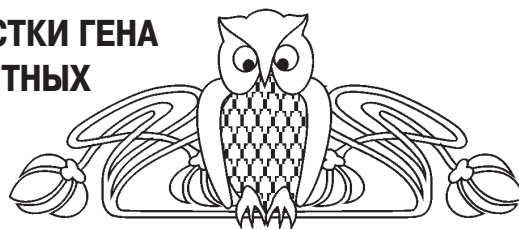




УДК 579.64: 579.84

КОНСЕРВАТИВНЫЕ И ВАРИАБЕЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ГЕНА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *METHYLOPHAGA*



Д. Ю. Шаравин, А. П. Соломенный

Шаравин Дмитрий Юрьевич, инженер лаборатории водной микробиологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермь), кандидат биологических наук. E-mail: dima-sharavin@yandex.ru

Соломенный Александр Петрович, старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермь), кандидат биологических наук. E-mail: solomen@iegm.ru

В работе изучены консервативные и вариабельные участки в структуре гена *mxaF* и транслированной аминокислотной последовательности у выделенного из микробно-растительной ассоциации галотолерантного метилотрофного изолята М1К, отнесённого к роду *Methylophaga*. В ходе проведённого исследования с использованием метода минимума эволюции обнаружена гетерогенность *mxaF* среди исследованных родов метило- и метанотрофов. Высокая солеустойчивость и зафиксированная способность синтезировать ауксин из L-триптофана делает штамм М1К перспективным для использования в агротехнологии.

Ключевые слова: галотолерантность, метилотрофы, метанотрофы, фитосимбиоз, микроэволюция.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-452-457

Введение

Бактерии, использующие окисленные производные метана (метанол и метиламин) в качестве источников углерода и энергии, играют глобальную роль в круговороте C_1 -соединений [1]. Некоторые из них способны фиксировать молекулярный азот, синтезировать фитогормоны, осмопротекторы и рассматриваются в качестве перспективных объектов биотехнологии. Фитосимбиотические метиловобактерии, колонизируя поверхность и внутренние ткани растений, могут оказывать положительное влияние на рост, развитие и продуктивность культурных растений [1, 2]. Метилотрофные микроорганизмы окисляют метанол до формальдегида при помощи фермента метанолдегидрогеназы (МДГ), который представляет собой тетрамер, состоящий из двух больших и двух малых субъединиц, двух молекул пирролохинолинхинона (PQQ) и одного иона Ca^{2+} . Ген *mxaF* кодирует большую α -субъединицу МДГ, считается, что последовательность *mxaF* достаточно консервативна среди протеобактерий и может отражать их филогенетическое родство, подобно гену 16S рРНК [3, 4].

Род *Methylophaga* (класс Gammaproteobacteria, порядок Thiotrichales, семейство Piscirickettsiaceae) был первоначально описан группой исследователей [5] на основании изучения двух морских метанол-утилизирующих видов *M. marina* и *M. thalassica* и к настоящему времени насчитывает десять видов. Представители рода существенно отличаются от остальных метилотрофов низким содержанием Г+Ц в тотальной ДНК (большинство укладывается в диапазон 43–46 мол.%), тогда как содержание Г+Ц пар у метилотрофов из класса Alphaproteobacteria находится в диапазоне 54–72 мол.%, метилотрофов Betaproteobacteria – 50–69 мол.%, а метилотрофы класса Gammaproteobacteria, за исключением рода *Methylophaga*, имеют содержание Г+Ц 58–69 мол.%. Почти все представители рода *Methylophaga* способны выдержать концентрацию NaCl 10%, а некоторые до 20%, что достаточно редко встречается среди метиловобактерий [3, 6].

Цель данной работы – изучение гетерогенности структуры МДГ у галотолерантных метилотрофных представителей рода *Methylophaga*.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся галотолерантный метилотрофный штамм М1К, изолированный из ризосферы солеустойчивого растения *Suaeda prostrata* Pall., в районе Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (г. Соликамск, Пермский край, сентябрь 2012 г.). Изолят культивировался на жидкой среде «К» с добавлением 5% NaCl и 1% метанола в качестве субстрата [3]. Способность штамма М1К синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) определена при помощи реактива Сальковского после добавления в культуральную среду L-триптофана, измерения осуществляли в 3–5-кратной повторности [7].

С помощью ПЦР амплифицирована последовательность гена 16S рРНК со стандартными праймерами [8]. Путём компьютерного геномного анализа удалось определить специфичный фрагмент гена *mxaF*, подобрать фланкирующие последовательности, при-



годные в качестве праймеров (MFGmxa2-f 5'-GGAACGAAACCATGCGTCCTGG и MFGmxa2-r 5'-CCCTGGTTGTGGAAACCCAT) и амплифицировать переменный фрагмент размером 368 пн.

Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *mxaF* проводили с помощью компьютерной программы MEGA 6.0. Диаграммы построены методом минимума эволюции, показатель достоверности определен на основании анализа 1000 альтернативных деревьев. В качестве внегрупповых видов представлены метанотрофы (*Methylomonas paludis* DSM 24973^T, *Methylomarinum vadi* T2-1^T, *Methylococcus capsulatus* Bath^T, *Methylohalobius crimeensis* 10Ki^T, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z^T, *Methylomicrobium japonense* NI^T, *Methylomicrobium buryatense* 5G^T), содержащие

mxaF и филогенетически близкие представителям рода *Methylophaga*.

Результаты и их обсуждение

Характеристика штамма M1K приведена в таблице в сравнении с другими представителями рода *Methylophaga*. По основным параметрам штамм M1K схож с представителями рода *Methylophaga* (морфология клетки, допустимое содержание солей в среде культивирования, оптимальная температура роста, состав клеточных жирных кислот), но отличается по диапазону pH и спектру ростовых субстратов. В эксперименте по оценке синтеза ИУК содержание ауксина в культуральной жидкости достигало 10 мкг/мл, что является типичным для непатогенных фитосимбиотических метилотрофных микроорганизмов [9].

Дифференциальные характеристики штамма M1K (данные этого исследования) и штаммов родственных видов рода *Methylophaga*. 1, M1K; 2, *M. nitratireducenticrescens* JAM1^T [6]; 3, *M. frappieri* JAM7^T [6]; 4, *M. alcalica* M39^T [10]; 5, *M. aminisulfidivorans* MP^T [11]; 6, *M. lonarensis* MPL^T [12]; 7, *M. muralis* Kr3^T [13]

Параметр	1	2	3	4	5	6	7
Размер клетки, мкм	0,6–0,8× 0,9–1,3	0,6×1,5	0,7×1,5	0,6–0,8× 1,4–2,8	0,2–0,4× 0,8–1,2	1,2–2,0× 0,2	0,7× 1,7–2,0
Подвижность	+	+	+	+	–	+	+
Диап. NaCl, %	0,5–10,0	0,5–8,0	0,5–8,0	0,05–10,0	1,5–9,0	0,05–10,0	0,3–20,0
Оптим. NaCl, %	3,0	3,0	3,0	3–4	3,0	0,5–2,0	3,0–9,0
Диап. pH	7,0–9,0	6,0–11,0	6,0–11,0	7,0–11,0	6,0–8,0	7,0–10,0	6,0–11,0
Оптим. pH	8,0	8,0	8,0	9,0–9,5	6,8–7,0	9,0–10,0	8,0–9,0
Темп. диап., °C	15–37	15–37	15–37	4–35	20–37	20–37	0–42
Оптим. темп., °C	25	30	34	25–29	30	28–30	20–32
Восст. нитратов	–	+	–	+	+	+	+
Метанол 1%	+	+	+	+	+	+	+
Метанол 2%	+	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	+
Метиламин	±	–	–	+	+	–	+
Диметиламин	±	н.д.	н.д.	н.д.	+	н.д.	н.д.
Триметиламин	–	н.д.	н.д.	н.д.	+	н.д.	+
Доминирующие ЖК	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}	C _{16:0} C _{16:1}	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}	C _{16:0} C _{16:1} C _{18:1}

Примечание. н.д. – нет данных.

BLAST анализ фрагмента последовательности гена 16S рРНК (1406 пн) показал, что штамм M1K имеет 98,3–98,7% сходства с группой некультивируемых представителей рода *Methylophaga* и обладает наибольшим сходством (98,3%) с *Methylophaga nitratireducenticrescens* JAM1^T (GenBank № CP003390). Последовательность гена *mxaF* у штамма M1K обладает высокой степенью сходства (97,6%) с *M. nitratireducenticrescens* JAM1^T, 90,4% – с

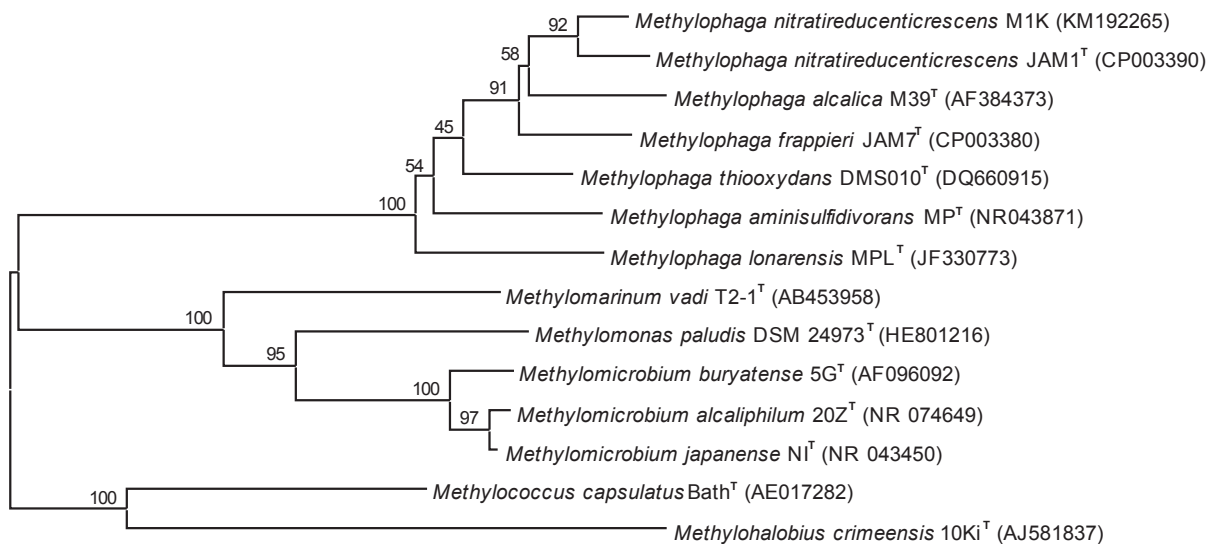
M. frappieri JAM7^T и 85,3% – с *M. lonarensis* MPL^T. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма M1K депонированы в базе данных GenBank под номерами KM192265 и KT728194 соответственно.

Кластеризация последовательностей генов 16S рРНК и *mxaF* (рис. 1) обнаружило группирование пар между штаммами M1K и JAM1^T вида *M. nitratireducenticrescens*, а также между *M. aminisulfidivorans* MP^T и *M. thio-*



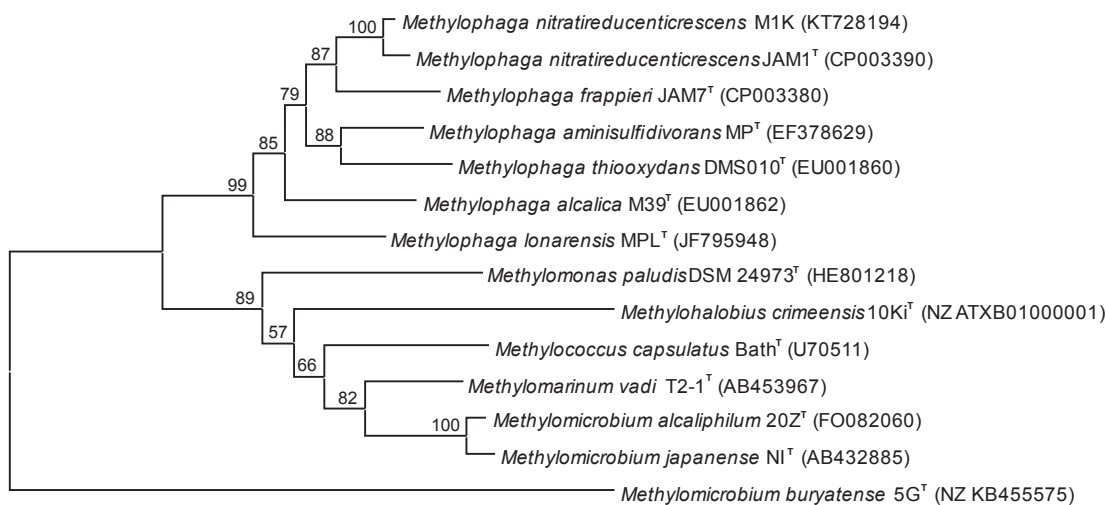
oxydans DMS010^T. Обнаруженная дивергенция *M. lonarensis* MPL^T совпадает в обоих построениях. Полученные диаграммы в целом сходны по порядку объединения в кластеры, однако наблюдаются расхождения в положении *M. alcalica* M39^T и *M. frappieri* JAM7^T, что отличает филограммы, построенные с использо-

ванием алгоритма минимальной эволюции от графов, построенных с применением метода максимального правдоподобия, когда кластеризация последовательностей генов *mxaF* и 16S рРНК происходила идентично. Это позволяет корректно обсуждать параметры эволюционной изменчивости гена *mxaF*.



0.01

a



0.05

b

Рис. 1. Диаграммы филогенетического родства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (а) и *mxaF* (б) представителей семейства *Methylophaga*. Масштаб эволюционных расстояний отражает количество замен на один нуклеотид. Цифрами показаны значения bootstrap. В качестве внегрупповых использованы последовательности метанотрофов родов *Methylomonas*, *Methylomarinum*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium* и *Methylohalobius*

Масштабы дивергенции в пределах рода *Methylophaga* соответствуют совокупному разбросу изменений в последовательности гена *mxaF* для умеренных галофильных метанотрофов, принадлежащих к пяти родам, что может считаться предпосылкой для выделения не-

скольких новых родов из состава *Methylophaga*.

Выравнивание аминокислотных последовательностей фрагмента α-субъединицы МДГ с последовательностями родственных видов показало, что в исследованной области участки, ответственные за связывание полипептида с кофактором



PQQ и ионом Ca²⁺ (Asp 30 (позиция D30 на рис. 2), Arg 58 (R58), Asn 124 (N124)), расположены в консервативных областях [14]. Однако прослеживаются участки длиной до 3–4 аминокислот, имеющие существенные различия среди рассматриваемых представителей рода *Methylophaga* (A12–D13, K43–K46, V85–K87, F101–S102), причём здесь представлены замены полярных аминокислот на неполярные. Вариативные позиции в виде одиночных аминокислотных замен выявляются также и вблизи консервативных участков, что при росте дивергенции может сказаться на

ферментативной активности МДГ. При сравнении результатов, полученных в работе Graziano и Merlino, устойчивых корреляций в дипептидных заменах, выявленных авторами в аминокислотных последовательностях белков галотолерантных микроорганизмов, обнаружено не было [15]. Анализ нуклеотидной последовательности гена *mxaF* у исследованных метилотрофов обнаружил триплетные вариации (даже в кодонах аминокислот, отвечающих за связывание с кофактором), однако благодаря вырожденности генетического кода не приведшие к замене аминокислот.

	1	10	20	30	40																																														
1	N	K	W	T	M	T	I	W	G	R	D	A	D	T	G	L	A	K	F	G	Y	Q	K	T	P	H	D	E	W	D	Y	A	G	V	N	V	M	M	L	S	E	Q									
2					
3					
4				
5				
6			
7			
8		
9	
10	
11	
12
13
14	

	50	60	70	80																																															
1	K	D	K	K	G	K	M	R	K	L	L	T	H	P	D	R	N	G	I	I	Y	T	L	D	R	E	T	G	D	L	V	S	A	D	K	M	D	D	T	A	N	W									
2	
3	E	
4
5	
6	
7	
8	V	-	V	N		
9	-	V	N	
10	E	-	V	D	
11	R	-	V	N	
12	-	V	N
13	-	V	N
14	E	-	I	

	90	100	110	120																																														
1	V	K	K	V	D	L	E	T	G	L	P	I	R	D	P	E	F	S	T	R	M	G	H	R	-	-	-	S	R	D	I	C	P	S	A	M	G	F	H	N	Q	G								
2
3
4	L	T
5
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	A	S	H		

Рис. 2. Сравнение фрагмента аминокислотной последовательности α-субъединицы МДГ 1, *M. nitratireducenticrescens* M1K, полученной в данном исследовании (GenBank № AMK47902), с последовательностями близкородственных штаммов: 2, *M. nitratireducenticrescens* JAM1^T (AFI83383); 3, *M. frappieri* JAM7^T (AFJ03261); 4, *M. alcalica* M39^T (ABS45565); 5, *M. aminisulfidivorans* MP^T (ABN49105); 6, *M. thiooxydans* DMS010^T (ABS45563); 7, *M. lonarensis* MPL^T (AEG19447) и представителей внегрупповых видов: 8, *Methylomonas paludis* DSM24973^T (CCH22594); 9, *Methylomarinum vadi* T2-1^T (BAN22848); 10, *Methylococcus capsulatus* Bath^T (AAC45563); 11, *Methylohalobius crimeensis* 10Ki^T (WP_022947522); 12, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z^T (CCE25111); 13, *Methylomicrobium japonense* NI^T (BAG72174); 14, *Methylomicrobium buryatense* 5G^T (WP_017842117)



С учётом широкой распространённости засоленных экотопов, в которых обитают представители рода *Methylophaga* (солёные воды озёр и морей, умеренно-засоленные почвы), а также некоторой филогенетической дивергенции ключевого гена C_1 -метаболизма у данных метиловых бактерий можно полагать о достаточно длительном эволюционном пути адаптации к галотолерантности. Однако связать конкретные изменения в аминокислотной последовательности МДГ с солеустойчивостью среди рассматриваемых метилотрофов пока не удается в связи с малой величиной выборки в доступных базах данных. Дальнейшие полногеномные исследования представителей *Methylophaga* необходимы для таксономической верификации рода.

Таким образом, штамм М1К, изолированный из ризосферы галофитного растения, сочетает в себе достаточно высокую устойчивость к соли и способность к синтезу ИУК. Среди других способных вступать в микробно-растительное взаимодействие метилотрофов (особенно представителей рода *Methylobacteria*, богатого на фитосимбионтов) едва ли найдутся виды, переносящие концентрации NaCl более 3%, что делает штамм М1К практически-перспективным. А знание особенностей структуры МДГ – важнейшего фермента метаболизма ростового субстрата у галотолерантных метиловых бактерий – позволит более избирательно подходить к отбору штаммов, имеющих потенциал для использования в агротехнологии.

Благодарности

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Н. П. Ковалевской (лаборатория водной микробиологии, ИЭГМ УрО РАН).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комплексной программы Уральского отделения РАН (проект № 15-4-4-2).

Список литературы

1. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts // *Plant Signaling & Behavior*. 2007. Vol. 2. P. 74–78.
2. Фёдоров Д. Н., Доронина Н. В., Троценко Ю. А. Фитосимбиоз аэробных метиловых бактерий: новые факты и гипотезы // *Микробиология*. 2011. Т. 80, № 4. С. 435–446.
3. Троценко Ю. А., Доронина Н. В., Торгонская М. Л. Аэробные метиловых бактерии. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
4. Lau E., Fisher M. C., Steudler P. A., Cavanaugh C. M. The methanol dehydrogenase gene *mdhA*, as a functional phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8. P. e56993.
5. Janvier M., Frehel C., Grimont F., Gasser F. *Methylophaga marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylophaga thalassica* sp. nov., marine methylophages // *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1985. Vol. 35. P. 131–139.
6. Villeneuve C., Martineau C., Maufferey F., Villemur R. *Methylophaga nitratreducenticrescens* sp. nov. and *Methylophaga frapperi* sp. nov., isolated from the biofilm of the methanol-fed denitrification system treating the seawater at the Montreal Biodome // *Intern. J. Syst. Evol. Micr.* 2013. Vol. 63. P. 2216–2222.
7. Gordon S. A., Weber R. P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid // *Plant Physiol.* 1951. Vol. 26. P. 192–195.
8. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. N.Y.: Academic Press, 1991. P. 115–167.
9. Gogleva A. A., Kaparullina E. N., Doronina N. V., Trotsenko Y. A. *Methylobacillus arboreus* sp. nov. and *Methylobacillus gramineus* sp. nov., novel non-pigmented obligate methylophages associated with plants // *Syst. Appl. Microbiol.* 2011. Vol. 34. P. 477–481.
10. Doronina N. V., Darmaeva T. D., Trotsenko Y. A. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylophage bacterium from an East Mongolian saline soda lake // *Intern. J. Syst. Evol. Micr.* 2003. Vol. 53. P. 223–229.
11. Kim H. G., Doronina N. V., Trotsenko Y. A., Kim S. W. *Methylophaga aminisulfidivorans* sp. nov., a restricted facultatively methylophage marine bacterium // *Intern. J. Syst. Evol. Micr.* 2007. Vol. 57. P. 2096–2101.
12. Antony C. P., Doronina N. V., Boden R., Trotsenko Y. A., Shouche Y. S., Murrell J. C. *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylophage isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater // *Intern. J. Syst. Evol. Micr.* 2012. Vol. 62. P. 1613–1618.
13. Доронина Н. В., Лу Ц. Д., Иванова Е. Г., Троценко Ю. А. *Methylophaga murata* sp. nov. – галоалкалофильный аэробный метилотроф из разрушающегося мрамора // *Микробиология*. 2005. Т. 74, № 4. С. 511–519.
14. Jeong J. H., Kim S. W., Yoon S. M., Park J. K., Lee J. S. Characterization of the conserved region of the *mdhA* gene that encodes the large subunit of the methanol dehydrogenase from a marine methylophage bacterium // *Mol. Cells*. 2002. Vol. 13, № 3. P. 369–376.
15. Graziano G., Merlino A. Molecular bases of protein halotolerance // *Biochim. et Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1844, № 4. P. 850–858.



**Conserved and Variable Regions
of the Methanol Dehydrogenase Gene
Among Halotolerant Representatives
of *Methylophaga* Genus**

D. Yu. Sharavin, A. P. Solomennyi

Dmitry Yu. Sharavin, ORCID 0000-0003-3962-8164, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 13, Goleva Str., Perm, 614081, Russia, dima-sharavin@yandex.ru

Aleksandr P. Solomennyi, ORCID 0000-0002-5234-7829, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian

Academy of Sciences, 13, Goleva Str., Perm, 614081, Russia, solomen@iegm.ru

We investigated conserved and variable regions of the *mxhF* gene and amino acid sequence in methylophilic strain M1K isolated from saline soil rhizosphere and belonging to *Methylophaga* genus. The significant heterogeneity was revealed in methano- and methylophilic bacteria by method of Minimum Evolution. The ability of strain to influence indole-3-acetic acid synthesis from L-tryptophan and halotolerance are the arguments in favor of application in new agrotechnology.

Key words: halotolerance, methylophilic bacteria, methanophilic bacteria, phytosymbiosis, microevolution.

Образец для цитирования:

Шаравин Д. Ю., Соломенный А. П. Консервативные и переменные участки гена метанолдегидрогеназы у галотолерантных представителей рода *Methylophaga* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 4. С. 452–457. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-452-457.

Cite this article as:

Sharavin D. Y., Solomennyi A. P. Conserved and Variable Regions of the Methanol Dehydrogenase Gene Among Halotolerant Representatives of *Methylophaga* Genus. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 4, pp. 452–457 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-4-452-457.