органических соединений, пиролизических про-

цессов, разлива и переработки нефти, уничтожения бытовых отходов и использования фумигантов и дезодораторов [1, 2].

Биохимические пути и генетические системы биodeградации нафталина наиболее полно изучены у бактерий рода *Pseudomonas* и родственных видов [3–8]. Гены деградации ПАУ у них имеют, как правило, плазмидную локализацию [9–11], но могут располагаться и на бактериальной хромосоме [12]. Для генов катаболизма нафталина характерна оперонная организация. «Верхний» оперон (*nah1*-оперон) кодирует белки, окисляющие нафталин до салицилата; «нижний» оперон (*nah2*- или *sal*-оперон) включает в себя гены, ответственные за окисление салицилата до пирокатехина с последующим расщеплением последнего по *мета*-пути до метаболитов цикла Кребса [9]. Эти опероны генетически тесно связаны друг с другом и их общим регуляторным геном *nahR*.

Принятые сокращения: ГДО – гентизатдиоксигеназа; КОЕ – колониеобразующие единицы; МЦИ – муко-натциклоизомераза; НДО – нафталин-1,2-диоксигеназа; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ПК-1,2-ДО – пирокатехин-1,2-диоксигеназа; ПК-2,3-ДО – пирокатехин-2,3-диоксигеназа; ПКК – протокатеховая кислота; ИСГ – салицилат-1-гидроксилаза; ТСХ – тонкослойная хроматография.

* Адресат для корреспонденции.

Большинство граммотрицательных бактерий характеризуются сходными путями метаболизма нафталина. Молекулярные основы этого процесса детально исследованы ранее [13, 14]. На первом этапе происходит окисление субстрата молекулярным кислородом с участием фермента нафталин-1,2-диоксигеназы (НДО; КФ 1.14.12.12), что приводит к образованию *цис*-нафталиндигидродиола [15, 16]. Далее *цис*-нафталиндигидродиол трансформируется до 1,2-дигидроксиафталина, который в ходе последовательных реакций превращается в салицилат. Салицилат-1-гидроксилаза (1СГ; КФ 1.14.13.1) окисляет салицилат с образованием пирокатехина [7, 17, 18], салицилат-5-гидроксилаза (5СГ; КФ 1.14.13.172) тот же субстрат трансформирует в гентизиновую кислоту [19, 20]. Пирокатехин далее конвертируется по путям *орто*- или *мета*-расщепления, ключевыми ферментами которых являются, соответственно, пирокатехин-1,2-диоксигеназа (ПК-1,2-ДО; КФ 1.13.11.1) и пирокатехин-2,3-диоксигеназа (ПК-2,3-ДО; КФ 1.13.11.2) [21]. Гентизат, в свою

очередь, расщепляется гентизат-1,2-диоксигеназой (ГДО; КФ 1.13.11.4) [22–24] (рис. 1). Продукты окисления пирокатехина и гентизиновой кислоты в конечном итоге поступают в цикл трикарбоновых кислот [9, 20, 25, 26].

Хотя изначально считалось, что гентизиновый путь менее распространен, чем пирокатехиновый, впоследствии ГДО в составе метаболического пути деградации нафталина была обнаружена не только у бактерий рода *Pseudomonas* [27–30]. Исследование деструкции нафталина псевдомонадами положило начало изучению метаболизма ПАУ в целом и стимулировало работы по характеристике биохимических путей деградации нафталина у бактерий разных таксономических групп [31].

Процесс деструкции нафталина у грамположительных бактерий, в частности у представителей рода *Rhodococcus*, изучен в значительно меньшей степени [31, 32]. Информация в основном касается организации генов, кодирующих нафталин-1,2-диоксигеназу (*narAa* и *narAb*) и дигидродиолдегидрогеназу (*narB*) [33]. Отличи-

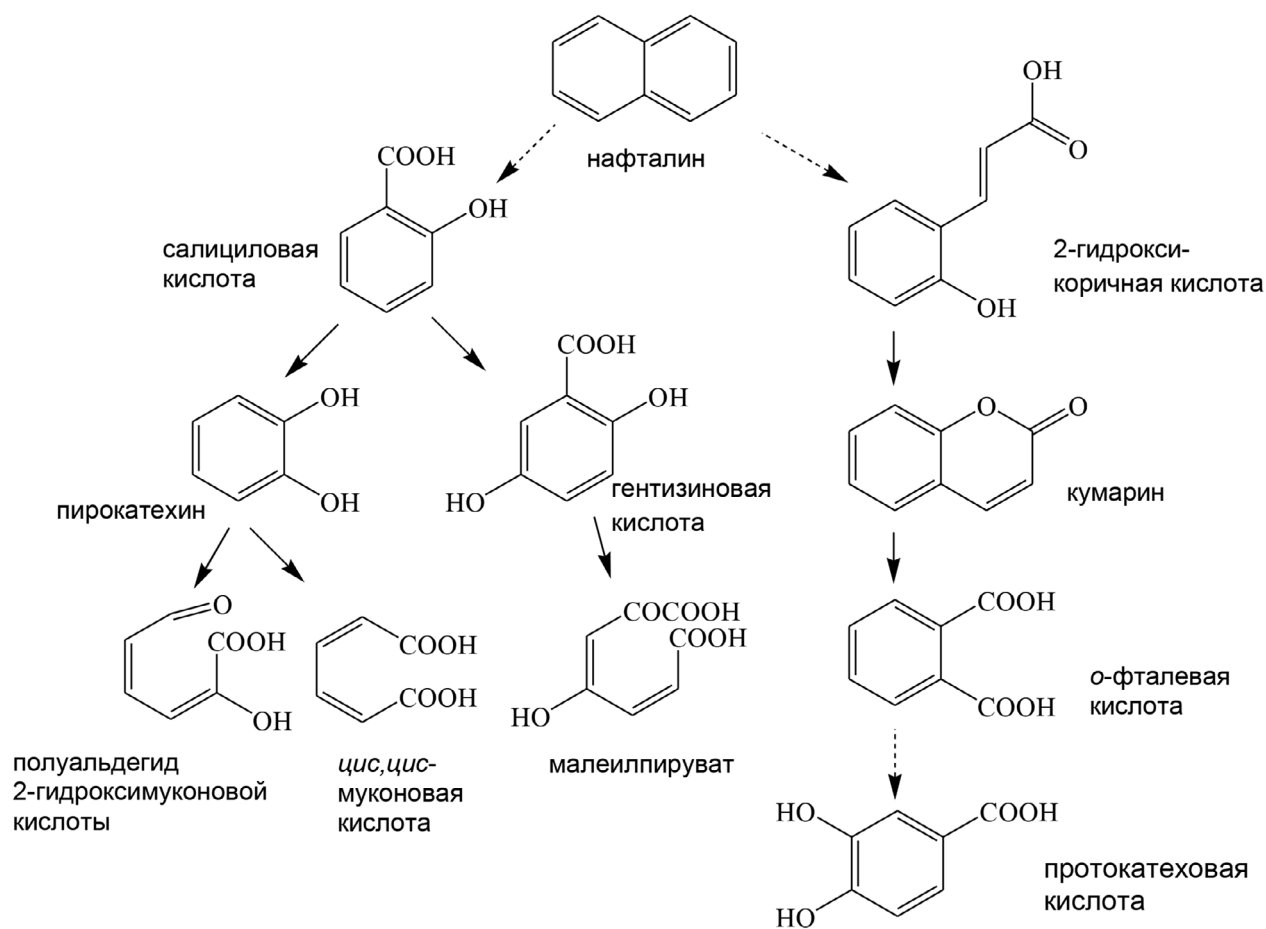


Рис. 1. Начальные этапы деструкции нафталина бактериями различных таксономических групп

тельной особенностью родококков является то, что гены, ответственные за первые этапы деградации нафталина, не организованы в единый кластер, как у псевдомонад. У разных штаммов *Rhodococcus* в геноме присутствует несколько гомологичных участков, разделенных негомологичными последовательностями, включая прямые и инвертированные повторы [34, 35]. Различия также касаются участия предполагаемого регулятора транскрипции GntR (*narR1* и *narR2*), характерного для ряда родококков [35].

Информация о путях деградации нафталина родококками ограничена и противоречива. Показано, что утилизация нафталина у штаммов *Rhodococcus* sp. B4 и *Rhodococcus* sp. NCIMB 12038 проходит по пути, характерному для псевдомонад, с салицилатом в качестве центрального интермедиата [36, 37]. В ряде случаев у родококков салициловая кислота, образующаяся в результате трансформации нафталина, превращается в гентизиновую [36, 38]. Штамм *R. wratislaviensis* IFP 2016 способен разлагать 11 ароматических соединений, включая нафталин, однако путь деградации нафталина у него детально не изучен [32]. Особый интерес представляет штамм *R. opacus* M213, у которого разложение нафталина происходит с образованием не салицилата, а производных коричной кислоты [31].

Таким образом, анализ имеющихся литературных данных показывает, что у микроорганизмов наиболее полно исследованы пути разложения нафталина, в которых центральным метаболитом является салицилат. Тем не менее ряд работ указывает на то, что у грамположительных бактерий, скорее как исключение, разложение нафталина происходит по альтернативным путям.

Исследуя способность родококков-деструкторов ПАУ разлагать нафталин, мы обнаружили, что эти культуры росли в минеральной среде с нафталином в качестве ростового субстрата, но не были способны к росту в минеральной среде с салицилатом. Целью данной работы являлось изучение метаболизма нафталина у штамма *R. opacus* 3D, выделенного из активного ила очистных сооружений. Особое внимание было уделено идентификации интермедиатов деградации нафталина, выявлению биохимических особенностей этого процесса и обнаружению генов, потенциально вовлеченных в процесс разложения нафталина у данного штамма.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Для приготовления минеральных сред были использованы реактивы фирм-произ-

водителей «Реахим» (СССР), «AppliChem» (США) и «Panreac» (США). Биохимические реактивы были получены от фирм «Sigma-Aldrich» (США) и «Serva» (Германия), реактивы для молекулярно-биологических работ – от фирм «Thermo Fischer Scientific» (США), «Zymo Research» (США) и «Биоком» (Россия).

Бактериальные штаммы. В данной работе были использованы бактериальные штаммы-деструкторы рода *Rhodococcus*, выделенные ранее из различных загрязненных источников. Культуры, использованные в работе, указаны в табл. 1. Из-за отсутствия в коллекции штамма родококка, обладающего фенотипом Nah⁺Sal⁺, в качестве контроля был выбран штамм *Pseudomonas chlororaphis* OV17(pOV17), утилизирующий нафталин или салицилат как единственный источник углерода и энергии.

Условия культивирования. Штаммы выращивали в минеральной среде следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ – 0,73; KH₂PO₄ – 0,35; MgSO₄ × 7H₂O – 0,1; NaHCO₃ – 0,25; MnSO₄ × 5H₂O – 0,002; NH₄NO₃ – 0,75; FeSO₄ × 7H₂O – 0,02 («Реахим», СССР). Для получения агаризованной среды добавляли 1,5% агара («Difco», США).

Ростовые субстраты использовали в следующих концентрациях: сукцинат, глутамат, нафталин – 0,5–1,0 г/л; гентизат, протокатехоат, пирокатехин, орто-фталат, 2-гидроксикоричная и 2-карбоксихоричная кислоты – 0,2–0,5 г/л; салицилат – 0,1–1,0 г/л (все реактивы производства «Sigma-Aldrich», США и «Thermo Fischer», Германия). Нерастворимые в воде ароматические кислоты вносили в ростовую среду в виде солей натрия. При выращивании штамма на агаризованной среде летучие ароматические соединения (нафталин, кумарин) наносили на крышку перевернутой чашки Петри. Бактерии культивировали при 30 °С на чашках или в жидкой среде на качалке (150 об/мин) в 750-мл колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды.

Интенсивность роста микроорганизмов оценивали спектрофотометрически (UV-1800, «Shimadzu», Япония) по поглощению света при длине волны 560 нм и/или подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуральной жидкости. Количество клеток определяли методом 10-кратных серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду LB. Пробы отбирали в течение 3–5 сут через каждые 24 ч. Начальная концентрация клеток для штамма *R. opacus* 3D составляла 6,3 × 10⁷ – 8,0 × 10⁷ КОЕ/мл (A₅₆₀ 0,28 ± 0,02), а для *P. chlororaphis* OV17(pOV17) – 2,2 × 10⁸ – 2,6 × 10⁸ КОЕ/мл (A₅₆₀ 0,16 ± 0,02).

Биомассу для определения в ней ферментативных активностей выращивали на агаризо-

Таблица 1. Штаммы, использованные в данной работе, и их фенотипическая характеристика

Штамм	Источник выделения	Фенотип (окисляемые субстраты)
<i>R. opacus</i> 3D	активный ил очистных сооружений, г. Пушкино, Московская обл., 2016	Наф ⁺ Сал ⁻ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. opacus</i> 1CP	накопительная культура, поддерживаемая в течение нескольких месяцев с 2,4-дихлорфенолом [39]	Наф [±] Сал ⁻ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (L5A-BSU)	почва, загрязненная нефтепродуктами, Ливия [40]	Наф ⁺ Сал ⁻ Гент ⁺ о-Фт ⁻ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>R. wratislaviensis</i> G10-Ph	штамм <i>R. wratislaviensis</i> G10 выделен из почвы, загрязненной галогенсодержащими ароматическими соединениями (ОАО «Галоген», Пермь) [41]; использованный в данной работе вариант штамма не утилизировал салицилат	Наф ⁺ Сал ⁻ Гент ⁻ о-Фт ⁺ ПКК ⁻ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>Rhodococcus</i> sp. K NAH1	донные отложения Балтийского моря, Финский залив, д. Кандиюля [42]	Наф ⁺ Сал ⁻ Гент ⁺ о-Фт ⁺ ПКК ⁺ 2ГКор ⁺ Кум ⁺
<i>Rhodococcus</i> sp. Dor2*	почва, загрязненная отходами нефтехимического производства, г. Стерлитамак, Башкортостан, 2000 г.	Наф ⁻ Сал ⁻ Гент ⁻ о-Фт ⁻ ПКК ⁺ 2ГКор ⁻ Кум ⁻
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> OV17(pOV17)	ризосфера растений, почва, загрязненная нефтью, Западная Сибирь [43]	Наф ⁺ Сал ⁺ Гент ⁻ о-Фт ⁻ ПКК ⁺ 2ГКор ⁻ Кум ⁻

Примечание. Интермедиаты деградации нафталина добавляли в среду до конечной концентрации 0,2 г/л. Наф – нафталин, Сал – салицилат, Гент – гентизат, о-Фт – о-фталат, ПКК – протокатеховая кислота, 2ГКор – 2-гидроксикоричная кислота, Кум – кумарин.

* Штамм *Rhodococcus* sp. Dor2, обладающий фенотипом Наф⁻Сал⁻, был использован в работе в качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР.

ванной минеральной среде в парах нафталина в течение трех суток. Штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17) выращивали в жидкой минеральной среде в присутствии салицилата (0,5 г/л) в течение 14 ч. Для определения активности ферментов в неиндуцированных клетках бактерии культивировали в жидкой минеральной среде, содержащей 0,5 г/л сукцината или глутамата. Клетки отмывали 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 7,0), ресуспендировали в 4–5 мл этого буфера, добавляли дитиотрейтол до конечной концентрации 5 мМ, MnSO₄ до конечной концентрации 2 мМ, замораживали и хранили до использования при –20 °С.

ПЦР-анализ целевых генов. Выделение ДНК проводили с использованием набора реактивов «DiatomtmDNAprep» («Биоком», Россия) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2.

Конструирование праймеров для амплификации генов фталат-3,4-диоксигеназы (*phl3*, *ADO*) и салицилат-1-гидроксилазы (*salI*) осуществляли с использованием программы PrimerQuest Tool (<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Предсказание термодинамических параметров, третичных структур олигонуклеотидов проводи-

ли с использованием OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Проверку специфичности праймеров осуществляли в Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Амплификацию генов проводили на приборе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) при следующих условиях: первичная денатурация – 95 °С, 5 мин; далее 30 циклов: 95 °С – 30 с, отжиг праймеров – 30 с (температура отжига указана для каждой пары праймеров в табл. 2), 72 °С – 40 с; конечная элонгация – 72 °С – 5 мин. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в агарозном геле (1,0%) при напряжении 10 В/см. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете с использованием системы гель-документирования Gel Doc™ XR («Bio-Rad», США). *Taq* ДНК-полимераза, компоненты для ПЦР, концентрированный буфер для электрофореза и маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311) были производства «Fermentas» (Литва).

Секвенирование гена 16S рРНК штамма *R. opacus* 3D и филогенетический анализ. Выделение и очистку ПЦР-продукта гена, кодирующего 16S рРНК, осуществляли с использованием

Таблица 2. Праймеры, использованные в данной работе

Белок (целевой ген)	Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3')	Температура отжига праймера, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Ссылка
Малая субъединица рРНК (<i>rrs</i>)	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGHTACCTTGTTACGACTT	55	1465	[44]
Нафталиндиокси-геназа (<i>ndo</i>)	Forward Reverse	GCATGAGAGTGAGATCCCC ACTTCCCGTGTGCTGTAG	55	211	[45]
Салицилат-1-гидроксилаза (<i>sal</i>)	Forward Reverse	AGTGGGGCATCTTCGAYGMNATYGC GTCCGACCGGGTCGATRTCRTAVAC	63	642	данная работа
Фталат-3,4-диоксигеназа (<i>pht3, 4DO</i>)	Forward Reverse	CGACAACCTGGTSTYTCGCCA TCTTCCAGTCGTAGTCGTACT	54	688	данная работа
Фталат-3,4-диоксигеназа (<i>ophA1A2</i>)	Forward Reverse	ATGGAAGACATTCGCCGC TCATAGGAACACCGCGAG	55	2056	[46]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoA</i>)	LK16 LK14	GAGGACCCGAGCGGAATCA GACCGCAGCGGCTACGGGT	64	663	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoB</i>)	LK33 LK38	CGCATCGAGGCCACCGAC CGACGGGTCCTCGAACGTGA	61	306	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoC</i>)	VD11 VD14	GGTTACATGGGCTTCGAG CTCCGCCGACTTCTCCAG	58	1096	[47]
Пирокатехин-2,3-диоксигеназа (<i>edoD</i>)	VD6 VD3	CTTCTACAAGCTCATGCC CCGGTCGCTGCCTCGAGC	64	403	[47]
Протокатехоат-3,4-диоксигеназа (<i>pcaG-pcaH</i>)	2F 2R	TGCCCNTACCACGGCTG GCDCCGAKCTTCCAGTT	59	300	[48]
Протокатехоат-3,4-диоксигеназа (<i>pcaH</i>)	pcaH_260f pcaH_749r	CAACGCCGACATCGCCAA GAATCCGACGGCCCAGTTGT	54	489	[49]
Пирокатехин-1,2-диоксигеназа (<i>catA2</i> , GenBank FM877593.1)	cat4f cat4r	AAATTC AAGGGCGCAAG GAGTTCGGGTTTCGTTG	52	720	[49]
Пирокатехин-1,2-диоксигеназа (<i>catA</i> , GenBank X99622.2)	cat6f cat6r	CGACAAGTTCAAGGCCGAG CACGAAGTTGTAGGTGACGTAG	52	780	[49]

набора ZymoClean Gel DNA Recovery Kit («Zymo Research», США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 373 3130XL («Applied Biosystems», США).

Предварительный филогенетический скрининг сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли в базе данных GenBank (NCBI) с помощью пакета программ BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для более точного определения филогенетического положения исследуемого штамма полученную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с

соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTAL W [50].

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма *R. opacus* 3D длиной 1374 п.н. помещена в GenBank под номером MN553083.

Определение активностей ферментов в бесклеточных экстрактах. Клетки разрушали экстракционной дезинтеграцией на прессе типа Хьюза («ИБФМ-пресс», Россия) с рабочим давлением 3200 кг/см². После дезинтеграции клеточный дебрис удаляли центрифугированием (10 000 g,

4 °С, 30 мин) в присутствии следовых количеств ДНКазы. Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активностей ферментов. В реакционную смесь с конечным объемом 1,0 мл вносили 5–50 мкл экстракта. Определение активности проводили при 25 °С, начиная реакцию внесением бесклеточного экстракта, на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

Активность нафталиндиоксигеназы определяли спектрофотометрически по убыли NADH («Sigma-Aldrich», Германия) (A_{340} , ϵ 6220 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ NADH и 0,1 мМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (рН 7,5), учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом [51].

Активность салицилат-1-гидроксилазы определяли спектрофотометрически по убыли NADH (A_{340} , ϵ 6220 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ NADH и 0,1 мМ салицилат, бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (рН 7,5), учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом [52].

Активность пирокатехин-2,3-диоксигеназы определяли по скорости образования 2-гидроксимуконного полуальдегида (A_{375} , ϵ 33 400 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт и 50 мМ Tris-HCl-буфер (рН 7,5) [53].

Активность пирокатехин-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования *цис,цис*-муконата (A_{260} , ϵ 16 900 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 5 мМ ЭДТА, 0,25 мМ пирокатехин, бесклеточный экстракт и 50 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) [53].

Активность гентизат-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования малеилпирувата (A_{330} , ϵ 10 800 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 0,1 мМ гентизат, бесклеточный экстракт и 100 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4) [54].

Активность протокатехоат-3,4-диоксигеназы определяли по убыли протокатехоата (A_{290} , ϵ 2870 $M^{-1} cm^{-1}$) в реакционной смеси, содержащей 0,25 мМ протокатехоат и бесклеточный экстракт в Tris-ацетатном буфере (рН 7,5) [55].

Удельную активность ферментов выражали в микромолях потребленного субстрата или образующегося продукта в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Бредфорда [56].

Определение интермедиатов деградации нафталина. Анализ метаболитов, накапливающихся в культуральной жидкости при росте клеток в

минеральной среде с нафталином, проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и масс-спектрометрии. Бактериальную культуру выращивали в жидкой минеральной среде с нафталином (1,0 г/л) или салицилатом (0,2 г/л) в качестве единственных источников углерода и энергии. При культивировании штамма в минеральной среде с нафталином пробы (100 мл) отбирали при засеве и после одних, двух и трех суток культивирования. В опыте, в котором в качестве ростового субстрата был использован салицилат, пробы отбирали в момент засева и через трое суток. Абиотическим контролем служили образцы, содержавшие 0,2 г/л салицилата.

Отобранные пробы экстрагировали 30 мл этилацетата при интенсивном встряхивании, далее культуральную жидкость подкисляли HCl до рН 2,0 и повторно экстрагировали этилацетатом. Этилацетатную фракцию отбирали, обезвоживали сульфатом натрия, упаривали и растворяли в 200 мкл ацетона.

Для ТСХ применяли силикагелевые пластины с флуоресцентным индикатором («Fluka», Германия) и систему растворителей бензол : диоксан : уксусная кислота (90 : 10 : 2). R_f определяли как отношение подвижности метаболита к подвижности фронта. В качестве стандартов использовали следующие соединения: нафталин, салициловую кислоту, пирокатехин, протокатеховую, гентизиновую и *о*-фталевую кислоты, кумарин.

Суммарные экстракты анализировали методом масс-спектрометрии на приборе низкого разрешения LCQ Advantage MAX («ThermoFinnigan», Германия) с использованием одноканального шприцевого насоса для прямой инфузии метанольного раствора образца в область химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). В ходе анализа применяли различные условия работы источника ионов: нормализованная энергия столкновений 10–40% при скорости высушивающего газа 50 мл/мин и температуре капилляра 240 °С. Масс-спектрометрические данные собирали и обрабатывали с помощью программного обеспечения Xcalibur™. Детекцию проводили как в положительных, так и в отрицательных ионах. МС/МС-спектры получали, используя в качестве предшественников как протонированные $[M+H]^+$, так и депротонированные молекулы $[M-H]^-$. Идентификацию метаболитов осуществляли с использованием стандартных образцов исследуемых соединений.

Определение концентрации салициловой кислоты. Метод основан на способности салицилата реагировать с нитратом железа (III) с образо-

ванием комплекса фиолетового цвета, интенсивность окрашивания которого зависит от концентрации салицилата [57]. Концентрацию салициловой кислоты определяли спектрофотометрически по калибровочной кривой с помощью спектрофотометра UV-1800 («Shimadzu», Япония). Для этого супернатант, полученный после осаждения клеток (0,5 мл), развели дистиллированной водой до 3 мл. Затем добавляли 0,5 мл 5%-ного раствора $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ и 0,5 мл 1%-ной HNO_3 . Пробирки инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность раствора при 540 нм.

Статистическая обработка данных. Средние значения и стандартные ошибки среднего арифметического были получены по данным трех независимых экспериментов с использованием программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рост бактерий рода *Rhodococcus* на минеральной среде с нафталином и ароматическими субстратами – потенциальными интермедиатами его деградации. На первом этапе работы проверяли способность бактерий-деструкторов нафталина, принадлежащих к роду *Rhodococcus* и выделенных ранее из различных загрязненных источников, к росту в минеральной среде с салицилатом в качестве единственного источника углерода и энергии. Из пяти штаммов, утилизирующих нафталин, ни один не рос в присутствии салицилата. Факт, что ни один из родококков, утилизирующих нафталин, не разлагал салицилат, позволил предположить, что у бактерий рода *Rhodococcus* имеется альтернативный путь деградации нафталина.

Эти штаммы были проверены на способность расти в минеральной среде в присутствии других потенциальных, согласно литературным данным, интермедиатах разложения нафталина: солей гентизиновой, *o*-фталевой, протокатехо-

вой, 2-карбоксихоричной, 2-гидроксихоричной кислот и кумарина. Три из пяти проверенных штаммов использовали в качестве источника углерода и энергии каждый из протестированных субстратов, кроме салицилата (табл. 1). Один из этих штаммов, *R. opacus* 3D, был отобран для дальнейших исследований.

Штамм *R. opacus* 3D (ВКМ Ас-2848) был выделен ранее из активного ила сточных вод очистных сооружений (г. Пушкино, Московская обл.) методом прямого высева на агаризованной минеральной среде с нафталином в качестве единственного ростового источника. Для определения таксономического положения изолята была определена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК длиной 1374 п.н. Анализ последовательности показал, что штамм относится к классу *Actinobacteria*, роду *Rhodococcus* и имеет высокий уровень сходства гена 16S рРНК (99,93%) с типовым штаммом *R. opacus* DSM 43205 (LN827919). На основании полученных данных штамм был отнесен нами к виду *R. opacus*. Последовательность гена 16S рРНК была помещена в GenBank под номером MH553083.

Культивирование *R. opacus* 3D в жидкой минеральной среде с нафталином и салицилатом. Динамику роста штамма *R. opacus* 3D исследовали в жидкой минеральной среде с нафталином (1,0 г/л) и салицилатом (0,2 г/л) в течение 72 ч (рис. 2). Через каждые 24 ч отбирали пробы для измерения поглощения света, количества КОЕ и веса сухой биомассы.

При культивировании штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином в качестве ростового субстрата количество КОЕ в начале эксперимента составляло $6,3 \times 10^7$ КОЕ/мл. Фаза активного роста культуры продолжалась в течение 24 ч культивирования (рис. 2, а, кривая 1). За это время концентрация клеток достигала максимума и составляла $2,4 \times 10^8$ КОЕ/мл, что соответствовало значению поглощения 1,3 о.е. Результаты измерения прироста биомассы клеток приведены в табл. 3. Как видно из представленных данных, вес сухой биомассы к концу эксперимента увеличился примерно на порядок и составил (730 ± 40) мг/л.

Рост штамма *R. opacus* 3D отсутствовал в жидкой минеральной среде, содержащей салицилат в диапазоне концентраций 0,1–1,0 г/л, при этом количество салицилата не снижалось в процессе культивирования в течение 3–7 суток. На рис. 2, а (кривая 2) приведены данные культивирования штамма при концентрации салицилата 0,2 г/л. Показано, что в течение 72 ч эксперимента численность клеток незначительно уменьшалась: 0 ч – $8,0 \times 10^7$ КОЕ/мл, 72 ч – $5,1 \times 10^7$ КОЕ/мл.

Таблица 3. Вес сухой биомассы штамма *R. opacus* 3D при культивировании в минеральной среде с нафталином и салицилатом

Ростовой субстрат	Вес сухой биомассы (мг/л)		
	0 ч	24 ч	72 ч
Нафталин (1 г/л)	80 ± 10	590 ± 30	730 ± 40
Салицилат (0,2 г/л)	80 ± 10	н.о.	80 ± 10

Примечание. н.о. – не определяли.

Отсутствие роста *R. opacus* 3D в минеральной среде с салицилатом может указывать на наличие неполного пути окисления нафталина. В этом случае следует ожидать накопления салицилата в культуральной жидкости при выращивании клеток в среде с нафталином. Однако количество салицилата при росте штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином, добавленным в качестве единственного ростового субстрата, было незначительным (3–10 мг/л) и сохранялось на этом уровне в течение всего эксперимента (рис. 2, б). Следует отметить, что количество салицилата, внесенного в минеральную среду в качестве единственного ростового субстрата, также не уменьшалось. Исходя из полученных данных, можно предположить, что

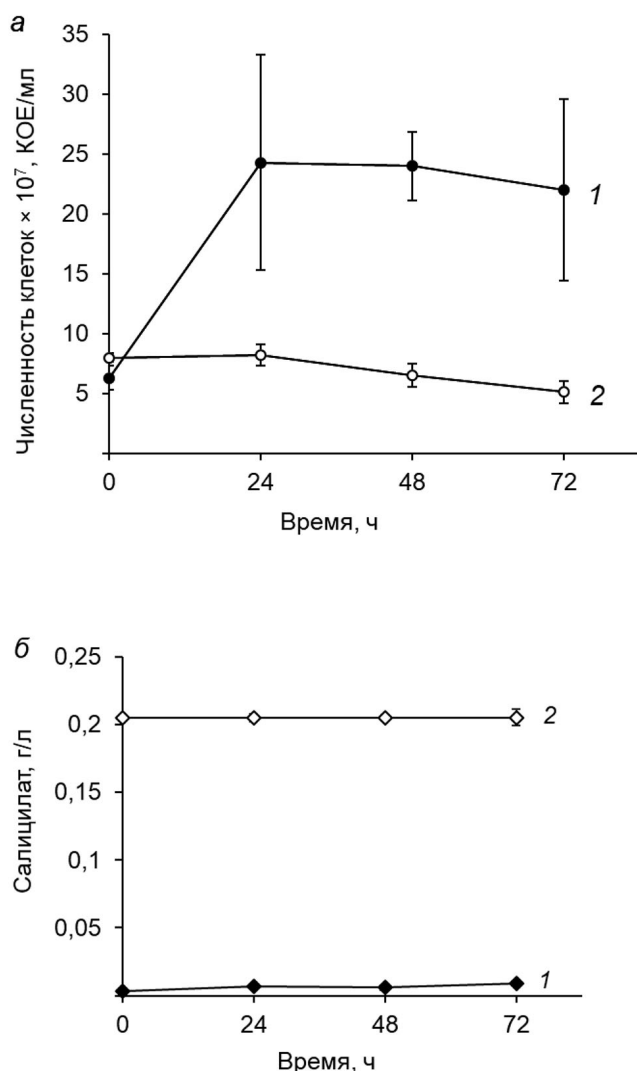


Рис. 2. Рост штамма *R. opacus* 3D в минеральной среде с нафталином и салицилатом (а) и содержание салицилата в среде (б); 1 – культивирование в присутствии нафталина (1,0 г/л), 2 – культивирование в присутствии салицилата (0,2 г/л)

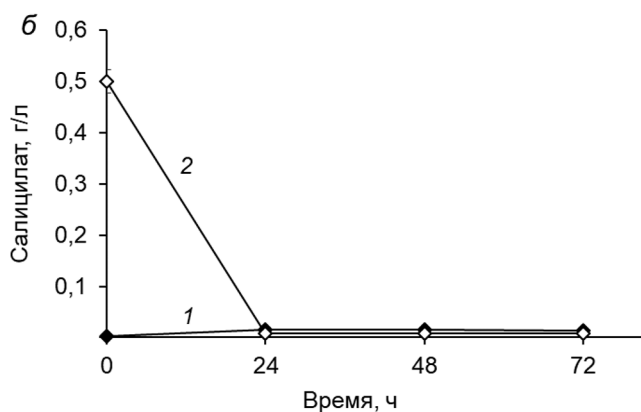
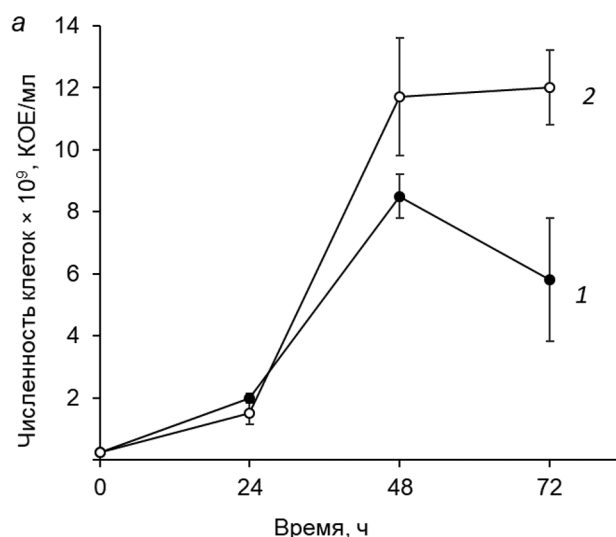


Рис. 3. Рост штамма *P. chlororaphis* OV17(pOV17) в минеральной среде с нафталином и салицилатом (а) и содержание салицилата в среде (б); 1 – культивирование в присутствии нафталина (1,0 г/л), 2 – культивирование в присутствии салицилата (0,5 г/л)

утилизация нафталина у штамма *R. opacus* 3D не включает образования салицилата в качестве ключевого интермедиата и происходит по альтернативному биохимическому пути.

Из-за отсутствия в коллекции штамма родококка, обладающего фенотипом Nah⁺Sal⁺, в качестве контроля был использован штамм *P. chlororaphis* OV17(pOV17), растущий в минеральной среде с нафталином или салицилатом и разлагающий нафталин по классическому для грамотрицательных бактерий пути (рис. 1). При культивировании штамма максимальный титр клеток наблюдался к концу вторых суток и составлял $8,5 \times 10^9$ КОЕ/мл при использовании нафталина и $1,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл при использовании салицилата (рис. 3). При этом концентрация салицилата, образующегося в качестве интермедиата при утилизации нафталина псевдомонадой, не превышала в среде 16 мг/л. При ис-

пользовании в качестве ростового субстрата в концентрации 500 мг/л салицилат разлагался полностью за 24 ч. Далее в культуральной жидкости наблюдалось только остаточное количество субстрата (не более 8 мг/л).

Активность ферментов при росте культур в присутствии нафталина. Для изучения пути окисления нафталина у *R. oracus* 3D были исследованы активности ферментов, потенциально вовлеченных в метаболизм этого соединения (табл. 4). Было установлено, что активность диоксигеназ: гентизат-1,2-диоксигеназы, пирокатехин-1,2- и 2,3-диоксигеназ, протокатехоат-3,4-диоксигеназы – была незначительной. Полностью отсутствовала активность салицилат-1-гидроксилазы и муконатциклоизомеразы. Таким образом, полученные данные свидетельствовали об отсутствии индукции основных ферментов деструкции нафталина. Для определения уровня активности пула диоксигеназ в неиндуцированных клетках штамм *R. oracus* 3D выращивали в минеральной среде, содержащей сукцинат (табл. 4). Величины удельной активности сравниваемых ферментов в клетках, выращенных в минеральной среде с нафталином или сукцинатом в качестве ростовых субстратов, отличались незначительно, что указывает на то, что синтез этих ферментов носит конститутивный характер, и нафталин не является для них индуктором. У *P. chlororaphis* OV17(pOV17) при росте в минеральной среде с нафталином или салицилатом были ожидаемо определены активности 1СГ и обеих ПК-ДО (табл. 4). При этом активность ПК-2,3-ДО была в 3–8 раз выше активности ПК-1,2-ДО.

Идентификация интермедиатов разложения нафталина. При проведении ТСХ было показана-

но, что в экстрактах культуральной жидкости штамма *R. oracus* 3D, выращенного в минеральной среде с нафталином, накапливается целый ряд соединений (до 10 пятен в зависимости от времени культивирования). Эти соединения различались по окрашиванию в видимом свете, УФ-флуоресценции и по значениям R_f . К третьим суткам культивирования интенсивность некоторых пятен уменьшалась. Пятна с R_f 0,69 (слабая интенсивность) и 0,75 были сходны по значениям R_f и характеру флуоресценции с салицилатом и кумарином, которые использовались в качестве стандартов. При культивировании штамма в присутствии салицилата в культуральной жидкости детектировалось только данное соединение.

Перечень метаболитов, идентифицированных методом масс-спектрометрии в экстрактах культуральной жидкости, приведен в табл. 5. Анализ экстрактов, полученных при выращивании штамма *R. oracus* 3D в присутствии нафталина, показал, что после первых суток роста в культуральной жидкости детектируются кумарин, салициловая, *o*-фталевая и 2-карбоксихоричная кислоты. Максимальное содержание кумарина и *o*-фталевой кислоты наблюдалось на вторые сутки, на третьи сутки эти соединения не обнаруживались. Салициловая кислота присутствовала в течение всего периода культивирования (1–3 сутки), тогда как 2-гидроксихоричная кислота была обнаружена только на третьи сутки культивирования. В это же время в экстракте был выявлен ассоциат салициловой кислоты, накапливающийся в ростовой среде в виде димера (следовые количества). Протокатеховая кислота, один из потенциальных метаболитов пути деградации нафталина и *o*-фталевой

Таблица 4. Удельная активность ферментов биodeградации нафталина у штаммов *R. oracus* 3D и *P. chlororaphis* OV17(pOV17)

Фермент	Удельная активность, мкмоль/мин на 1 мг белка				
	<i>R. oracus</i> 3D		<i>P. chlororaphis</i> OV17(pOV17)		
	нафталин	сукцинат	нафталин	салицилат	глутамат
СГ	< 0,001	< 0,001	0,011 ± 0,001	0,31 ± 0,06	0,011 ± 0,001
ПК-1,2-ДО	0,009 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,054 ± 0,009	0,043 ± 0,006	0,018 ± 0,001
ПК-2,3-ДО	0,007 ± 0,002	0,002 ± 0,000	0,456 ± 0,003	0,11 ± 0,01	0,28 ± 0,01
Г-1,2-ДО	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	н.о.	< 0,001	н.о.
ПКК-3,4-ДО	0,012 ± 0,009	0,021 ± 0,003	н.о.	< 0,001	н.о.
МЦИ	< 0,001	< 0,001	н.о.	н.о.	н.о.

Примечание. СГ – салицилатгидроксилаза; ПК-1,2-ДО – пирокатехин-1,2-диоксигеназа; ПК-2,3-ДО – пирокатехин-2,3-диоксигеназа; Г-1,2-ДО – гентизат-1,2-диоксигеназа; ПКК-3,4-ДО – протокатехоат-3,4-диоксигеназа; МЦИ – муко-натциклоизомераза; н.о. – не определяли.

Таблица 5. Масс-спектрометрическая характеристика интермедиатов, образующихся при культивировании штамма *R. opacus* 3D в присутствии нафталина и салицилата

Ростовой субстрат	Метаболит	Визуальная оценка по интенсивности пиков			Энергия коллизии/молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС-спектрах (интенсивность, %)	
		1-е сут	2-е сут	3-и сут	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺
Нафталин (1,0 г/л)	кумарин	+	++	-	-	28/147(100), 103(32)
	салициловая кислота	+	+	+	28/137(100), 93(95)	21/139(90), 138(16), 121(100)
	<i>o</i> -фталевая кислота	+	++	-	26/165(28), 121(100)	16/167(48), 149(100)
	2-карбоксикоричная кислота	+	+	+	21/191(100), 147(85)	30/193(100), 175(32), 133(91)
	2-гидроксикоричная кислота	-	следы	+	24/163(80), 119(100)	19/165(95), 147(100), 123(65)
	ассоциат салициловой кислоты	-	-	следы	16/275(91), 137(100)	-
Салицилат (0,2 г/л)	салициловая кислота	н.о.	н.о.	+	28/137(100), 93(95)	21/139(90), 138(16), 121(100)
	ассоциат салициловой кислоты	н.о.	н.о.	++	16/275(91), 137(100)	-

Примечание. (++) – интенсивность 100%; (+) – интенсивность 30% по сравнению со 100%; (-) – метаболит не детектировался; н.о. – не определяли.

кислоты, не определялась в течение всего эксперимента.

В экстрактах, полученных после трех суток культивирования *R. opacus* 3D в присутствии салицилата, указанные выше интермедиаты деградации нафталина не детектировались, за исключением салициловой кислоты и ее димера. Количество димера было на 2 порядка больше, чем при культивировании штамма в присутствии нафталина. В контроле (минеральная среда с добавлением салицилата без бактерий) димер салициловой кислоты не обнаруживался.

Гены деградации ароматических соединений штамма *R. opacus* 3D. Для идентификации генов деградации ароматических соединений у штамма *R. opacus* 3D нами были использованы праймеры как описанные ранее, так и сконструированные в ходе настоящей работы (табл. 2). Результаты определения генов, кодирующих нафталин-1,2-диоксигеназу, салицилат-1-гидроксилазу, а также пирокатехин-, фталат- и протока-техоат-диоксигеназы родококков, приведены в табл. 6.

В биодеградации нафталина у бактерий ключевым ферментом является нафталиндиоксигеназа. Для всех штаммов родококков, способных использовать нафталин в качестве ростового субстрата, были получены ПЦР-продукты соот-

ветствующего размера. У штамма *Rhodococcus* sp. Dor2 с фенотипом Nah⁻Sal⁻, который служил отрицательным контролем, продукты амплификации получены не были.

Поскольку деградация нафталина осуществляется по двум основным путям – с салициловой или *o*-фталевой кислотами в качестве центральных интермедиатов – проводили поиск генов, кодирующих потенциально вовлеченные в эти пути ферменты. Использованные праймеры не позволили выявить гены, ответственные за синтез 1СГ и фталат-3,4-диоксигеназы.

Дальнейшее расщепление интермедиатов деградации салициловой или *o*-фталевой кислот может осуществляться с участием ферментов ПК-1,2-ДО и ПК-2,3-ДО (для салициловой кислоты) и ПКК-3,4-ДО (для *o*-фталевой кислоты). У штамма *R. opacus* 3D были обнаружены гены, кодирующие ПК-1,2-ДО. Положительный ответ также был получен для генов семейств *edoB* и *edoC*, кодирующих ПК-2,3-ДО. Кроме того, продукт амплификации был получен на матрице ДНК из штамма *R. opacus* 3D с праймерами, специфичными к гену *psaH*, кодирующему β-субъединицу протока-техоат-3,4-диоксигеназы штамма *R. opacus* 1СР. Для других штаммов родококков в ряде случаев также были получены соответствующие продукты, но в различной комбинации.

Таблица 6. Гены, обнаруженные в штаммах родококков на основании ПЦР-анализа

Ген	Штамм			
	<i>R. opacus</i> 3D	<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	<i>Rhodococcus</i> sp. K NAH1	<i>Rhodococcus</i> sp. Dop2
<i>ndo</i>	+	+	+	–
<i>salI</i>	–	–	–	–
<i>pht3,4DO</i>	–	–	–	–
<i>ophA1A2</i>	–	–	–	–
<i>edoA</i>	–	–	–	–
<i>edoB</i>	+	–	+	–
<i>edoC</i>	+	–	–	–
<i>edoD</i>	–	–	–	–
<i>pcaG-pcaH</i>	–	+	+	–
<i>pcaH</i>	+	–	+	–
<i>catA2</i>	+	–	+	–
<i>catA</i>	+	–	+	–

Примечание. Представленные гены кодируют следующие ферменты: *ndo* – нафталиндиоксигеназу; *salI* – салицилатгидроксилазу; *pht3,4DO* и *ophA1A2* – фталатдиоксигеназу; *edoA*, *edoB*, *edoC*, *edoD* – пирокатехин-2,3-диоксигеназу; *pcaG-pcaH* и *pcaH* – протокатехоат-3,4-диоксигеназу; *catA2* и *catA* – пирокатехин-1,2-диоксигеназу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности метаболизма позволяют актинобактериям заселять экологические ниши, отличные от мест обитания псевдомонад, или развиваться в условиях, вынуждающих псевдомонад прекратить свой рост и перейти в состояние покоя или переживания неблагоприятных условий [58]. Кроме того, для родококков характерно большое количество путей периферического метаболизма [59]. Ферменты этих метаболических путей трансформируют изначально разнообразные по строению соединения в относительно небольшое количество ключевых промежуточных субстратов центрального метаболизма ароматических соединений, превращение которых приводит к формированию интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Так, у штамма *R. jostii* RHA1 в геноме размером 9,7 МБ выявлено 26 путей периферического метаболизма и 8 путей центрального катаболизма ароматических соединений [60]. Штаммы бактерий рода *Rhodococcus*, использованные в данной работе, были выделены из удаленных друг от друга территорий, значительно отличающихся экологическими условиями. Общей характеристикой этих штаммов является их способность использовать большое количество ароматических соединений в качестве источников углерода и энергии, в т.ч. нафталин, что позволяет предположить наличие в их геномах гомологичных генов.

Отсутствие деградативной активности по отношению к салицилату также является общей чертой этих штаммов.

Из литературных данных известно о нескольких штаммах бактерий рода *Rhodococcus*, не способных расти в присутствии салицилата. Так, штаммы P200 и P400 бактерий *R. rhodochrous* NCIMB 13064, утилизирующие нафталин, практически не были способны расти в минеральной среде с салицилатом в концентрации 1,0–10,0 мМ, и данное соединение не детектировалось в культуральной жидкости [61].

Салицилат в концентрациях 0,01; 0,1 и 0,5% не поддерживал рост штамма *R. opacus* M213, деструктора нафталина [58]. Рост на нафталине также не сопровождался индукцией салицилатгидроксилазы у данного штамма [31]. Авторы предположили, что путь деградации нафталина не включает салицилат в качестве интермедиата. Другие потенциальные метаболиты пути деградации нафталина, такие как гентизат, карбоксибензальдегид, *o*-фталат, гидроксифталат и протокатехоат, являлись ростовыми субстратами для штамма M213 [58]. В качестве интермедиатов деградации нафталина у этого штамма авторами были обнаружены салициловый альдегид и салицилат (кроме пробы в нулевой момент), а также метаболиты *o*-фталатного пути: коричная кислота, 2-карбокси- и 2-гидроксикоричные кислоты, кумарин, гидрокумарин и фталевый альдегид. Исследуемый штамм *R. opacus* 3D так-

же рос в минеральной среде с кумарином, гентизатом, *o*-фталатом, 2-гидроксикоричной кислотой и протокатехоатом (табл. 1), что свидетельствует о наличии гомологичных ферментов и путей деструкции ароматических соединений у штаммов *R. opacus* 3D и M213. Из литературных и полученных нами данных по идентификации метаболитов методом масс-спектрометрии можно заключить, что у штаммов *R. opacus* 3D и M213 путь деградации нафталина включает образование в качестве интермедиатов 2-карбокси-, 2-гидроксикоричных, *o*-фталевой кислот и кумарина (табл. 5).

Низкая активность ферментов 1СГ, ПК-1,2-ДО, ПК-2,3-ДО и ГДО, отвечающих за деструкцию нафталина, в бесклеточном экстракте штамма *R. opacus* 3D также дает основание предположить, что деградация нафталина у исследуемого штамма не включает образование салицилата.

В противоположность родококку у *P. chlororaphis* OV17(pOV17) активности 1СГ, ПК-1,2-ДО и ПК-2,3-ДО в клетках, выращенных в присутствии нафталина и салицилата, превосходили активности этих ферментов в клетках, выращенных в присутствии глутамата, что указывает на их индуцибельный синтез при деструкции нафталина (табл. 4).

Анализ литературных данных показал, что в бесклеточном экстракте штаммов P200 и P400 бактерий *R. rhodochrous* NCIMB 13064, выращенных в минеральной среде с нафталином, определялась активность нафталиндиоксигеназы и нафталин-цис-диолдегидрогеназы, а также низкая активность пирокатехин-1,2- и -2,3-диоксигеназ [61]. Причем в одном из штаммов, P400, активность ПК-1,2-ДО была сравнима с активностью этого фермента в клетках, выращенных в минеральной среде с пируватом. Активности 1СГ и ГДО обнаружены не были. Авторы предположили, что ПК-1,2-ДО, в отличие от ПК-2,3-ДО, может не участвовать в деградации нафталина у штамма *R. rhodochrous* [61].

В отличие от штаммов *R. opacus* 3D, *R. opacus* M213 и *R. rhodochrous* P200 и P400, штамм *R. ruber* OA1, выделенный из очистных сооружений фармакологического предприятия, способен утилизировать не только нафталин, но и салицилат в качестве единственных ростовых источников [48]. Проведенные исследования показали, что *o*-фталевая и салициловая кислоты были интермедиатами разложения нафталина. Эти вещества обнаруживались на 6-й день культивирования клеток с нафталином, далее их количество снижалось к 16-м суткам. Определение активности ферментов в бесклеточном экстракте показало, что у *R. ruber* OA1, выращенного в

минеральной среде с нафталином, присутствовали активности протокатехоат-3,4-диоксигеназы, гентизат-1,2-диоксигеназы и ПК-1,2-ДО. Активность ПК-2,3-ДО отсутствовала. На основании полученных результатов авторы сделали вывод, что важную роль в разложении нафталина *R. ruber* OA1 играет путь превращения протокатехоата [48]. Авторы провели гетерологичную экспрессию генов катаболизма протокатехоата. Однако в статье не представлено однозначных доказательств того, что путь деградации нафталина данным штаммом включает образование протокатехоата как одного из интермедиатов, т.к. ПКК, в отличие от *o*-фталевой и салициловой кислот, не была идентифицирована. Несмотря на то что активность ПКК-3,4-ДО в клетках, выращенных в минеральной среде с нафталином, была относительно велика (0,127 мкмоль/мин на 1 мг белка), данные по уровню активности этого фермента в неиндуцированных клетках отсутствуют, что не дает возможности сравнить уровень активности фермента в индуцированных и неиндуцированных клетках [48].

Таким образом, анализ литературы позволяет сделать заключение, что на данный момент описано только три штамма бактерий рода *Rhodococcus*, не способных разлагать салицилат при наличии фенотипа Nah⁺. Это два производных штамма *R. rhodochrous* NCIMB 13064 [61] и штамм *R. opacus* M213 [58]. Описанный в данной работе штамм *R. opacus* 3D близок к сравниваемым штаммам по фенотипическим характеристикам. Особенностью штамма *R. opacus* 3D, отличающей его от всех описанных ранее штаммов, является его реакция на салицилат при культивировании как с нафталином, так и с этим субстратом. Штамм *R. opacus* 3D способен к образованию салицилата из нафталина. Однако клетки трансформируют его в ассоциат, состоящий из двух молекул салициловой кислоты, вероятно, для предотвращения аккумуляции этого соединения в среде. Данная реакция в абиотических условиях не происходит. Этот факт говорит в пользу микробной трансформации мономера салицилата в димер. Возможное объяснение этого процесса – перевод салицилата в форму, которая не позволяет данному соединению конкурировать за активный центр ферментов, участвующих в превращении нафталина по пути образования *o*-фталевой кислоты, с их целевыми субстратами. Однако это предположение требует проверки.

На сходство метаболических активностей у родококков указывают и данные ПЦР-анализа. Разрыв кольца является важной стадией в аэробной деградации ароматических соединений,

в т.ч. пирокатехинов и их производных. Разрыв кольца катализируется ферментами, которые делятся на два класса: интрадиольные диоксигеназы (типичный представитель – пирокатехин-1,2-диоксигеназа) и экстрадиольные диоксигеназы (типичный представитель – пирокатехин-2,3-диоксигеназа). В литературе они рассматриваются как ключевые ферменты деградации нафталина. Согласно классификации, основанной на анализе нуклеотидных последовательностей, гены экстрадиольных диоксигеназ можно разделить на два типа: тип I (семейства *edoA*, *edoB*, *edoC*) и тип II (*edoD*) [47]. Для многих штаммов родококков описаны случаи наличия генов семейства *edo* в разных сочетаниях. Известны штаммы, у которых присутствуют все четыре типа ПК-2,3-ДО. У изучаемого штамма *R. opacus* 3D обнаружены ПК-2,3-ДО только двух типов.

ПЦР-продукт для гена фталат-3,4-диоксигеназы не был обнаружен ни у одного из исследуемых в данной работе штаммов-деструкторов нафталина. Одна из возможных причин этого состоит в высокой специфичности праймеров, использованных в работе. Первоначально нами были использованы праймеры, разработанные для штамма *Rhodococcus* sp. DK17, которые не позволили получить ПЦР-продукт ожидаемого размера. Использование новой пары праймеров, специально синтезированных в ходе выполнения данной работы, для гена фталат-3,4-диоксигеназы также не позволило получить ожидаемого ампликона. Эта пара праймеров была разработана на основе ограниченного числа последовательностей, извлеченных из базы данных для представителей разных видов рода *Rhodococcus*. Предполагается, что для детекции этого гена необходимы праймеры, обладающие высокой видовой специфичностью. Как показано в работе Anastasi et al. [62], родококки можно разделить на пять филогенетически отдельных групп на основании полногеномного секвенирования. Штаммы, принадлежащие к виду *R. opacus*, образуют отдельную группу. Отсутствие в базе данных достаточного количества последовательностей гена фталат-3,4-диоксигеназы для штаммов этой группы не позволило корректно подобрать праймеры. Тем не менее способность использовать соль *o*-фталевой кислоты в качестве единственного ростового субстрата и динамика метаболитов указывают на то, что путь деструкции нафталина штаммом *R. opacus* 3D включает образование этого соединения, и гены для его трансформации должны присутствовать в геноме.

Полученные данные позволяют выдвинуть еще одно предположение, касающееся особенностей метаболизма *o*-фталата и нафталина ро-

дококками. Для штамма *R. ruber* OA1, утилизирующего и нафталин, и салицилат, было предположено, что путь превращения нафталина включает образование фталата и протокатехоата [48]. *o*-Фталат был идентифицирован в культуральной жидкости, протокатехоат обнаружен не был. Потенциально образование протокатехоата подтверждается высоким уровнем активности ПКК-3,4-ДО. Штаммы *R. rhodochrous* NCIMB 13064 [61] и *R. opacus* M213 [58] не способны утилизировать салицилат, но разлагают нафталин. Путь деградации нафталина штаммом *R. opacus* M213 включает образование *o*-фталата. Но и в этом случае ПКК не была определена в культуральной жидкости. Путь деградации нафталина, включающий формирование *o*-фталата и протокатехоата, а не пар «салицилат–гентизат» или «салицилат–пирокатехин», был показан для двух грамположительных бактерий *Bacillus thermoleovorans* Hamburg 2 и *Geobacillus* sp. G27 [63, 64]. *o*-Фталат и ПКК были определены как интермедиаты нового пути разложения антрацена штаммом *Mycobacterium* sp. LB501T [65]. Отсутствие продукта амплификации гена фталат-3,4-диоксигеназы и протокатехоата в культуральной жидкости наряду с низкой активностью ПКК-3,4-ДО в выращенной в присутствии нафталина биомассе штамма *R. opacus* 3D указывают на то, что путь деградации нафталина у данного штамма на этапе трансформации фталата отличается от описанных в литературе вариантов. Определение интермедиатов этого пути является целью дальнейших исследований.

Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что для бактерий рода *Rhodococcus* разложение нафталина через салицилат является менее характерным, чем по пути образования *o*-фталата, кумарина и коричневых кислот. Однако чрезвычайно ограниченная информация о путях деструкции нафталина родококками не является основанием для вывода о том, какой путь преобладает, и данный вопрос также требует дальнейшего детального изучения.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00964).

Благодарности. Авторы искренне благодарят к.б.н. М.И. Чернявскую (Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь) за предоставление штамма *R. pyridinivorans* 5Ap (L5A-BSU) и д.б.н. Е.Г. Плотникову (Институт экологии и генетики микроор-

ганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия) за предоставление штамма *R. wratislaviensis* G10.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Juhász, A.L., and Naidu, R. (2000) Bioremediation of high molecular weight PAHs: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **45**, 57–88, doi: 10.1016/S0964-8305(00)00052-4.
- Fonger, G.C., Hakkinen, P., Jordan, S., and Publicker, S. (2014) The National Library of Medicine's (NLM) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): background, recent enhancements and future plans, *Toxicology*, **325**, 209–216, doi: 10.1016/j.tox.2014.09.003.
- Davies, J.I., and Evans, W.C. (1964) Oxidative metabolism of naphthalene nucleus by soil pseudomonads – ring fission mechanism, *Biochem. J.*, **91**, 251–261, doi: 10.1042/bj0910251.
- Jeffrey, A.M., Yeh, H.J., Jerina, D.M., Patel, T.R., Davey, J.F., and Gibson, D.T. (1975) Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*, *Biochemistry*, **14**, 575–584, doi: 10.1021/bi00674a018.
- Patel, T.R., and Barnsley, E.A. (1980) Naphthalene metabolism by pseudomonads: purification and properties of 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase, *J. Bacteriol.*, **143**, 668–673.
- Assinder, S.J., and Williams, P.A. (1988) Comparison of the meta pathway operons on NAH plasmid pWW60-22 and TOL plasmid pWW53-4 and its evolutionary significance, *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 2769–2778, doi: 10.1099/00221287-134-10-2769.
- Rossello-Mora, R.A., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. (1994) Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 966–972.
- Tay, M., Roizman, D., Cohen, Y., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Yang, L. (2014) Draft genome sequence of the model naphthalene-utilizing organism *Pseudomonas putida* OUS82, *Genome Announc.*, **2**, e01161-13, doi: 10.1128/genomeA.01161-13.
- Yen, K.M., and Serdar, C.M. (1988) Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads, *Crit. Rev. Microbiol.*, **15**, 247–268.
- Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. (1997) Плазмиды биодegradации нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas*, *Микробиология*, **66**, 211–216.
- Sevastyanovich, Y.R., Krasowiak, R., Bingle, L.E.H., Haines, A.S., Sokolov, S.L., Kosheleva, I.A., Leuchuk, A.A., Titok, M.A., Smalla, K., and Thomas, C.M. (2008) Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*, *Microbiology*, **154**, 2929–2941, doi: 10.1099/mic.0.2008/017939-0.
- Kiyohara, H., Torigoe, S., Kaida, N., Asaki, T., Iida, T., Hayashi, H., and Takizawa, N. (1994) Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82, *J. Bacteriol.*, **176**, 2439–2443, doi: 10.1128/jb.176.8.2439-2443.1994.
- Meyer, S., Moser, R., Neef, A., Stahl, U., and Kampfer, P. (1999) Differential detection of key enzymes of polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes, *Microbiology*, **145**, 1731–1741, doi: 10.1099/13500872-145-7-1731.
- Moser, R., and Stahl, U. (2001) Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 609–618, doi: 10.1007/s002530000489.
- Kauppi, B., Lee, K., Carredano, E., Parales, R.E., and Gibson, D.T. (1998) Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase, *Structure*, **6**, 571–586, doi: 10.1016/s0969-2126(98)00059-8.
- Parales, R.E., Parales, J.V., and Gibson, D.T. (1999) Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity, *J. Bacteriol.*, **181**, 1831–1837.
- Bosch, R., Moore, E.R., Garcia-Valdes, E., and Pieper, D.H. (1999) NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10, *J. Bacteriol.*, **181**, 2315–2322.
- Eaton, R.W., and Chapman, P.J. (1992) Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions, *J. Bacteriol.*, **174**, 7542–7554, doi: 10.1128/jb.174.23.7542-7554.1992.
- Fuenmayor, S.L., Wild, M., Boyes, A.L., and Williams, P.A. (1998) A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2, *J. Bacteriol.*, **180**, 2522–2530.
- Hickey, W.J., Sabat, G., Yuroff, A.S., Arment, A.R., and Perez-Lesher, J. (2001) Cloning, nucleotide sequencing, and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4603–4609, doi: 10.1128/aem.67.10.4603-4609.2001.
- Lee, J., Min, K.R., Kim, Y.C., Kim, C.K., Lim, J.Y., Yoon, H., Min, K.H., Lee, K.S., and Kim, Y. (1995) Cloning of salicylate hydroxylase gene and catechol 2,3-dioxygenase gene and sequencing of an intergenic sequence between the two genes of *Pseudomonas putida* KF715, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 382–388, doi: 10.1006/bbrc.1995.1825.
- Feng, Y., Khoo, H.E., and Poh, C.L. (1999) Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9869, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 946–950.
- Chua, C.H., Feng, Y., Yeo, C.C., Khoo, H.E., and Poh, C.L. (2001) Identification of amino acid residues essential for catalytic activity of gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867, *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**, 141–146, doi: 10.1007/s10529-007-9421-7.
- Zhou, N.Y., Fuenmayor, S.L., and Williams, P.A. (2001) *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism, *J. Bacteriol.*, **183**, 700–708, doi: 10.1128/JB.183.2.700-708.2001.
- Goetz, F.E., and Harmuth, L.J. (1992) Gentisate pathway in *Salmonella typhimurium*: metabolism of *m*-hydroxybenzoate and gentisate, *FEMS Microbiol. Lett.*, **76**, 45–49, doi: 10.1016/0378-1097(92)90361-q.
- Civilini, M., de Bertoldi, M., and Tell, G. (1999) Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene, *Lett. Appl. Microbiol.*, **29**, 181–186, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00613.x.
- Старовойтов И.И., Нефедова М.Ю., Яковлев Г.И., Зякун А.М., Адагин В.М. (1975) Гентизиновая кислота –

- продукт микробного окисления нафталина, *Известия АН СССР Сер. хим.*, **9**, 2091–2092.
28. Monticello, D.J., Bakker, D., Schell, M., and Finnerty, W.R. (1985) Plasmid-borne TnS insertion mutations resulting in accumulation of gentisate from salicylate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 761–764.
 29. Fu, W., and Oriel, P. (1998) Gentisate 1,2-dioxygenase from *Haloferax* sp. D1227, *Extremophiles*, **2**, 439–446, doi: 10.1007/s007920050090.
 30. Werwath, J., Arfmann, H.A., Pieper, D.H., Timmis, K.N., and Wittich, R.M. (1998) Biochemical and genetic characterization of a gentisate 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5, *J. Bacteriol.*, **180**, 4171–4176.
 31. Uz, I., Duan, Y.P., and Ogram, A. (2000) Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213, *FEMS Microbiol. Lett.*, **185**, 231–238, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09067.x.
 32. Auffret, M., Labbe, D., Thouand, G., Greer, C.W., and Fayolle-Guichard, F. (2009) Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7774–7782, doi: 10.1128/AEM.01117-09.
 33. Larkin, M.J., Kulakov, L.A., and Allen, C.C. (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 282–290, doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.007.
 34. Dong, L., Nakashima, N., Tamura, N., and Tamura, T. (2004) Isolation and characterization of the *Rhodococcus opacus* thioestrepton-inducible genes *tipAL* and *tipAS*: application for recombinant protein expression in *Rhodococcus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **237**, 35–40, doi: 10.1016/j.femsl.2004.06.012.
 35. Kulakov, L.A., Chen, S., Allen, C.C., and Larkin, M.J. (2005) Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1754–1764, doi: 10.1007/978-3-642-12937-7_3.
 36. Grund, E., Denecke, B., and Eichenlaub, R. (1992) Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1874–1877.
 37. Allen, C., Boyd, D., and Larkin, M. (1997) Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 151–155.
 38. Larkin, M.J., and Day, M.J. (1986) The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* spp. (NCBI12042 and 12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB12038) from garden soil, *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 233–242, doi: 10.1111/j.1365-2672.1986.tb01078.x.
 39. Горлатов С.Н., Мальцева О.В., Шевченко В.Л., Головлева Л.А. (1989) Разложение хлорфенолов культурой *Rhodococcus erythropolis*, *Микробиология*, **58**, 802–806.
 40. Чернявская М.И. (2016) Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus*, *Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*, **11**, 190–197.
 41. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. (2006) Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья, *Экология*, **4**, 261–268.
 42. Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. (2018) Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний периоды, *Микробиология*, **87**, 204–214.
 43. Anokhina, T.O., Volkova, O.V., Puntus, I.F., Filonov, A.E., Kochetkov, V.V., and Boronin, A.M. (2006) Plant growth-promoting *Pseudomonas* bearing catabolic plasmids: naphthalene degradation and effect on plants, *Process Biochemistry*, **41**, 2417–2423, doi: 10.1016/j.procbio.2006.06.026.
 44. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, in: *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* (Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds), John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115–175.
 45. Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., and Megharaj, M. (2019) Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP, *Sci. Total Environ.*, **651**, 813–821, doi: 10.1007/978-3-030-24035-6_3.
 46. Choi, K.Y., Kim, D., Sul, W.J., Chae, J.C., Zylstra, G.J., Kim, Y.M., and Kim, E. (2005) Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17, *FEMS Microbiol. Lett.*, **252**, 207–213, doi: 10.1016/j.femsl.2005.08.045.
 47. Kulakov, L.A., Delcroix, V.A., Larkin, M.J., Ksenzenko, V.N., and Kulakova, A.N. (1998) Cloning of new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains, *Microbiology*, **144**, 955–963, doi: 10.1099/00221287-144-4-955.
 48. Li, C., Zhang, C., Song, G., Liu, H., Sheng, G., Ding, Z., Wang, Z., Sun, Y., Xu, Y., and Chen, J. (2016) Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster in *Rhodococcus ruber* OAI involved in naphthalene degradation, *Ann. Microbiol.*, **66**, 469–478, doi: 10.1007/s13213-015-1132-z.
 49. Соляникова И.П., Борзова О.В., Емельянова Е.В., Шумкова Е.С., Присяжная Н.В., Плотникова Е.Г., Головлева Л.А. (2016) Диоксигеназы, индуцирующиеся при разложении бензоата деструкторами хлорбифенилов *Rhodococcus wratislaviensis* G10 и хлорфенолов *Rhodococcus opacus* 1CP, и гены, потенциально вовлеченные в этот процесс, *Биохимия*, **81**, 1239–1253.
 50. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680, doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
 51. Dua, R.D., and Meera, S. (1981) Purification and characterization of naphthalene oxygenase from *Corynebacterium renale*, *Eur. J. Biochem.*, **120**, 461–465, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05724.x.
 52. Shamsuzzaman, K.M., and Barnsley, E.A. (1974) The regulation of naphthalene oxygenase in pseudomonads, *J. Gen. Microbiol.*, **83**, 165–170, doi: 10.1099/00221287-83-1-165.
 53. Hegeman, G.D. (1966) Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type, *J. Bacteriol.*, **91**, 1140–1154.
 54. Crawford, R.L., Hutton, S.W., and Chapman, P.J. (1975) Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*, *J. Bacteriol.*, **121**, 794–799.
 55. Fujisawa, H., and Hayaishi, O. (1968) Protocatechuate 3,4-dioxygenase. I. Crystallization and characterization, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2673–2681.
 56. Schlomann, M., Schmidt, E., and Knackmuss, H.J. (1990) Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria, *J. Bacteriol.*, **172**, 5112–5118, doi: 10.1128/jb.172.9.5112-5118.1990.
 57. Кулакова А.Н. (1988) *Природа генетического контроля катаболизма нафталина и салициловой кислоты у штамма Pseudomonas putida BSA202*. Дис. канд. биол. наук, ИБФМ, Пушино.

58. Pathak, A., Chauhan, A., Blom, J., Indest, K.J., Jung, C.M., Stothard, P., Bera, G., Green, S.J., and Ogram, A. (2016) Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* strain M213 particularly for naphthalene degradation, *PLoS One*, **11**, e0161032, doi: 10.1371/journal.pone.0161032.
59. Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J., and Kren, V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environ. Int.*, **35**, 162–177, doi: 10.1016/j.envint.2008.07.018.
60. McLeod, M.P., Warren, R.L., Hsiao, W.W., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A.L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R.D., Yang, G., Stott, J.M., Schein, J.E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A.S., Marra, M.A., Jones, S.J., Holt, R., Brinkman, F.S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J.E., Mohn, W.W., and Eltis, L.D. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15582–15587, doi: 10.1073/pnas.0607048103.
61. Kulakova, A.N., Reid, K.A., Larkin, M.J., Allen, C.C., and Kulakov, L.A. (1996) Isolation of *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 derivatives with new biodegradative abilities, *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 227–231, doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08582.x.
62. Anastasi, E., MacArthur, I., Scortti, M., Alvarez, S., Giguere, S., and Vazquez-Boland, J.A. (2016) Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 3140–3148, doi: 10.1007/s00203-019-01695-z.
63. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., and Michaelis, W. (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 518–523, doi: 10.1128/aem.66.2.518-523.2000.
64. Bubinas, A., Giedraityte, G., Kalediene, L., Nivinskiene, O., and Butkiene, R. (2008) Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway through protocatechuic acid, *Cent. Eur. J. Biol.*, **3**, 61–68, doi: 10.2478/s11535-007-0042-x.
65. Van Herwijnen, R., Springael, D., Slot, P., Govers, H.A., and Parsons, J.A. (2003) Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through *o*-phthalic acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 186–190, doi: 10.1128/aem.69.1.186-190.2003.

ALTERNATIVE NAPHTHALENE METABOLIC PATHWAY INCLUDES FORMATION OF *ortho*-PHTHALIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES IN THE *Rhodococcus opacus* STRAIN 3D

T. O. Anokhina, T. Z. Esikova, A. B. Gafarov,
V. N. Polivtseva, B. P. Baskunov, and I. P. Solyanikova*

Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research” of the Russian Academy of Sciences, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia;
E-mail: innas@IBPM.Pushchino.ru

Received November 1, 2019

Revised December 6, 2019

Accepted December 6, 2019

Naphthalene, as a component of crude oil, is a common environmental pollutant. Biochemical and genetic aspects of naphthalene catabolism have been examined in most detail in the bacteria of *Pseudomonas* genus. In pseudomonads, the key intermediate in naphthalene degradation is salicylate. In this study, we investigated the ability of *Rhodococcus opacus* strain 3D to utilize naphthalene as a sole carbon and energy source. The characteristic feature of this strain is the inability to grow in the mineral medium supplemented with salicylate (typical intermediate of naphthalene degradation in Gram-negative bacteria). The absence of salicylate hydroxylase activity and salicylate accumulation in the mineral medium in the course of *R. opacus* 3D cultivation indicated existence of an alternative pathway of naphthalene oxidation. At the same time, *R. opacus* 3D was able to use monoaromatic compounds (salts of gentisic, *ortho*-phthalic, and 2-hydroxycinnamic acids and coumarin) as growth substrates. Based on the analysis of enzymatic activities, identification of the reaction intermediates, genetic determinants, and growth substrates, we concluded that *R. opacus* 3D carries out naphthalene degradation through an alternative pathway via formation of *ortho*-phthalic acid, which is untypical for pseudomonads. Using mass spectrometry, we showed for the first time that salicylic acid associate formed in trace amounts in the process of naphthalene degradation is not further metabolized and accumulated in the growth medium in a form of dimer.

Keywords: *Rhodococcus opacus*, naphthalene, salicylic acid, *ortho*-phthalic acid, 2-hydroxycinnamic acid, biodegradation genes, enzymatic activity