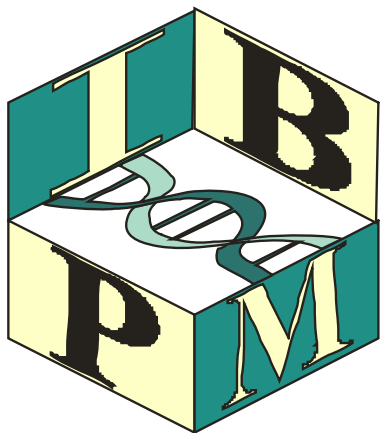




# Биоразнообразие аэробных метилотрофов

**Ю.А. Троценко**

Лаборатория метилотрофии

Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

Пушино, Московская область

# Таксономическое и экофизиологическое разнообразие аэробных метанотрофов

| <i>Gammaproteobacteria</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                           | <i>Alphaproteobacteria</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  | <i>PVC-суперфилум</i>                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Порядки:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <i>Methylococcales</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                           | <i>Methylocystales</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                |
| Семейства:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>Methylococcaceae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                           | <i>Methylocystaceae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <i>Filamentous</i>                                                                               | <i>Beijerinckiaceae</i>                                                                                                                                                                                          | <i>Verrucomicrobia</i>                                                                                         |
| Роды:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Тип I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Тип X                                                                                                                                                     | Тип II                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                |
| <b><i>Methylomonas</i></b><br><i>M. methanica</i><br><i>M. fodinarum</i><br><i>M. aurantiaca</i><br><i>M. rubra</i><br><i>M. scandinavica</i><br><b><i>Methylomicrobium</i></b><br><i>Mm. pelagicum</i><br><i>Mm. agile</i><br><i>Mm. album</i><br><i>Mm. modesto-halophilum</i><br><i>Mm. buryatense</i><br><i>Mm. alcaliphilum</i><br><i>Mm. kenyense</i><br><i>Mm. japanense</i><br><b><i>Methylohalobius</i></b><br><i>Mh. crimeensis</i><br><b><i>Methylovulum</i></b><br><i>Mv. miyakonense</i> | <b><i>Methylobacter</i></b><br><i>Mb. bovis</i><br><i>Mb. chroococcum</i><br><i>Mb. vinelandi</i><br><i>Mb. psychrophilus</i><br><i>Mb. luteus</i><br><i>Mb. tundripaludum</i><br><i>Mb. marinus</i><br><i>Mb. capsulatum</i><br><b><i>Methylosphaera</i></b><br><i>Msp. hansonii</i><br><b><i>Methylosarcina</i></b><br><i>Mts. fibrata</i><br><i>Mts. quisquilibrium</i><br><b><i>Methylothermus</i></b><br><i>Mlt. thermalis</i><br><b><i>Methylosoma</i></b><br><i>Mts. difficle</i> | <b><i>Methylococcus</i></b><br><i>Mc. capsulatus</i><br><b><i>Methylocaldum</i></b><br><i>Md. gracile</i><br><i>Md. szegediense</i><br><i>Md. tepidum</i> | <b><i>Methylocystis</i></b><br><i>Mc. minimus</i><br><i>Mc. echinoides</i><br><i>Mc. parvus</i><br><i>Mc. pyriformis</i><br><i>Mc. methanolicus</i><br><i>Mc. rosea</i><br><br><b>Семейство:</b><br><b><i>Methylosinaceae</i></b><br><b><i>Methylosinus</i></b><br><i>Ms. trichosporium</i><br><i>Ms. sporium</i> | <b><i>Crenothrix</i></b><br><i>Cr. polyspora</i><br><b><i>Clonothrix</i></b><br><i>Cl. fusca</i> | <b><i>Methylocella</i></b><br><i>Mcl. palustris</i><br><i>Mcl. silvestris</i><br><i>Mcl. tundrae</i><br><b><i>Methylocapsa</i></b><br><i>Mp. acidiphila</i><br><b><i>Methyloferula</i></b><br><i>Mf. sphagni</i> | <b><i>Methylacidiphilum</i></b><br><i>Ma. infernorum</i><br><i>Ma. fumarolicum</i><br><i>Ma. kamchatkensis</i> |
| <div>1990 г. – описано 5 родов (10 видов) метанотрофов</div> <div>2012 г. – валидировано 20 родов (&gt; 50 видов)</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                |

Повсеместное распространение в широком диапазоне физико-химических параметров: T = 0 – 70°C, pH = 1 – 11, [NaCl] = 0.5 – 15%

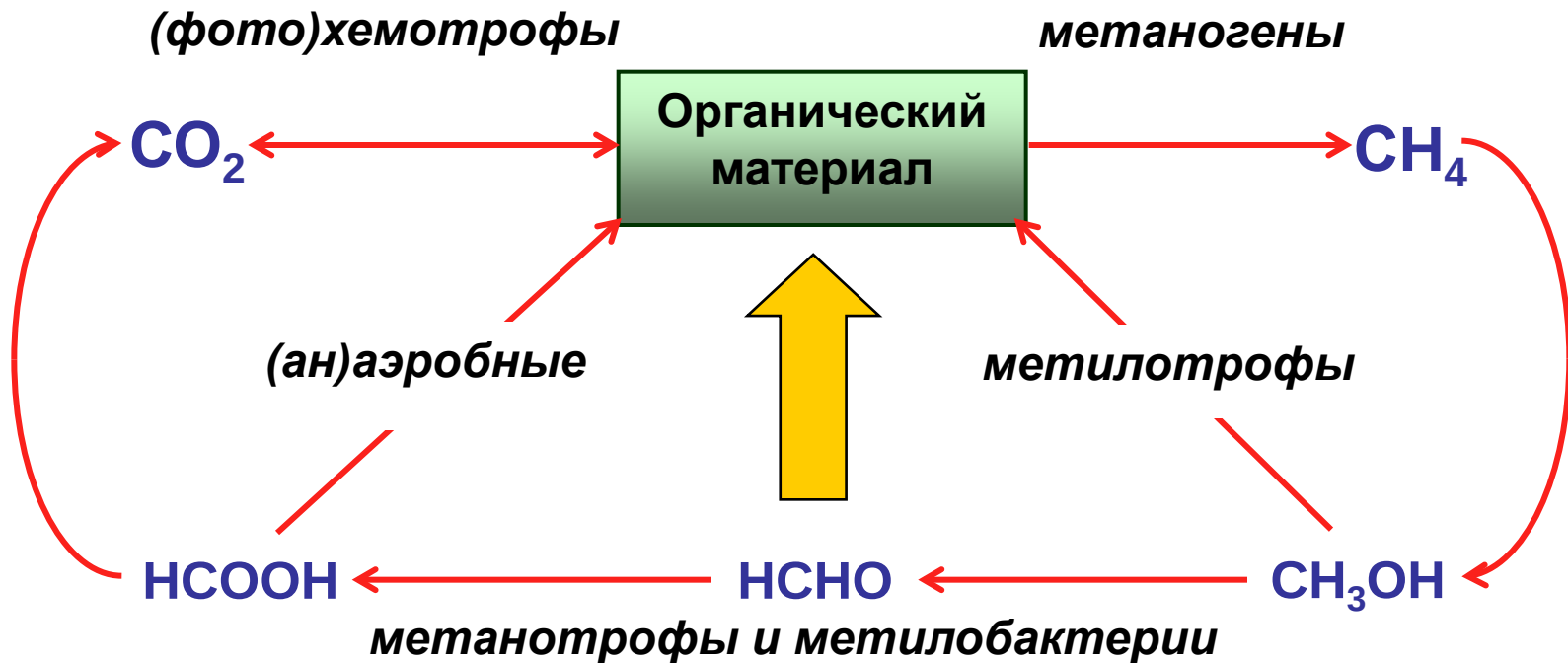
# Таксономическое и экофизиологическое разнообразие аэробных метиловых бактерий

| Рибулозодифосфатный путь                                                                                                   |                                                                                                                                    | Серинный путь                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Рибулозобисфосфатный путь                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Облигатные / ограниченно-факультативные                                                                                    | Факультативные                                                                                                                     | Факультативные                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Факультативные                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Methylophilus</i><br><i>Methylobacillus</i><br><i>Methylovorus</i><br><i>Methylophaga</i><br><i>Methylothermobacter</i> | <i>Mycobacterium</i><br><i>Bacillus</i><br><i>Arthrobacter</i><br><i>Acidomonas</i><br><i>Amycolatopsis</i><br><i>Burkholderia</i> | <i>Methylobacterium</i><br><i>Hyphomicrobium</i><br><i>Aminobacter</i><br><i>Methylothermobacter</i><br><i>Methylophilus</i><br><i>Methylobaculum</i><br><i>Methylosulfonomonas</i><br><i>Marinosulfonomonas</i><br><i>Labrys</i><br><i>Afipia</i><br><i>Methyloversatilis</i><br><i>Methylohalomonas</i><br><i>Granulibacter</i><br><i>Ruegeria (Silicibacter)</i> | <i>Xanthobacter</i><br><i>Paracoccus</i><br><i>Angulomicrobium</i><br><i>Ancylobacter</i><br><i>Albibacter</i><br><i>Beijerinckia</i><br><i>Methylobaculum</i><br><i>Hansschlegelia</i><br><i>Methylobaculum</i><br><i>Methylovirga</i> |

1990 г. – описано 10 родов (15 видов) метиловых бактерий

2012 г. – валидировано 40 родов (>60 видов)

# Роль аэробных метилотрофов в глобальных биосферных циклах углерода метана и метанола



Трофические и метаболические связи анаэробных и аэробных агентов метанового цикла Зёнгена в глобальных биосферных циклах углерода (Гт С/г)

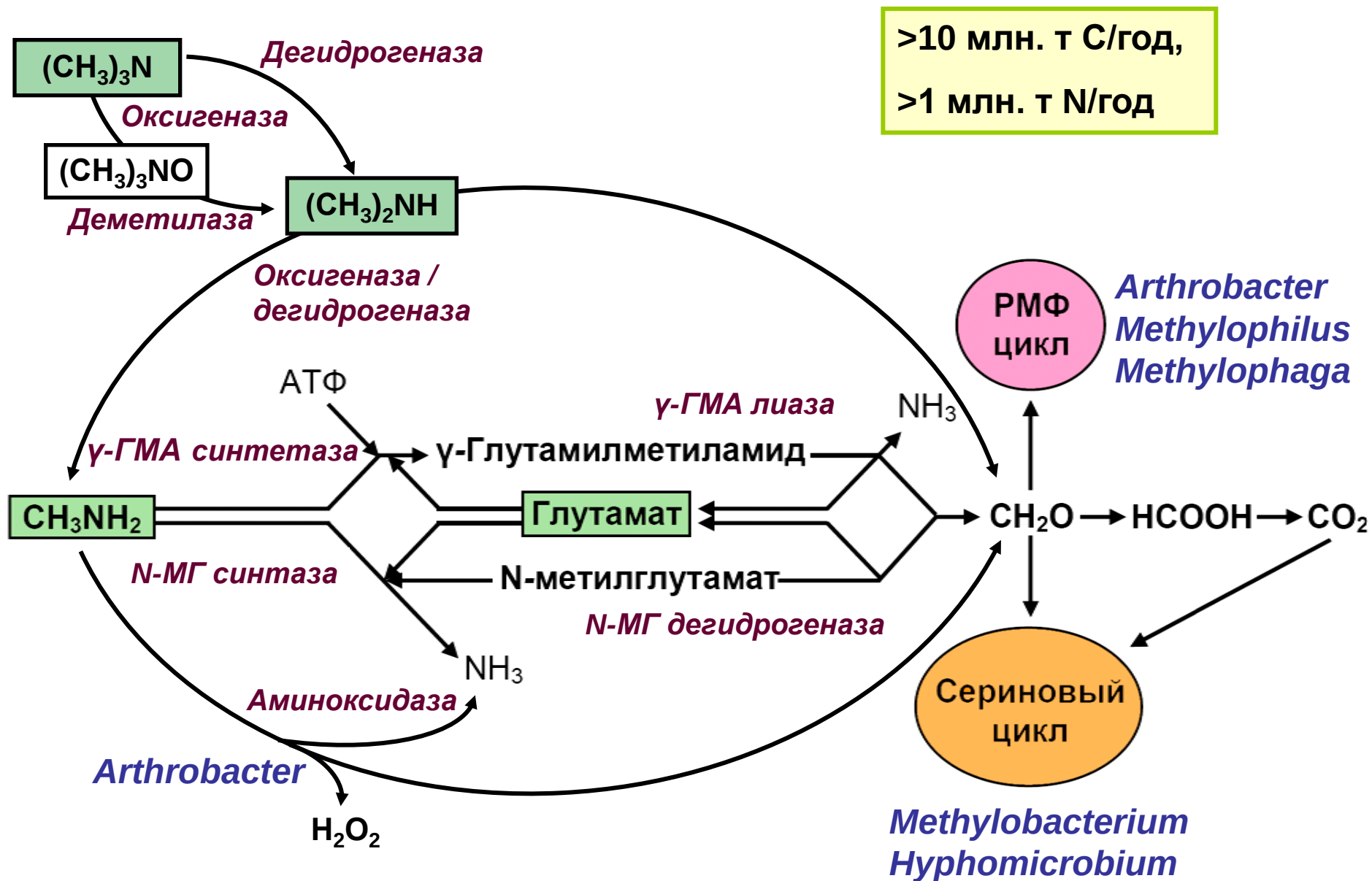
Парниковые  
газы:

$\text{CO}_2$  ~ 1500

$\text{CH}_4$  ~ 800 (наибольший "парниковый" эффект)

$\text{CH}_3\text{OH}$  ~ 300

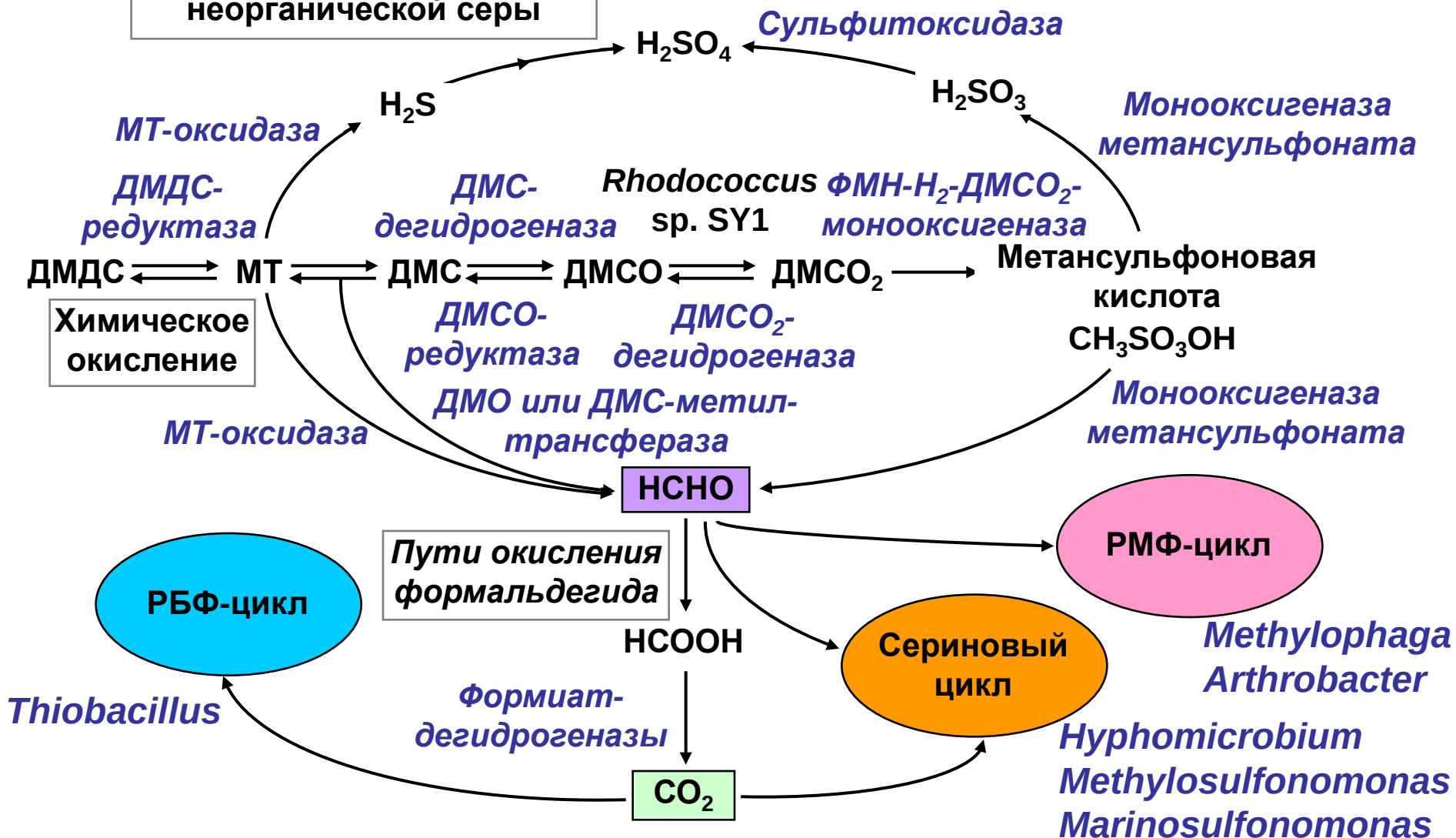
# Роль аэробных метиловобактерий в глобальных биосферных циклах метилированных аминов



# Роль аэробных метиловобактерий в глобальных биосферных циклах метилсернистых соединений

50-70 млн. т С/год

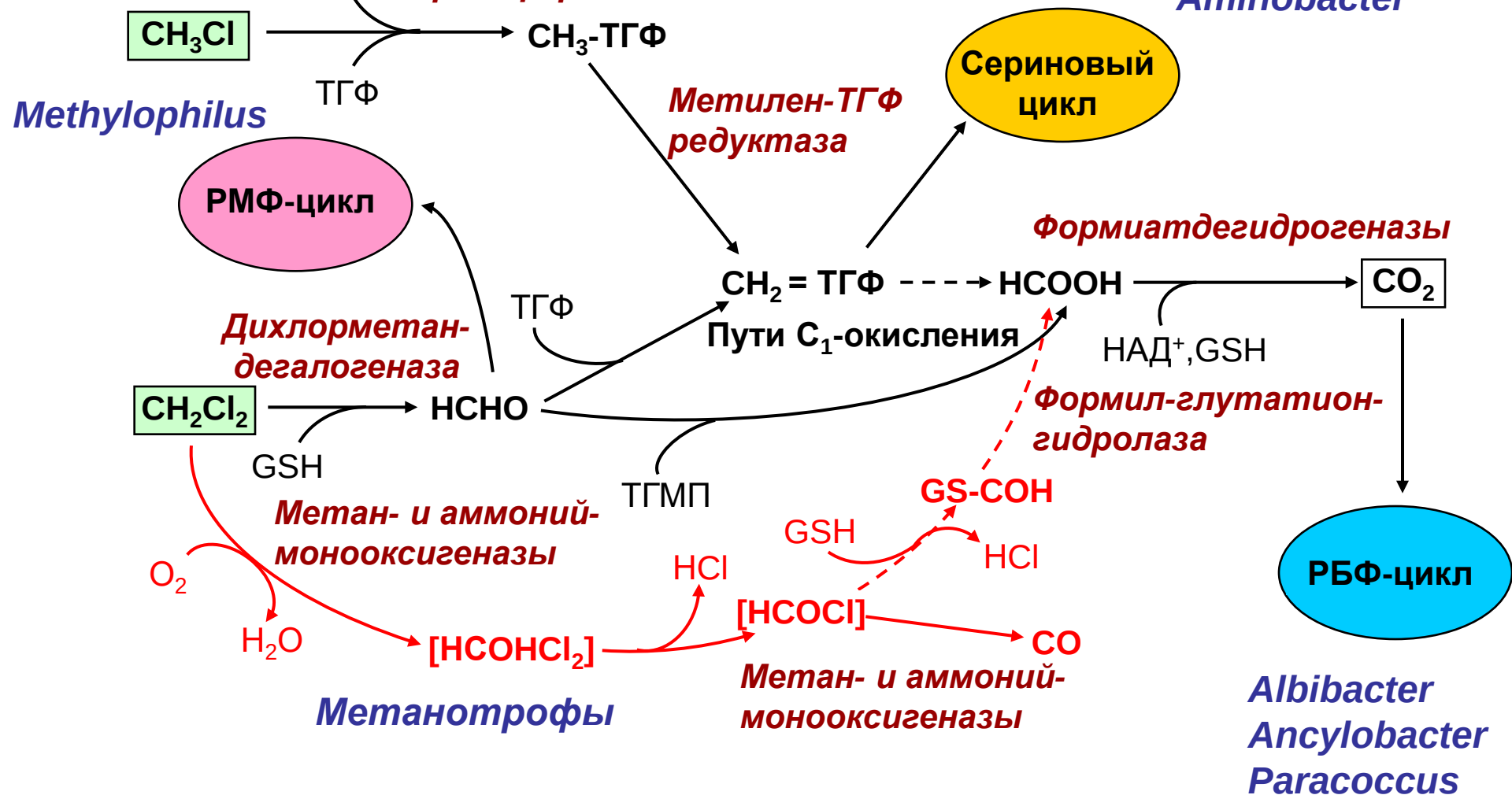
Бактериальное окисление  
неорганической серы



# Роль аэробных метилотрофов в биodeградации галометанов

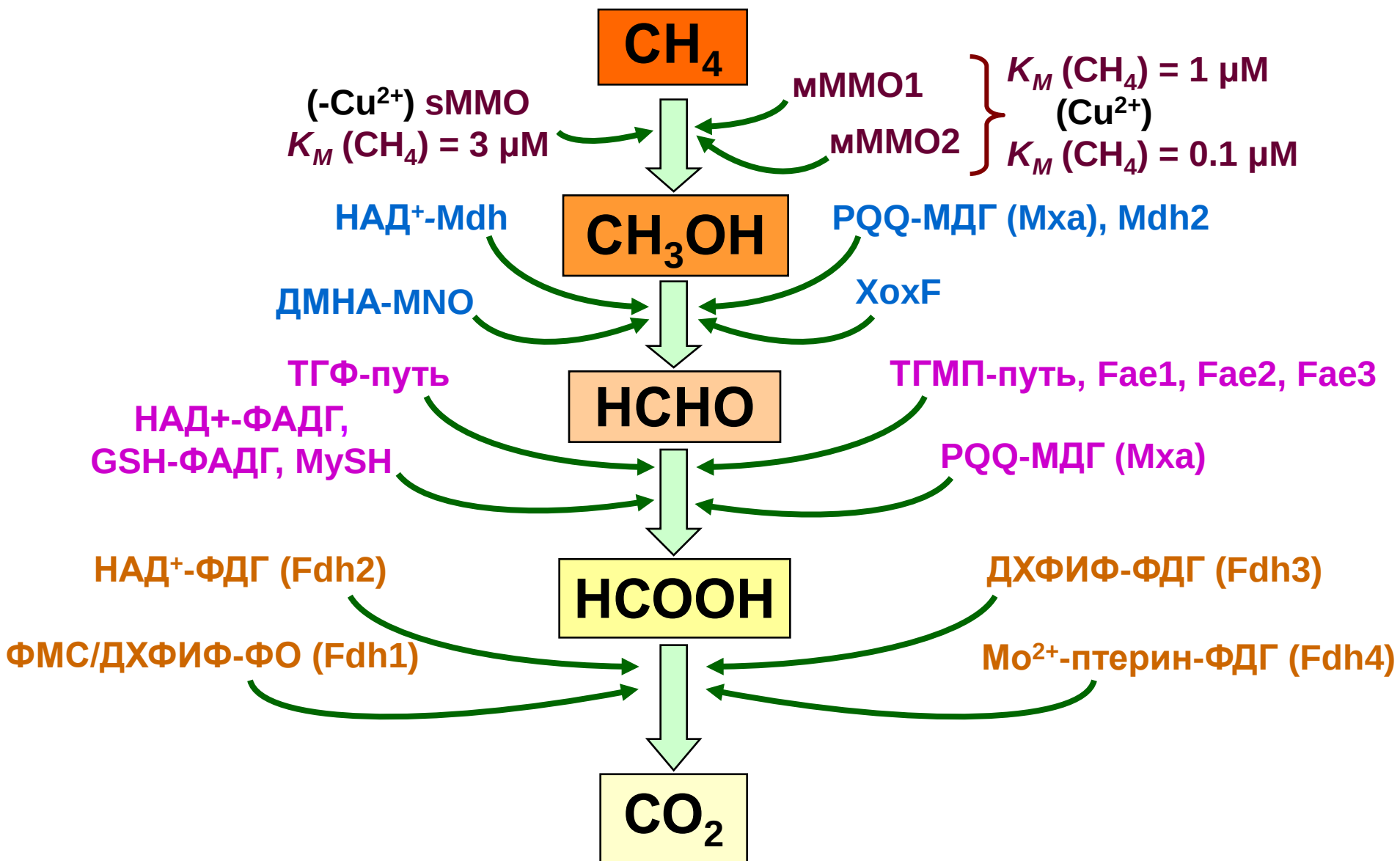
Баланс галометанов ~ 10 млн. т С/год

*Methylobacterium*  
*Hyphomicrobium*  
*Methylophila*  
*Methylophilus*  
*Methylophaga*  
*Methylophaga*  
*Aminobacter*





# Множественные молекулярные формы ферментов первичного окисления $C_1$ -соединений у метилотрофных бактерий

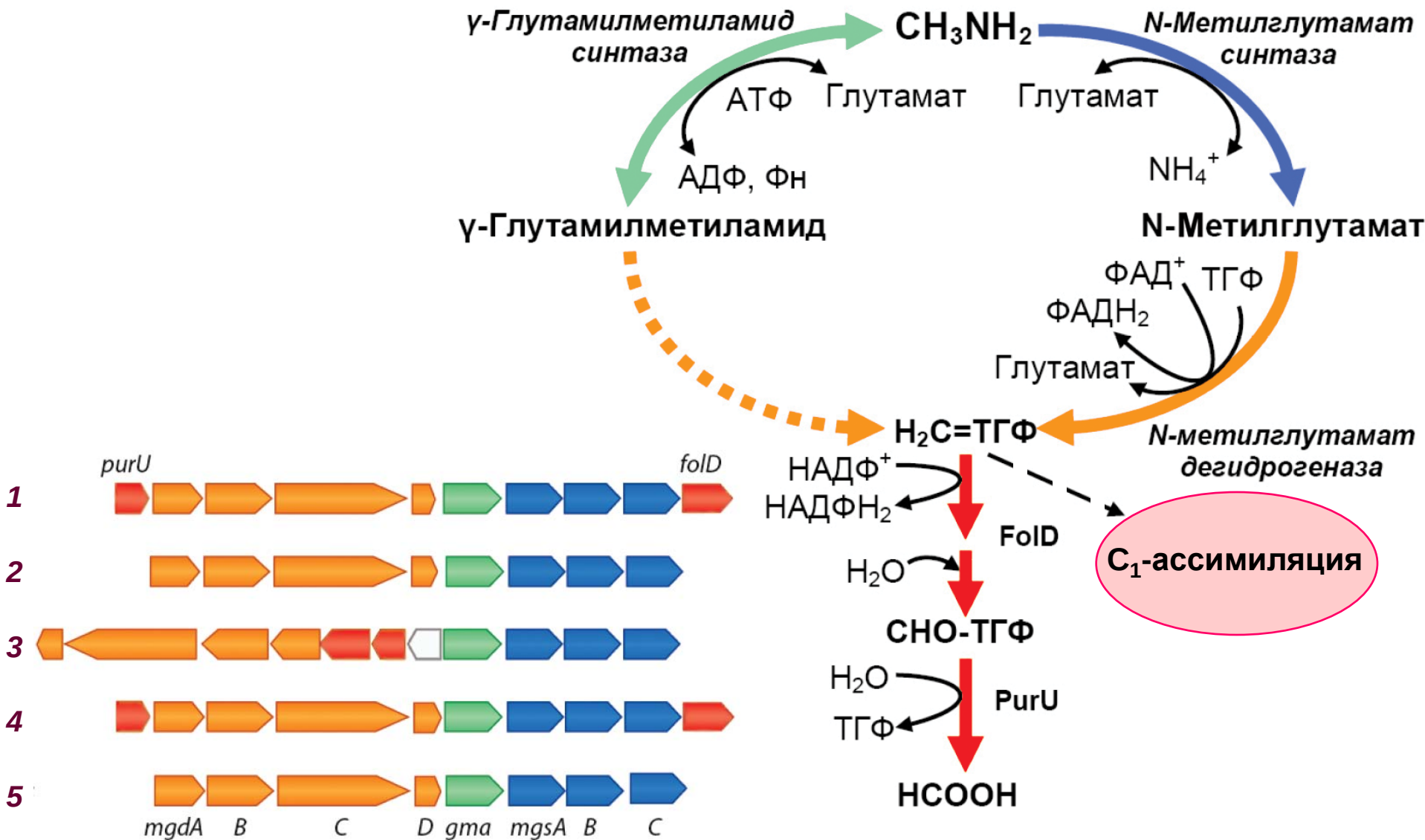






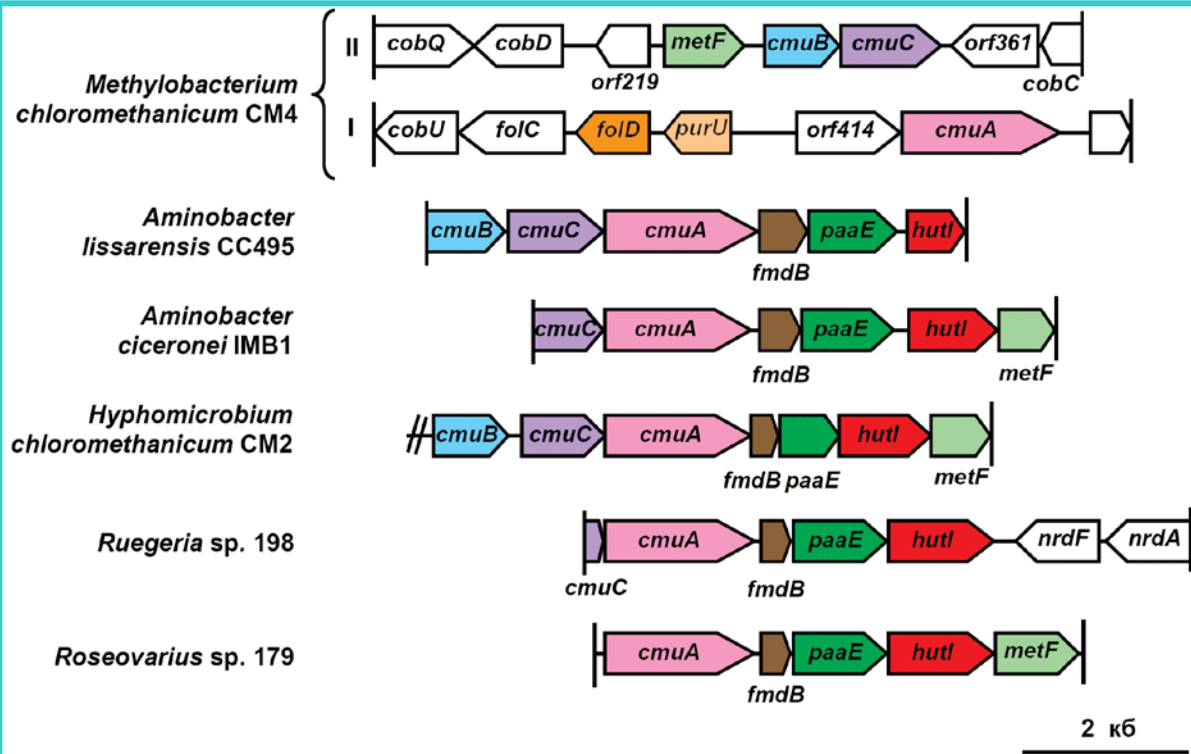
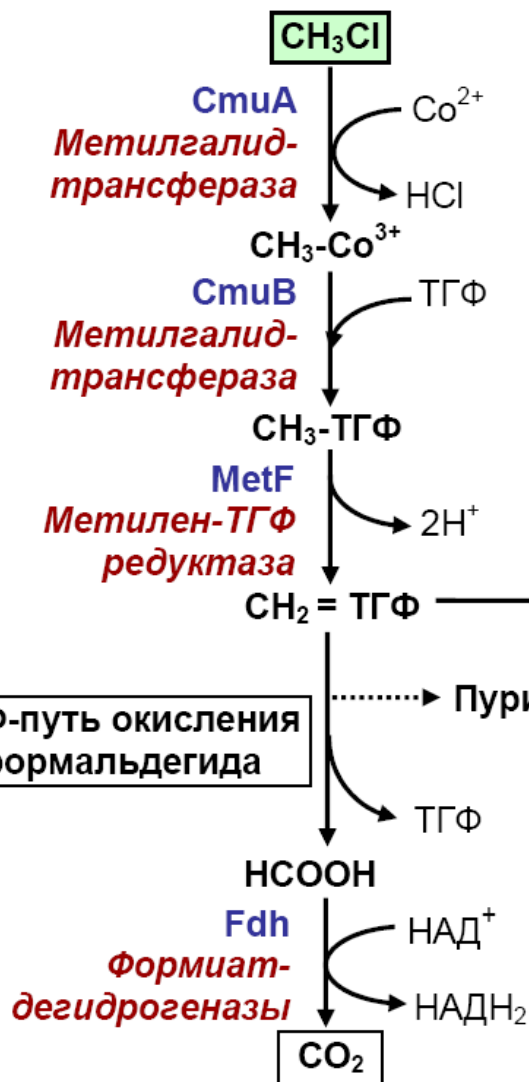


# Гены и ферменты N-метилглутаматного пути у метиловобактерий

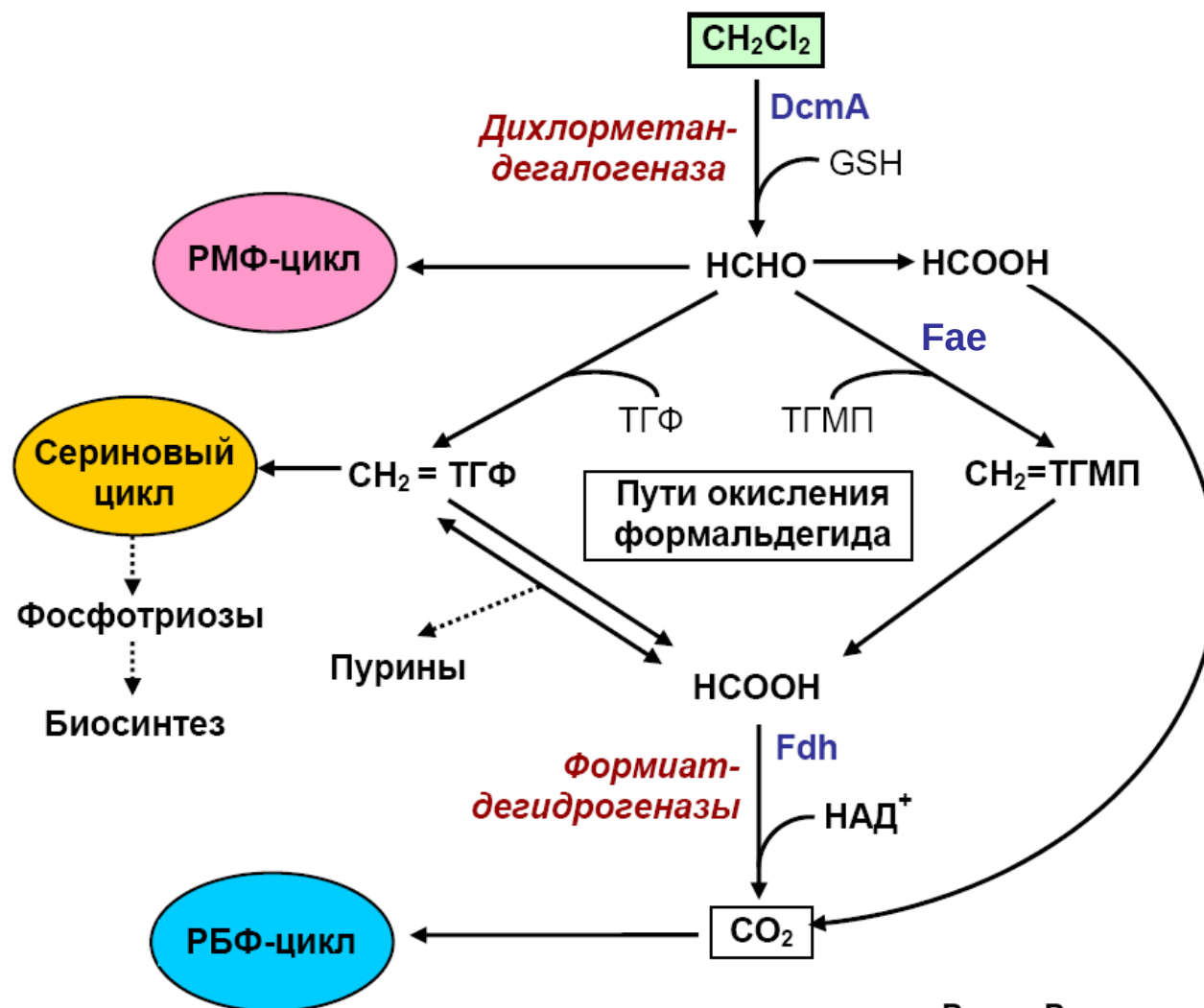


- 1 - *Burkholderia phymatum*, 2 - *Methylobacillus flagellatus*,  
 3 - *Pseudomonas mendocina*, 4 - *Thiomicrospira crunogena*,  
 5 - *Methyloversatilis universalis*

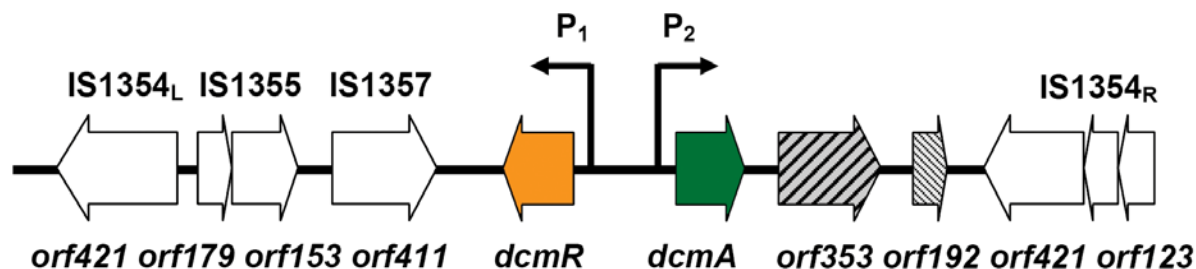
# Гены и ферменты биodeградации хлорметана у метиловобактерий



# Гены и ферменты биодеградаци дихлорметана у метиловобактерий



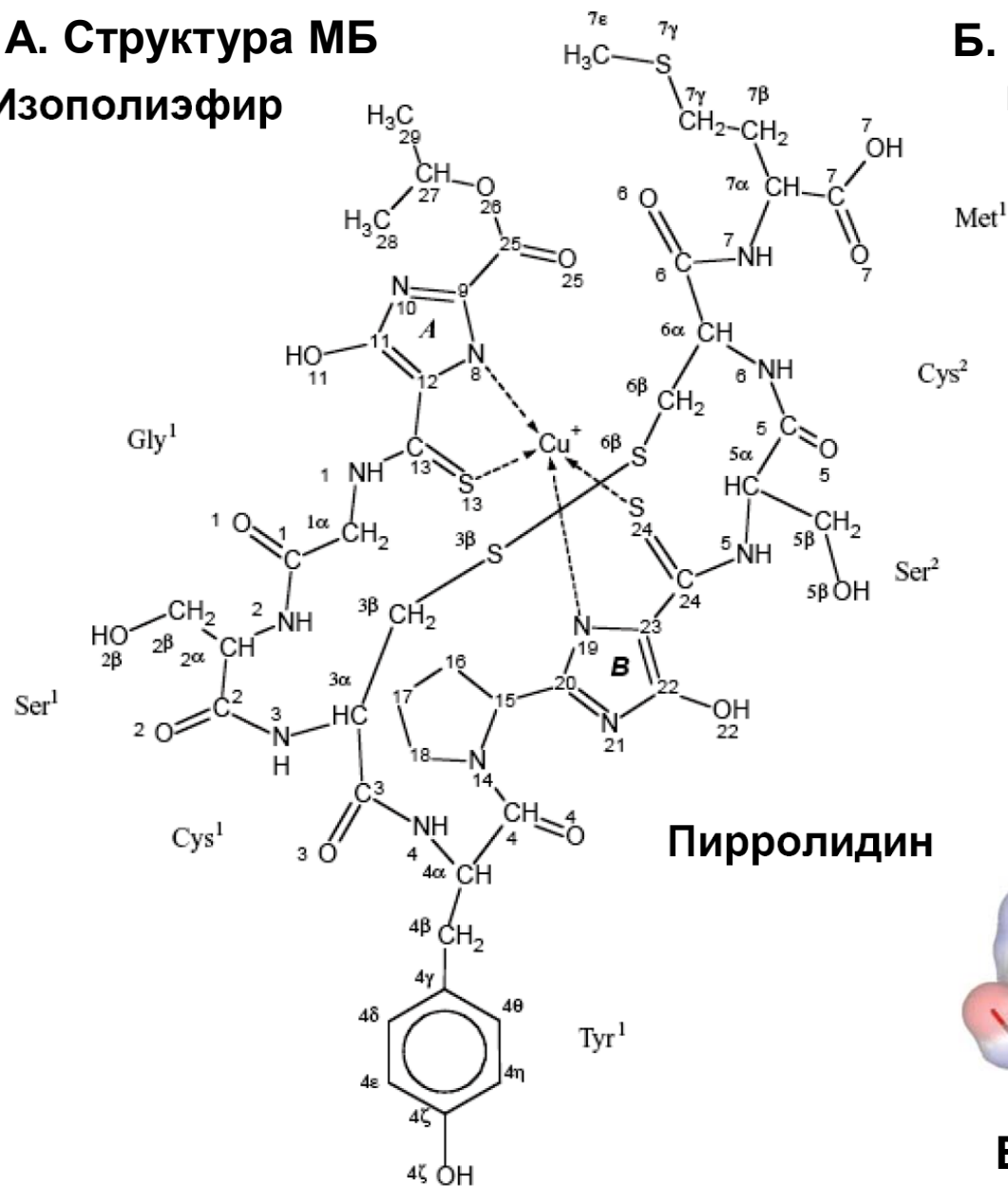
*Methylobacterium dichloromethanicum* DM4



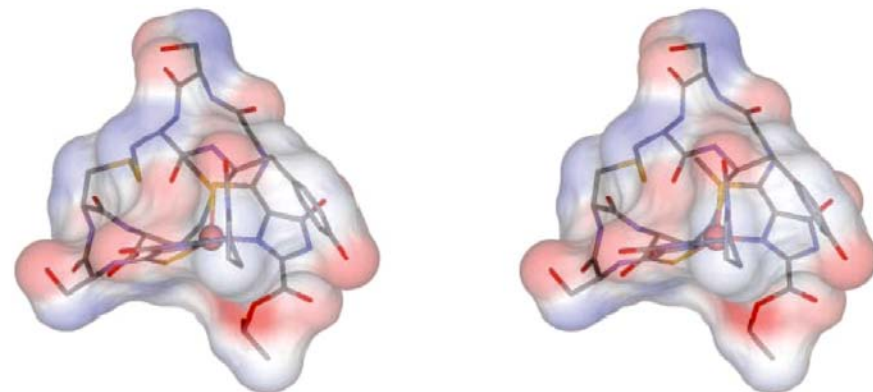
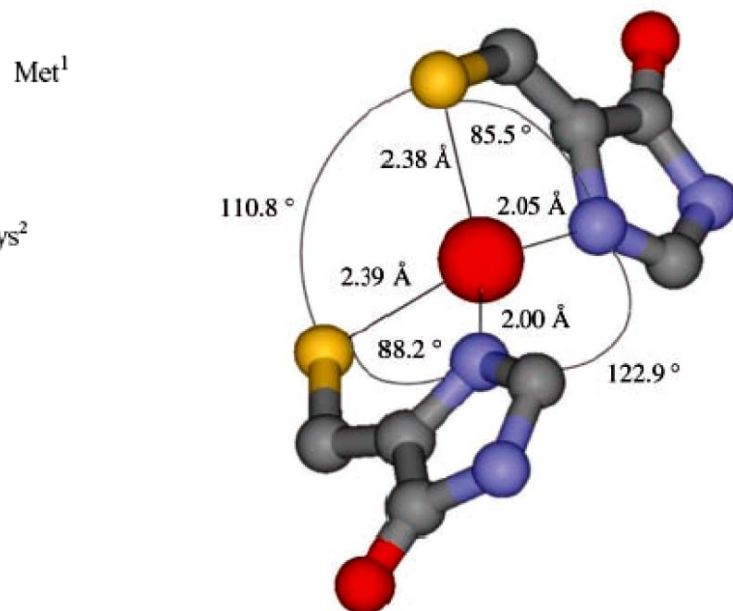


# Метанобактин - новый кофактор переноса и связывания $\text{Cu}^{2+}$ мембранной метанмонооксигеназой

## А. Структура МБ Изополиэфир



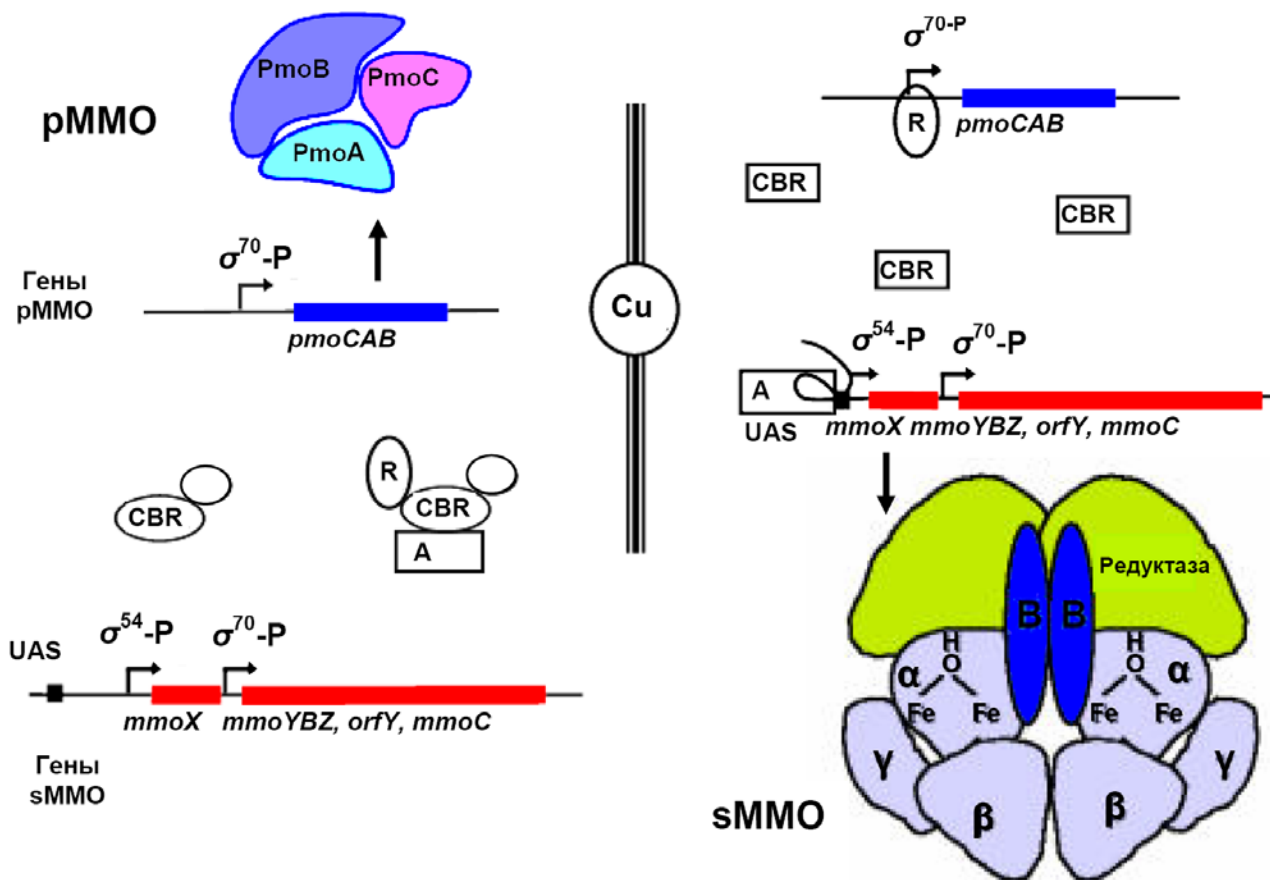
## Б. Координация $\text{Cu}^{2+}$ между двумя 4-гидрокси-5-тионил имидазолами



## В. Стереомодель метанобактина

# Модель реципрокной регуляции транскрипции генов *pMMO* и *sMMO* у *Methylosinus trichosporium* OB3b

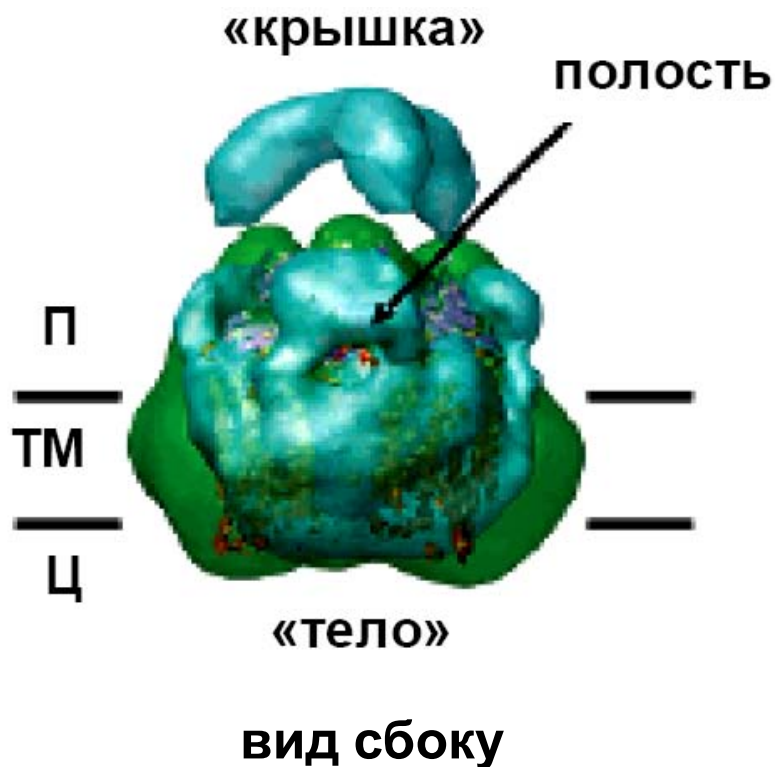
Высокое отношение меди к биомассе    Низкое отношение меди к биомассе



При высокой концентрации меди в среде предполагаемый репрессор (R) оперона *pmoCAB* связывается с  $\text{Cu}^{2+}$ -связывающим регулятором (CBR). Комплекс CBR- $\text{Cu}^{2+}$  также связывает предполагаемый активатор (A) транскрипции генов *sMMO*. В этом случае начинается транскрипция *pMMO*. При низкой концентрации меди комплекс CBR- $\text{Cu}^{2+}$  не образуется, поэтому репрессор R и активатор A находятся в свободном состоянии, что приводит к транскрипции генов *sMMO* и репрессии оперона *pmoCAB*.



# Оригинальная трехмерная модель молекулярного суперкомплекса мембранной ММО и МДГ у *Methylococcus capsulatus* Bath



П – периплазма,  
ТМ – трансмембранный домен цилиндрического тела гидроксилазы,  
Ц – цитоплазма



# Профили экспрессии генов *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

| Аннотация                                                                                          | Кратность изменений |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 9% NaCl vs 0.1% NaCl<br>экспрессия $\approx 200$ генов повышалась<br>$\approx 140$ генов снижалась |                     |
| Консервативный мембранный белок неизвестной функции                                                | 18.93               |
| <i>ptmB</i> , метанмонооксигеназа                                                                  | 11.26               |
| <i>ptmC</i> , метанмонооксигеназа                                                                  | 3.03                |
| <i>хохF</i> , вероятная дегидрогеназа                                                              | 7.04                |
| <i>fadA</i> , ацетил-КоА ацилтрансфераза                                                           | 8.99                |
| <i>fadE</i> , ацил-КоА дегидрогеназа                                                               | 8.61                |
| <i>phbB</i> , ацетоацетил-КоА редуктаза                                                            | 5.99                |
| <i>feoB</i> , Fe-транспортный белок В                                                              | 5.11                |
| Na <sup>+</sup> /P <sub>i</sub> котранспортер                                                      | 5.27                |
| <i>ectA</i> , L-2,4-диаминобутират-ацетилтрансфераза                                               | 5.03                |
| <i>ectD</i> , эктоингидроксилаза                                                                   | 4.05                |
| <i>ask</i> , аспартокиназа                                                                         | 3.13                |
| Транскрипционный регулятор TetR семейства                                                          | 25.12               |
| <i>mxaF</i> , субъединица метанолдегидрогеназы                                                     | 5.43                |
| <i>corA</i> , Cu <sup>2+</sup> -репресслируемый белок                                              | 3.47                |
| <i>nirB</i> , НАД(Ф)Н-связывающая субъединица нитритредуктазы                                      | 3.08                |
| <i>glnK</i> , азот-регулирующий белок P-II 2                                                       | 3.00                |

| Аннотация                                                                                     | Кратность изменений |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| pH 7.6 vs pH 9.0<br>экспрессия $\approx 100$ генов снижалась<br>$\approx 40$ генов повышалась |                     |
| Вероятная карбоксилэстераза                                                                   | 13.59               |
| Экскретируемый белок неизвестной функции                                                      | 10.22               |
| <i>hmuS</i> , вероятный гемин-транспортный белок                                              | 6.95                |
| <i>fae</i> , формальдегид-активирующий фермент                                                | 4.69                |
| Транспортер сульфата                                                                          | 4.24                |
| Zn/Fe пермеаза                                                                                | 3.85                |

При росте *Methylobacterium alcaliphilum* при высоких и низких значениях солености и pH, в аэробных и микроаэробных условиях существенно изменялась экспрессия многих генов.

Необходимо дальнейшее экспериментальное изучение специфических функций недавно идентифицированных генов.

# Профили экспрессии генов *Mm. alcaliphilum* 20Z (продолжение)

| Аннотация                                                                                                                  | Кратность изменений | Аннотация                                                                                     | Кратность изменений |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Микроаэробные условия по сравнению с 20% O<sub>2</sub><br/>экспрессия ≈200 генов повышалась, а ≈300 генов снижалась</b> |                     |                                                                                               |                     |
| <i>cysT</i> , белок транспортной системы сульфата                                                                          | 40.95               | <i>hmuS</i> , вероятный гемин-транспортный белок                                              | 69.00               |
| Консервативный белок неизвестной функции                                                                                   | 146.45              | <i>glnK</i> , азот-регулирующий белок P-II 2                                                  | 39.99               |
| Белок неизвестной функции                                                                                                  | 138.27              | Нитритредуктаза [НАД(Ф)Н], большая субъединица                                                | 26.771              |
| <i>fadA</i> , ацетил-KoA ацилтрансфераза                                                                                   | 32.36               | Вероятная нитритредуктаза                                                                     | 26.67               |
| <i>cysW</i> , белок транспортной системы сульфата                                                                          | 29.40               | <i>nirB</i> , нитритредуктаза [НАД(Ф)Н], большая субъединица                                  | 14.51               |
| <i>sbr</i> , сульфат-связывающий белок                                                                                     | 25.73               | АТФ-связывающие субъединицы системы транспорта нитрата                                        | 17.45               |
| <i>fae</i> , формальдегид-активирующий фермент                                                                             | 25.41               | <i>mxaF</i> , субъединица метанолдегидрогеназы                                                | 10.60               |
| <i>pmoB</i> , метанмонооксигеназа                                                                                          | 17.45               | <i>toxJ</i>                                                                                   | 10.97               |
| <i>cysA</i> , АТФ-связывающий белок-импортер сульфата/тиосульфата CysA (сульфат-транспортная АТФаза)                       | 17.17               | <i>toxG</i> , цитохром c <sub>L</sub>                                                         | 9.39                |
| <i>хоxF</i> , вероятная дегидрогеназа                                                                                      | 6.81                | <i>тоxI</i> , субъединица метанолдегидрогеназы                                                | 4.15                |
| <i>groH</i> , сигма 32 (сигма H) фактор РНК-полимеразы                                                                     | 5.93                | <i>fdhA</i> , формиатдегидрогеназа, α-субъединица                                             | 6.86                |
| <i>охyR</i> , транскрипционный регулятор LysR семейства                                                                    | 4.11                | <i>feoB</i> , fusion-белки Fe-транспортный белок В : ГТФ-связывающий белок : мембранный белок | 27.15               |

# Метаболическая гибкость *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

## Известные пути

Аэробные условия  
(20% O<sub>2</sub>)

## Предсказанные пути

Микроаэробные условия (-O<sub>2</sub>)

Метан

*pmoCAB*

Метанол

*mxaFI*

*хоxFG*

Формальдегид

ТГМП-зависимый  
C<sub>1</sub> - перенос

Формиат

*fdh*

CO<sub>2</sub>

РМФ-цикл

Сахароза,  
гликоген

Биомасса

Эктоин

ЦТК

α-КГДГ

NO<sub>3</sub> SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>

↓

N<sub>2</sub>

↓

H<sub>2</sub>S

Сериновый цикл

Биомасса

*Mm. alcaliphilum* 20Z имеет относительно большой размер генома (4.73 Мб), но, в отличие от *Methylococcus capsulatus* Bath (3.3 Мб), обладает только одной копией *rMMO* генного кластера.

Идентифицированы ключевые гены серинового цикла (*sga*, *glyA* и *hpr*), но не обнаружены гомологи генов *rsc* и *csr* этилмалонатного пути.

Выявлен полный набор генов ЦТК, включая альфа-КГДГ.

Предварительный анализ генома указывает на большую метаболическую гибкость, например, способность выживать в условиях низкого pO<sub>2</sub> (денитрификация и окисление сульфида).

## ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ/ТОЛЕРАНТНЫЕ МЕТАНОТРОФЫ – НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- структурные и трофические связи в аэробных метанотрофных сообществах экстремальных экосистем;
- первичные сигнальные молекулы, инициирующие структурно-функциональные механизмы адаптации к температуре, солености и pH;
- стратегии выживания экстремофильных/толерантных аэробных метанотрофов;
- свойства и регуляция метаномоноксигеназ у метанотрофов, адаптированных к низким концентрациям  $\text{CH}_4$  и  $\text{O}_2$ ;
- биоэнергетические механизмы и гены, контролирующие ионный гомеостаз у ацидофильных и галоалкалофильных метанотрофов;
- функциональная геномика, протеомика и филогения экстремофильных/толерантных метанотрофов;
- термоацидофильные метанотрофы филума *Verrucomicrobia* и нитчатые метанотрофы *Clonothrix* и *Crenothrix* – потенциальные объекты астромикробиологии.



## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ/ТОЛЕРАНТНЫХ МЕТАНОТРОФОВ**

- продуценты биопротекторов (эктоин), экстремозимов и стабильных биополимеров (полибутират, полисахариды);
- продуценты S-слоев для нанотехнологии и биомедицины в качестве ультрафильтрационных аффинных мембран и иммобилизационных матриц для иммуноферментного анализа;
- биоаналитические агенты (биосенсоры), агенты биodeградации алифатических и ароматических поллютантов, биоремедиации загрязненных экстремальных экосистем, дегазации угольных шахт;
- будучи устойчивыми к различным физико-химическим факторам, экстремофильные метанотрофы не требуют асептических условий культивирования и предпочтительны для биотехнологии.

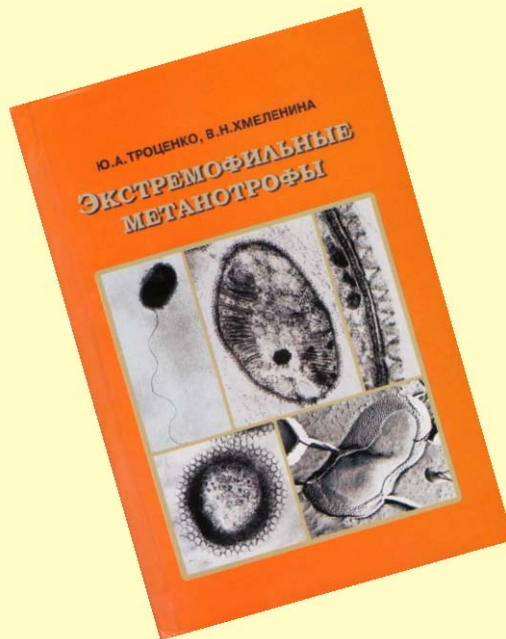
# Новые источники информации

Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. ОНТИ ПНЦ РАН, Пущино. 2008. 205 с.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н., Понаморева О.Н. Биология и биотехнология аэробных метилотрофов / Учебно-методическое пособие // Тула: Изд-во ТулГУ, 2009. 202 с.

Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.

Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Метилотрофные дрожжи // Отв. ред.: В.Ф. Гальченко. Москва: «ТР-Принт», 2011. 313 с.



*Спасибо за внимание!*