

ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ C<sub>1</sub>-МЕТАБОЛИЗМА НОВОГО  
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ФАКУЛЬТАТИВНОГО МЕТИЛОТРОФА  
*RHODOCOCCLUS WRATISLAVIENSIS*© 2019 г. Е. Н. Капарулли<sup>а</sup> \*, Ю. А. Троценко<sup>а</sup>, Н. В. Доронина<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пущино, Россия

\*e-mail: lenokap80@gmail.com

Поступила в редакцию 24.04.2018 г.

После доработки 10.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Из прибрежной зоны Азовского моря выделен факультативно метилотрофный штамм 2AzMo (ВКМ Ас-2782). Изолят представлен аэробными грамположительными неподвижными палочками. Оптимально растет при 1% NaCl, 28°C и pH 7.5 с 1% CH<sub>3</sub>OH или 0.3% метиламина в качестве источников углерода и энергии. Использует также широкий спектр полиуглеродных субстратов. Секвенирование гена 16S рРНК штамма 2AzMo выявило сходство с представителями рода *Rhodococcus*: 99.9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> (=NCIMB 13082<sup>T</sup>), 99.4% с *R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup> (=RKJ300<sup>T</sup>) и 99.2% с *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup> (=DNP505<sup>T</sup>). Уровень ДНК–ДНК гомологии штамма 2AzMo с *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> (=NCIMB 13082<sup>T</sup>) составил 76%, что указывает на его принадлежность к данному виду. Однако в отличие от нашего изолята, типовой штамм *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup>, а также другие родококки (*R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup>, *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup>, *R. opacus* IEGM 716<sup>T</sup>), не растут на метаноле и метиламине. Окисление метанола у *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo катализируется алкогольдегидрогеназой, использующей в качестве искусственного акцептора электронов 4-нитрозо-N,N-диметиланилин, тогда как метиламин окисляется метиламиндегидрогеназой и посредством системы ферментов N-метилглутаматного пути. Ассимиляция образующегося формальдегида осуществляется во фруктозобисфосфатальдозном варианте рибулозомонофосфатного пути C<sub>1</sub>-метаболизма. Аммоний ассимилируется восстановительным аминированием α-кетоглутарата и посредством глутаматного цикла.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus*, метилотроф, метаболизм, метанол, метиламин**DOI:** 10.1134/S0026365618060101

Наземные и морские экосистемы – источники метанола, метиламина и других C<sub>1</sub>-соединений, которые являются субстратами для специализированной группы аэробных метилотрофных бактерий (Троценко и соавт., 2010). Метанол – широко распространенное соединение, которое образуется в результате деметилирования пектина клеточных стенок при активном росте клеток растений и является основным летучим органическим метаболитом растений, поскольку его эмиссия в атмосферу составляет более 100 Тг/год (Федоров и соавт., 2011). Метанол выделяется при сжигании биомассы, деградации лигнина, в гидротермальных системах морского дна и при вулканической деятельности (Dorokhov et al., 2015). Кроме того, метанол образуется метанотрофными бактериями при окислении метана и является одним из метаболитов архей (Троценко, Хмеленина, 2008; Chistoserdova, Lidstrom, 2013; Chistoserdova, Kalyuzhnaya, 2018; Enzmann et al., 2018). Способностью к метилотрофии обладают не

только грамтрицательные, но и грамположительные прокариоты родов *Amicillatopsis*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*. Известно несколько путей окисления метанола. У большинства грамтрицательных бактерий ключевую роль в окислении метанола до формальдегида играют PQQ-кальций зависимые этанол/метанолдегидрогеназы (*MxaFI*) (Троценко и соавт., 2010). Однако недавно обнаружены метилотрофы, имеющие лантанидсодержащую метанолдегидрогеназу (*XoxF*) (Vu et al., 2016; Chu, Lidstrom, 2016). У грамположительных факультативных метилотрофов окисление метанола осуществляется либо НАД<sup>+</sup>-зависимой формой этого фермента (*Bacillus methanolicus* C1) (Dijkhuizen, Arfman, 1990, Hektor et al., 2002), либо метанол: 4-нитрозо-N,N-диметиланилин (НДМА) оксидоредуктазами (никопротеиновыми метанолдегидрогеназами), как у *Amicillatopsis methanolica*, *Mycobacterium gastri* MB19 (Van Ophem et al., 1993, Bystrykh et al., 1993). Известно, что у представителей рода *Rhodococcus*,

растущих на этаноле, также функционируют НАД(Ф)<sup>+</sup>- и НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы (Van Ophem et al., 1993; Schenkels, Duine, 2000), причем НДМА-зависимые ферменты родококков способны окислять как этанол, так и метанол (Пирог и соавт., 2008).

Среди широкого спектра С<sub>1</sub>-соединений биогенного и абиогенного происхождения можно выделить также метилированные амины – восстановленные формы органического азота, которые образуются в природе как побочные продукты разложения белков, аминокислот, некоторых алкалоидов, азотсодержащих пестицидов, присутствуют в растительных и животных тканях как естественные продукты азотного обмена. В морской среде метиламин высвобождается при деградации четвертичных аминов, таких как бетаин, карнитин, холин и N-оксид триметиламина, которые используются в качестве осмолитов многими морскими организмами (Nayak et al., 2015; Suleiman et al., 2016). Метиламин может использоваться путем прямого окисления до формальдегида с помощью метиламиндегидрогеназы – (МАДГ) или метиламинооксидазы – (МАО), или через опосредованные пути, включающие перенос метильных групп на аминокислоты (глутамат, аланин или их кетоаналоги) с последующим окислением соответствующих N-метилованных аминокислот. Этот двустадийный механизм получил название N-метилглутаматного (N-МГ) пути (Троценко и соавт., 2010).

Недавно из прибрежной зоны Азовского моря нами был выделен новый факультативный метилотроф, отнесенный к роду *Rhodococcus*. Метилотрофные представители рода *Rhodococcus* до сих пор были неизвестны, хотя родококки распространены повсеместно, и уже валидно описаны 63 вида (<http://www.bacterio.cict.fr/qf/rhodococcus.htm>). Детальное исследование путей метаболизма метанола и метиламина у нового метилотрофного родококка представляется актуальным.

Цель работы – таксономическая и метаболическая характеристика нового грамположительного факультативного метилотрофа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** Штамм 2AzMo (VKM Ac-2782) был выделен из песка прибрежной зоны Азовского моря (Крым, Россия) (45°27'25.1" с.ш., 36°27'59.7" в.д.). Навеску песка (5 г) помещали в колбу Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды “К” и 0.5% (об./об.) метанола. Среда “К” содержала (г/л): КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 2.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2.0; NaCl – 0.5; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.1; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.002; pH 7.4. Накопительную и чистую культуру получали, как описано ранее (Kararullina et al., 2017). Чистоту культуры проверяли световой микроскопией, а

также по однородности колоний на агаризованных средах “К” с метанолом и Лурия-Бертани. В качестве референтных использовали типовые культуры родококков (*R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> = NCIMB 13082<sup>T</sup>, *R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup> = RKJ300<sup>T</sup>, *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup> = DNP505<sup>T</sup>, *R. opacus* IEGM 716<sup>T</sup>), любезно предоставленные руководителем коллекции, академиком РАН И.Б. Ившиной (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН г. Пермь).

**Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств изолята.** Для изучения морфологии и подвижности клеток штамм 2AzMo выращивали на агаризованных средах “К” и Лурия-Бертани (2% агар “Difco”, США). Наличие оксидазы определяли, используя 1% (в./об.) раствор тетраметил-*p*-фенилендиамин дигидрохлорида. Активность каталазы выявляли, нанося 3%-ый раствор перекиси водорода на штрих культуры, выращенной на агаризованной среде.

Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуру в жидкой среде “К” с метанолом в герметично закрытых флаконах на качалке (120 об./мин) при температуре 4–43°C. Рост изолята при различных значениях концентрации метанола (0.1–7.0%, об./об.), солености (0–7% NaCl) и pH исследовали на среде “К”. Значения pH устанавливали добавлением 1 М NaOH и 5 н HCl, оптимальный pH определяли по удельной скорости роста штамма при исходных значениях pH 5.0–10.0 среды.

При изучении способности изолята использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии в минеральную среду вместо метанола вносили 0.05–0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали ночной культурой и инкубировали 14 сут на качалке при оптимальной температуре. Все летучие вещества вносили в количестве 0.5% по объему среды.

Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемого штамма использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; “Biomérieux”, Франция), следуя инструкции производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> и чувствительность к антибиотикам анализировали, как описано ранее (Kararullina et al., 2017). Образование индола из L-триптофана анализировали с реактивом Сальковского (Gordon, Weber, 1951). Калибровочную кривую строили со стандартными растворами индолилуксусной кислоты.

**Микроскопия.** Изучение морфологии и подвижности клеток в режиме фазового контраста проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия).

**Энзимологический анализ** проводили в бесклеточном экстракте, как описано ранее (Доронина и соавт., 2018). Активность никопротеиновой метанолдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-N,N-диметиланилина при 440 нм с метанолом в качестве донора электронов (Van Ophemel et al., 1993). Активность ферментов выражали в наномолях потребленного субстрата или образованного продукта за 1 мин в пересчете на 1 мг белка. Количественное определение белка проводили методом Лоури (Lowry et al., 1951).

**RAPD-анализ** (метод случайной амплификации полиморфной ДНК) проводили, используя праймеры OPQ1, OPQ6 (Balachandar et al., 2008).

**MALDI-TOF/MS анализ.** Для получения MALDI спектров бактериальных экстрактов использовали MALDI-TOF Autoflex Speed масс-спектрометр ("Bruker Daltonik GmbH", Германия), согласно ранее описанной методике (Horneffer et al., 2004).

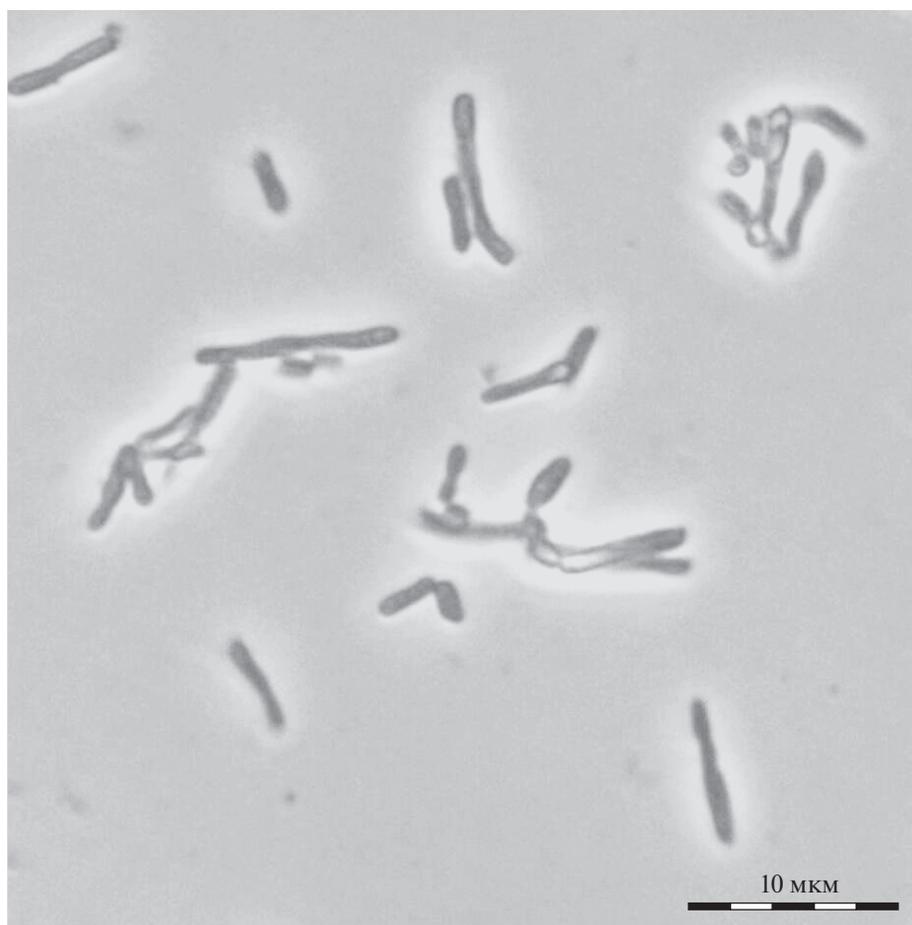
**Выделение и анализ ДНК.** ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали ПЦР, используя универсальные для прокариот праймеры 27f и 1492r (Lane, 1991). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ом агарозном геле. Выделение и очистку фрагментов ДНК из легкоплавкой агарозы проводили на колонках с использованием набора Zymoclean Gel DNA Recovery Kit ("Zymo Research", США), согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit ("Beckman Coulter", США) на анализаторе SEQ2000 XL ("Beckman Coulter", США). Определение Г + Ц состава ДНК и ДНК–ДНК гибридизацию проводили, как описано ранее (Doronina et al., 2013).

**Филогенетический анализ.** Предварительный анализ сходства последовательностей гена 16S рРНК проводили по базе данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [http://ncbi.nlm.nih.gov]. Для более точного определения филогенетического положения изолята нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Филогенетические деревья (филограммы) строили методом присоединения соседей ("neighbor-joining") (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью "bootstrap-анализа" 100 альтернативных филограмм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята.** Штамм 2AzMo представлен грамположительными, неподвижными прямыми или ветвящимися палочками (рис. 1). На агаризованной минеральной среде с метанолом колонии желто-коричневые (на среде Лурия-Бертани – кремовые), точечные, с выпуклым профилем, неровным краем и шероховатой поверхностью. Штамм 2AzMo рос в жидкой среде "К" с метанолом или Лурия-Бертани без агрегации клеток и образования пигмента. Строгий аэроб, каталазо- и оксидазоположительный, в витаминах не нуждается. Не рос в атмосфере H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, метана и дихлорметана. Рост наблюдался на средах с сахарозой, раффинозой, маннитом, аланином, цитратом, инозитом, фруктозой, мальтозой, глюкозой, ацетатом, фенилацетатом, цитратом, глутаматом, сукцинатом, глюконатом, лактозой, малатом, α-кетоглутаратом, пируватом, метиламином, диметиламином, метанолом, этанолом, диметилсульфоксидом, глицерином, формальдегидом, ацетоном, Tween 20, пропанолом, бензолом, гептаном, толуолом. Однако штамм 2AzMo не использовал серин, арабинозу, ксилозу, формиат, ацетамид и триметиламин. Исследуемый штамм не способен к нитратредукции. Не имел активностей лизин- и орнитиндекарбоксилазы, аргининдигидролазы, β-глюко- и β-галактозидазы. Не гидролизировал желатин, не образовывал сероводород и ацетоин. Уреазаположителен. Синтезировал 6 ± 1 мкг/мл индолпроизводных из L-триптофана. Рос в диапазоне температур 4–37°C и при pH 4.0–9.0, оптимально при 28°C и pH 7.5 в присутствии 0.5–1% метанола и 1% NaCl, но ингибировался 7% NaCl. Чувствителен к гентамицину, стрептомицину, линкомицину, неомицину, тетрациклину, новобиоцину, пенициллину, канамицину, хлорамфениколу, эритромицину и устойчив к оксациллину и налидиксовой кислоте.

**Генотипическая характеристика.** Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что исследуемый штамм 2AzMo имел наибольшее сходство с представителями рода *Rhodococcus*: 99.9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup>, 99.4% с *R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup> и 99.2% с *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup> (рис. 2). Поскольку выявлен высокий уровень сходства по 16S рРНК, для определения генотипических различий между штаммом 2AzMo и *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ). Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы имеют различные паттерны продуктов амплификации, однако результаты, полученные с использованием MALDI-TOF/MS, выявили идентичность белковых профилей. Наряду с этим,

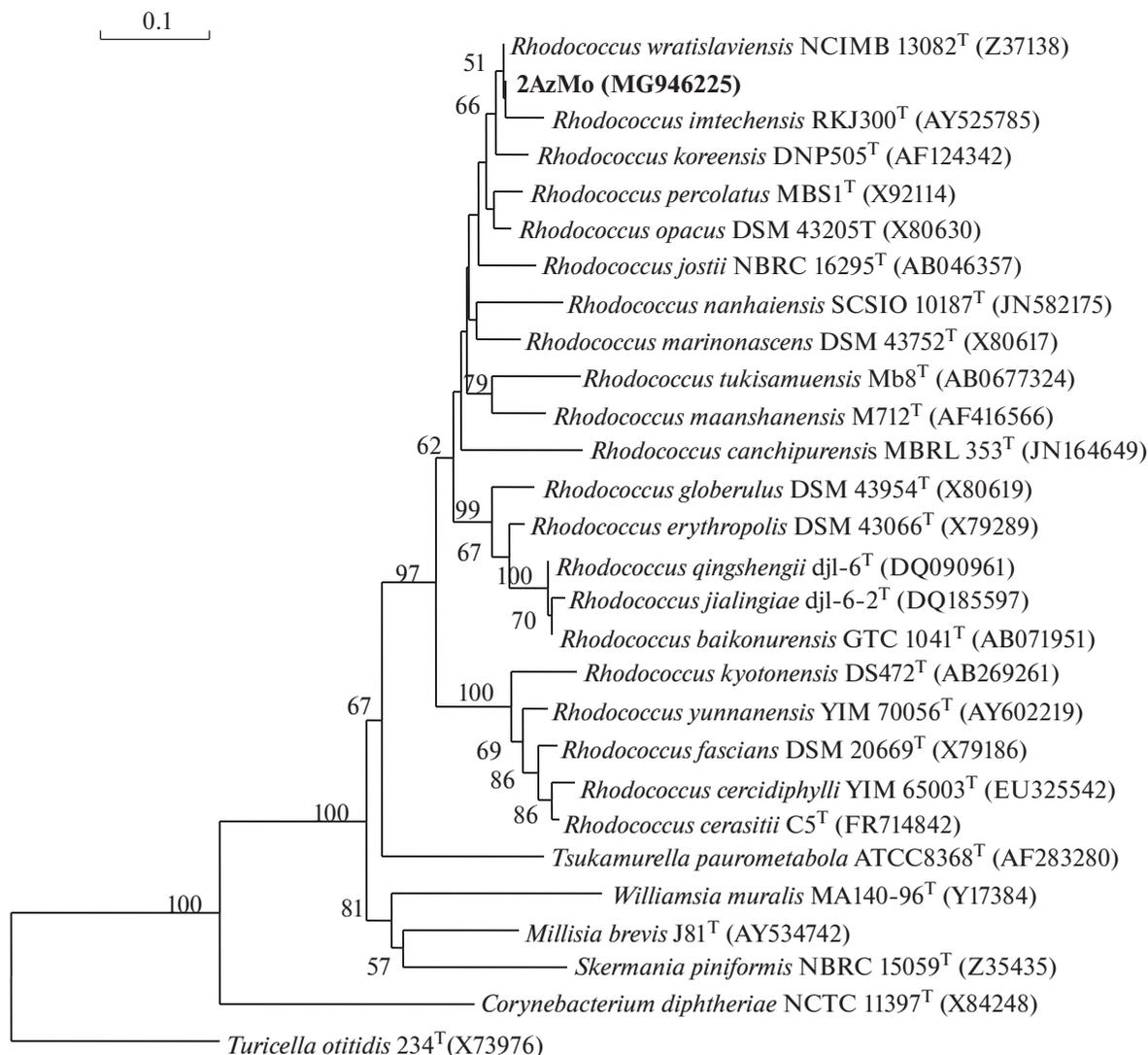


**Рис. 1.** Морфология клеток штамма 2AzMo, выращенного на метаноле. Фазовый контраст, длина масштабной метки 10 мкм.

ДНК-ДНК гомология между штаммом 2AzMo и *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> составила 76%, что дало основание отнести наш изолят к данному виду.

**Метаболическая характеристика.** Результаты энзимологического анализа путей первичного и промежуточного метаболизма клеток *R. wratislaviensis* 2AzMo, выращенных на метаноле, представлены в табл. 1. В экстрактах клеток не были обнаружены активности классической PQQ-зависимой и НАД<sup>+</sup>-зависимой метанолдегидрогеназ (МДГ). Вместе с тем выявлено, что исследуемый штамм окислял метанол до формальдегида НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназой, использующей в качестве искусственного акцептора электронов НДМА, что, по-видимому, является отличительной чертой этих ферментов у актинобактерий. Однако на основании анализа генома типовой штамм *R. wratislaviensis* NBRC 100605<sup>T</sup> (NZ\_BAWF01000000) установлено наличие в нем НДМА-зависимой МДГ (WP\_037244517). Нами показано, что *R. wratislaviensis* NBRC 100605<sup>T</sup>, *R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup>, *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup>,

*R. opacus* IEGM 716<sup>T</sup> не росли на метаноле и метиламине. По аминокислотным последовательностям НДМА-зависимая метанолдегидрогеназа *R. wratislaviensis* NBRC 100605<sup>T</sup> идентична более чем на 90% с таковым ферментом у представителей родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium* и только на 66% ферментом у *Amuocolatopsis methanolica* (AAF21473). У исследуемого нами штамма 2AzMo выявлены высокие активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом (ФМС). Энзимологический анализ показал, что в экстрактах клеток отсутствовали активности специфических ферментов серинового и рибулозо-бисфосфатного путей, хотя в геномах некоторых родококков обнаружены последовательности большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы. Исследуемый штамм реализовал рибулозомонофосфатный путь C<sub>1</sub>-метаболизма, о чем свидетельствовало наличие активности ключевого фермента этого пути – гексулозофосфатсинтазы (ГФС). Идентичность аминокислотных последовательностей ГФС типовой штамма



**Рис. 2.** Филограмма, показывающая положение штамма 2AzMo среди представителей рода *Rhodococcus* и близких родов актинобактерий, по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Корень определен включением последовательности *Turicella otitidis* 234<sup>T</sup> (X73976) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев.

*R. wratislaviensis* NBRC 100605<sup>T</sup> (WP\_037231807) составляла более 90% с таковыми у штаммов *R. opacus* (WP\_005242427.1), *R. jostii* (WP\_011600601), *R. koreensis* (WP\_072949731) и *Rh. erythropolis* (WP\_094617027). Штамм 2AzMo имел гексокиназу, активную с АТФ и ферменты окислительного пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы). Активность альдолазы 2-кето-3-деокси-6 фосфоглюконата (путь Энтнера–Дудорова) отсутствовала. Обнаружена активность альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата, следовательно, данный штамм реализовал фруктозобисфосфатальдозазный вариант РМФ-пути. Штамм 2AzMo ассимилировал аммоний восстановительным аминированием  $\alpha$ -кето-

глутарата и посредством функционирования ферментов глутаматного цикла.

Другим C<sub>1</sub>-соединением, играющим важную биосферную роль, является метиламин. Результаты энзимологического анализа активностей ферментов путей первичного метаболизма метиламина у исследуемого штамма, выращенного на метиламине, а также на метаноле, представлены в табл. 2. Показано, что *R. wratislaviensis* 2AzMo реализовал прямой путь окисления метиламина до формальдегида, поскольку у него имел ФМС-зависимую МАДГ, активность которой в 1.5 раза выше у клеток, выращенных на метиламине, чем на метаноле. Активность другого фермента — оксидазы метиламина — была крайне слабой, что, вероятно,

**Таблица 1.** Активности ферментов первичного и промежуточного метаболизма в экстрактах клеток штамма *R. wratislaviensis 2AzMo*, выращенного на метаноле

Фермент	Кофактор	Активность, нмоль/мин · мг белка*
Метанолдегидрогеназа	НДМА**	26
	ФМС***	0
	НАД <sup>+</sup>	0
Формальдегиддегидрогеназа	ФМС	25
	НАД <sup>+</sup>	20
Формиатдегидрогеназа	ФМС	57
	НАД <sup>+</sup>	11
Гидроксипируватредуктаза	НАДН	0
	НАДФН	0
Серин-глиоксилатаминотрансфераза	НАДН	0
	НАДФН	0
Гексулозофосфатсинтаза		112
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	НАД <sup>+</sup>	7
	НАДФ <sup>+</sup>	118
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	НАД <sup>+</sup>	3
	НАДФ <sup>+</sup>	103
2-Кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконатальдолаза		0
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза		10
Рибулозобисфосфаткарбоксилаза		0
Гексокиназа	АТФ	103
Изоцитратдегидрогеназа	НАД <sup>+</sup>	41
	НАДФ <sup>+</sup>	9
Глутаматдегидрогеназа	НАДН	0
	НАДФН	5
Глутаматсинтаза	НАДН	0
	НАДФН	19
Глутаминсинтетаза	АТФ, Мп <sup>2+</sup>	12

\* Средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала  $\pm 5\%$ ).

\*\* ФМС – феназинметосульфат.

\*\*\*НДМА – 4-нитрозо-N,N-диметиланилин.

исключает существенный вклад этого пути в окисление метиламина у исследуемого штамма. В геномах некоторых родококков нами выявлены аминдегидрогеназы, аминокислотные последовательности которых лишь на 30–42% идентичны МАДГ метилотрофных представителей родов *Methylophila* и *Methylobacterium*. Обнаружено, что активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы с этанолом в клетках, выращенных как на метаноле, так и на метиламине вдвое превышает активность фермента с метанолом (табл. 2). Активность другого фермента метаболизма метиламина, N-метилглутаматдегидрогеназы, катализирующей окислительный распад N-метилглу-

тамата до глутамата и формальдегида, была выше с ФМС, чем с НАД<sup>+</sup>. Также обнаружена активность N-метилглутаматоксидазы наиболее активной в клетках, выращенных на метиламине. У исследуемого штамма выявили активность  $\gamma$ -глутамилметиламидлиазы, которая катализирует превращение  $\gamma$ -глутамилметиламида до формальдегида и глутамата. Кроме того, обнаружили высокие активности  $\gamma$ -глутамилметиламидсинтазы (ГМАС) и N-метилглутаматсинтазы, что свидетельствовало о реализации N-метилглутаматного пути. Поиск гена ГМАС в геномах представителей рода *Rhodococcus* показал, что, скорее всего, этот фермент аннотирован как глутамат-

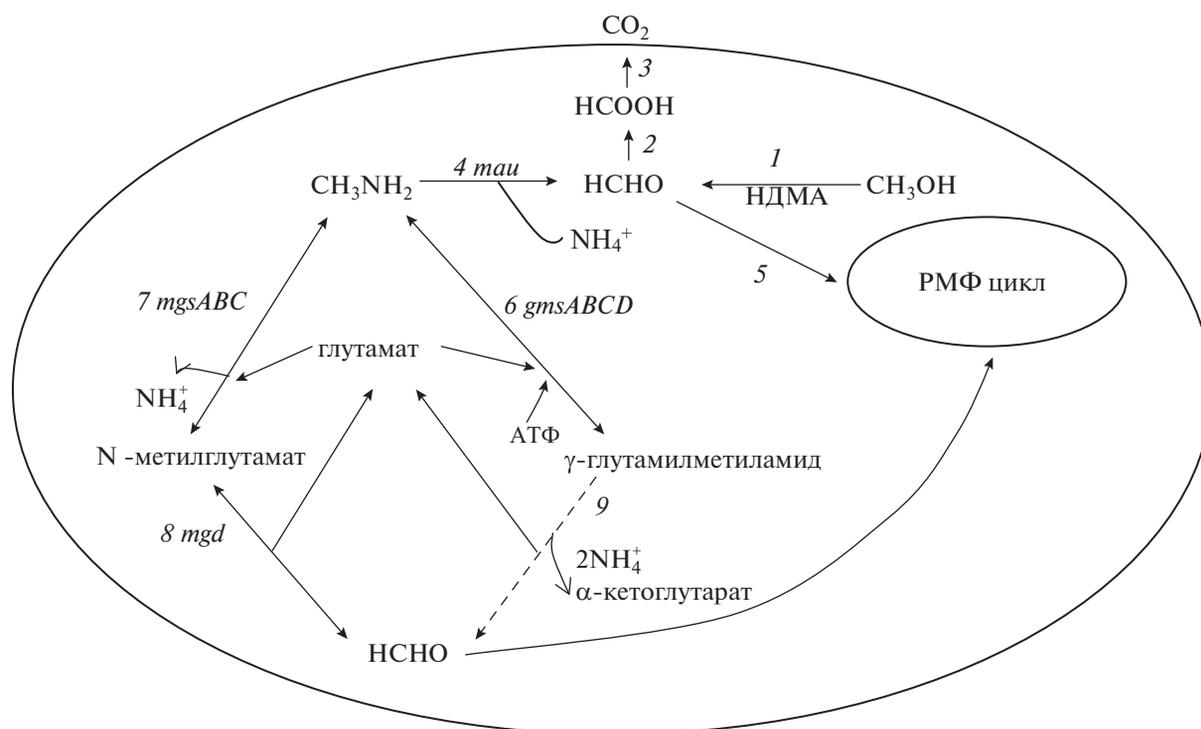
**Таблица 2.** Активности ферментов в экстрактах клеток штамма *R. wratislaviensis* 2AzMo, выращенного на метил-амине (1) или метаноле (2)

Фермент	Кофактор	Активность*, нмоль/мин·мг белка	
		1	2
Метиламиндегидрогеназа	ФМС	45	27
N-метилглутаматдегидрогеназа	ФМС	79	57
	НАД <sup>+</sup>	3	1
Никотинопротеин-метанол дегидрогеназа	НДМА	21	26
Никотинопротеин-этанол дегидрогеназа	НДМА	55	60
Метиламинооксидаза		5	1
N-метилглутаматоксидаза		37	11
γ-Глутамилметиламидлиаза	Mn <sup>2+</sup>	50	Н.о.
γ-Глутамилметиламидсинтетаза	АТФ, Mg <sup>2+</sup>	110	Н.о.
N-метилглутаматсинтаза	НАД <sup>+</sup>	321	Н.о.

\* Средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала ± 5%). Н.о. – не определяли.

аммоний лигаза III типа и имеет 43–45% идентичности по белку ГМАС с представителями рода *Methylobacterium*. В геноме *R. jostii* RHA1 обнаружены ферменты ассимиляции триметиламина и

диметиламина, а также N-метилглутаматсинтаза, однако непонятно, каким образом может происходить дальнейшее превращение N-метилглутамата у данного штамма. На основании результатов на-



**Рис. 3.** Схема окисления метанола и метиламина у *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo. 1 – НДМА метанолдегидрогеназа; 2 – формальдегиддегидрогеназа; 3 – формиатдегидрогеназа; 4 – моноаминооксидаза или метиламиндегидрогеназа; 5 – гексулозофосфатсинтаза; 6 – γ-глутамилметиламидсинтетаза; 7 – N-метилглутаматсинтаза; 8 – N-метилглутаматдегидрогеназа; 9 – γ-глутамилметиламидлиаза.

ших исследований представлена схема метаболизма метанола и метиламина у *R. wratislaviensis* 2AzMo (рис. 3).

Таким образом, нами впервые представлено доказательство способности родококков к метилотрофии. Исследованные пути метаболизма метанола и метиламина у метилотрофного представителя рода *Rhodococcus* позволяют раскрыть важную биосферную роль этого микроорганизма и его перспективность в будущем для применения в различных биотехнологиях, в том числе для создания биофильтров и биосенсоров для разложения и детекции поллютантов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Троценко Ю.А. *Paracoccus simplex* sp. nov. – новый факультативный метилотроф, использующий метиламин // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. (в печати).
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Chemodurova A.A., Trotsenko Yu.A. *Paracoccus simplex* sp. nov. – a new facultative methylotroph, utilizing methylamine // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. (In press).
- Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C<sub>2</sub>-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 749–757.
- Pirog T.P., Korzh Yu.V., Shevchuk T.A., Tarasenko D.A. Peculiarities of C<sub>2</sub> metabolism and intensification of the synthesis of surface-active substances in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 grown in ethanol // Microbiology (Moscow). 2008. T. 77. C. 665–673.
- Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы. Отв. ред.: Гальченко В.Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. 205 с.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М. Л. Аэробные метилобактерии. Отв. ред. Гальченко В.Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных метилобактерий: новые факты и гипотезы // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 435–446.
- Fedorov D.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Phytosymbiosis of aerobic methylbacteria: New facts and views // Microbiology (Moscow). 2011. T. 80. C. 443–454.
- Balachandar D., Raja P., Sundaram S.P. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants // Braz. J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 68–73.
- Bystrykh L.V., Vonck J., Van Bruggen E.F., van Beeumen J, Samyn B., Govorukhina N.I., Arfman N., Duine J.A., Dijkhuizen L. Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol: N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19 // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 1814–1822.
- Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 267–285.
- Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M.G. Current Trends in Methylotrophy // Trends Microbiol. 2018. pii: S0966-842X(18)30023-4. doi 10.1016/j.tim.2018.01.011
- Chu F., Lidstrom M.E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1317–1325.
- Dijkhuizen L., Arfman N. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* sp. // Microbial growth on C<sub>1</sub>-compounds / Eds. Andreesen J.R., Bowien B. FEMS Microbiol. Rev. 1990. V. 87. P. 215–219.
- Dorokhov Y.L., Shindyapina A.V., Sheshukova E.V., Komarova T.V. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 603–644.
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A. *Methylomicrobium musalis* sp. nov., an aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1847–1852.
- Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications // AMB Express. 2018. V. 8. P. 1–22.
- Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.
- Hektor H.J., Kloosterman H, Dijkhuizen L. Identification of a magnesium-dependent NAD(P)(H)-binding domain in the nicotinoprotein methanol dehydrogenase from *Bacillus methanolicus* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46966–46973.
- Horneffer V., Haverkamp J., Janssen H.G., Steeg P.F., Notz R. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: wet heat treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2004. V. 15. P. 1444–1454.
- <http://www.bacterio.cict.fr/qv/rhodococcus.htm>.
- Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Doronina N.V. *Methylomicrobium methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics // Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Nayak D.D., Marx C.J. Experimental horizontal gene transfer of methylamine dehydrogenase mimics prevalent exchange in nature and overcomes the methylamine growth constraints posed by the sub-optimal N-methylglutamate pathway // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 60–79.
- Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.
- Schenkels P., Duine J.A. Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of broad spectrum of alcohols and interconversion of alcohols and aldehydes // Microbiology (SGM). 2000. V. 146. P. 775–785.

Suleiman M., Zecher K., Yücel O., Jagmann N., Philipp B. Interkingdom cross-feeding of ammonium from marine methylamine-degrading bacteria to the diatom *Phaeodactylum tricorutum* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 7113–7122.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin, F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strat-

egies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J.A. Nicotinoprotein (NAD(P)-containing) alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 819–826.

Vu H N., Subuyuj G.A., Vijayakumar S., Good N.M., Martinez-Gomez N.C., Skovran E. Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1250–1259.

## Characterization of *Rhodococcus wratislaviensis*, a New Gram-Positive Facultative Methylotroph, and Properties of Its C<sub>1</sub> Metabolism

E. N. Kaparullina<sup>1,\*</sup>, Yu. A. Trotsenko<sup>1</sup>, and N. V. Doronina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

\*e-mail: lenokap80@gmail.com

Received April 24, 2018

Revised September 10, 2018

Accepted October 2, 2018

**Abstract**—A facultative methylotroph, strain 2AzMo (VKM Ac-2782), was isolated from the coastal zone of the Sea of Azov. The cells of the isolate are aerobic gram-positive nonmotile rods. Optimal growth occurs at 1% NaCl, 28°C, and pH 7.5 with 1% CH<sub>3</sub>OH or 0.3% methylamine as the carbon and energy sources. A broad spectrum of polycarbon substrates is also utilized. Sequencing of the 16S rRNA gene of the strain revealed its similarity to *Rhodococcus* species: 99.9% to *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> (=NCIMB 13082<sup>T</sup>), 99.4% to *R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup> (=RKJ300<sup>T</sup>), and 99.2% to *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup> (=DNP505<sup>T</sup>). The level of DNA–DNA homology of strain 2AzMo with *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup> (=NCIMB 13082<sup>T</sup>) was 76%, supporting its identification as a strain of this species. However, unlike strain 2AzMo, the type strain *R. wratislaviensis* IEGM 1112<sup>T</sup>, as well as other members of this genus (*R. imtechensis* IEGM 940<sup>T</sup>, *R. koreensis* IEGM 962<sup>T</sup>, and *R. opacus* IEGM 716<sup>T</sup>), do not grow on methanol and methylamine. Methanol oxidation by *R. wratislaviensis* 2AzMo is catalyzed by alcohol dehydrogenase, which uses 4-nitroso-N,N-dimethylaniline as an artificial electron acceptor. Methylamine is oxidized by methylamine dehydrogenase and the enzymes of the N-methylglutamate pathway. Formaldehyde is then assimilated via the fructose biphosphate aldolase variant of the ribulose monophosphate pathway of C<sub>1</sub> metabolism. Ammonium is assimilated by α-ketoglutarate reductive amination and via the glutamate cycle.

**Keywords:** *Rhodococcus*, methylotroph, metabolism, methanol, methylamine