



Биоразнообразие аэробных метилотрофов

Ю.А. Троценко

Лаборатория метилотрофии

Институт Биохимии и Физиологии Микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН

Пущино, 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>Methylo- cystaceae</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	<i>Verrucomicrobia</i>
Роды:	Тип I	Тип X	Тип II			
<i>Methylomonas</i> <i>M. methanica</i> <i>M. fodinarum</i> <i>M. aurantiaca</i> <i>M. rubra</i> <i>M. scandinavica</i> <i>Methylomicrobium</i> <i>Mm. pelagicum</i> <i>Mm. agile</i> <i>Mm. album</i> <i>Mm. modesto- halophilum</i> <i>Mm. buryatense</i> <i>Mm. alcaliphilum</i> <i>Mm. kenyense</i> <i>Mm. japanense</i> <i>Methylohalobius</i> <i>Mh. crimeensis</i> <i>Methylovulum</i> <i>Mv. miyakonense</i>	<i>Methylobacter</i> <i>Mb. bovis</i> <i>Mb. chroococcum</i> <i>Mb. vinelandi</i> <i>Mb. psychrophilus</i> <i>Mb. luteus</i> <i>Mb. tundripaludum</i> <i>Mb. marinus</i> <i>Mb. capsulatum</i> <i>Methylosphaera</i> <i>Msp. hansonii</i> <i>Methylosarcina</i> <i>Mts. fibrata</i> <i>Mts. quisquilibrium</i> <i>Methylothermus</i> <i>Mlt. thermalis</i> <i>Methylosoma</i> <i>Mts. difficile</i>	<i>Methylococcus</i> <i>Mc. capsulatus</i> <i>Methylocaldum</i> <i>Md. gracile</i> <i>Md. szegediense</i> <i>Md. tepidum</i>	<i>Methylocystis</i> <i>Mc. minimus</i> <i>Mc. echinoides</i> <i>Mc. parvus</i> <i>Mc. pyriformis</i> <i>Mc. methanolicus</i> <i>Mc. rosea</i> Семейство: <i>Methylosinaceae</i> <i>Methylosinus</i> <i>Ms. trichosporium</i> <i>Ms. sporium</i>	<i>Crenothrix</i> <i>Cr. polyspora</i> <i>Clonothrix</i> <i>Cl. fusca</i>	<i>Methylocella</i> <i>Mcl. palustris</i> <i>Mcl. silvestris</i> <i>Mcl. tundrae</i> <i>Methylocapsa</i> <i>Mp. acidiphila</i> <i>Methyloferula</i> <i>Mf. sphagni</i>	<i>Methylacidiphilum</i> <i>Ma. inferorum</i> <i>Ma. fumarolicum</i> <i>Ma. kamchatkensis</i>

1990 г. – описано 5 родов (10 видов) метанотрофов

2012 г. – валидировано 20 родов (> 50 видов)

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

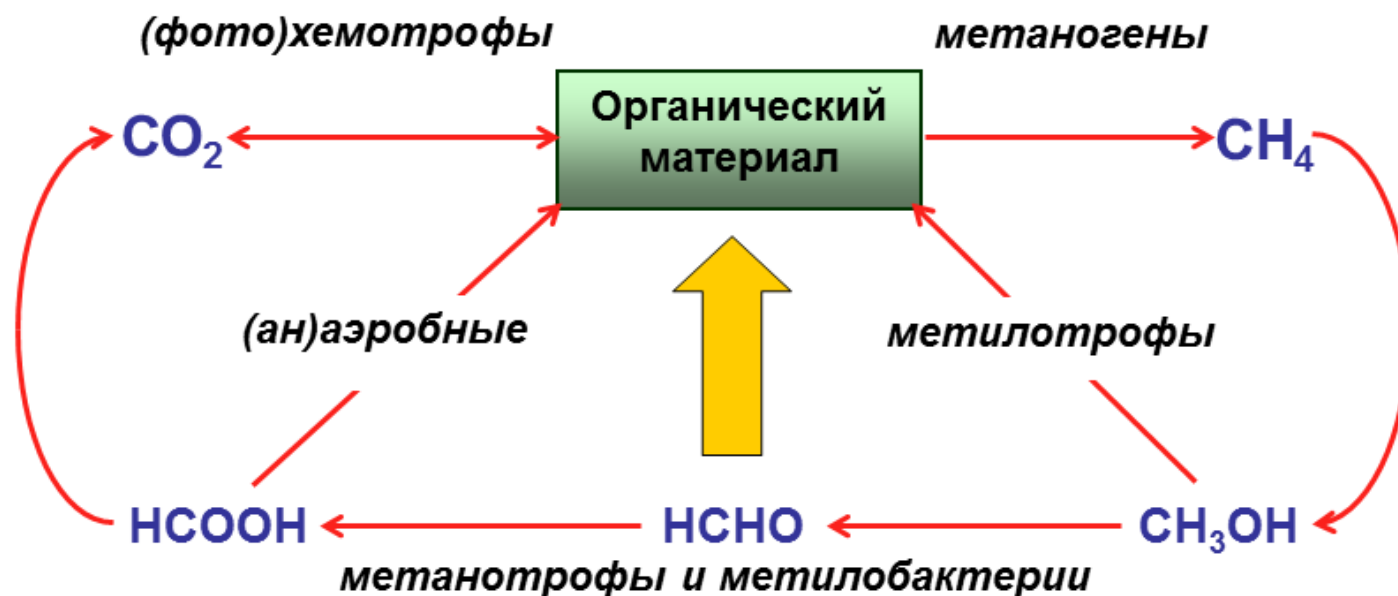
Таксономическое и экофизиологическое разнообразие аэробных метиловых бактерий

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

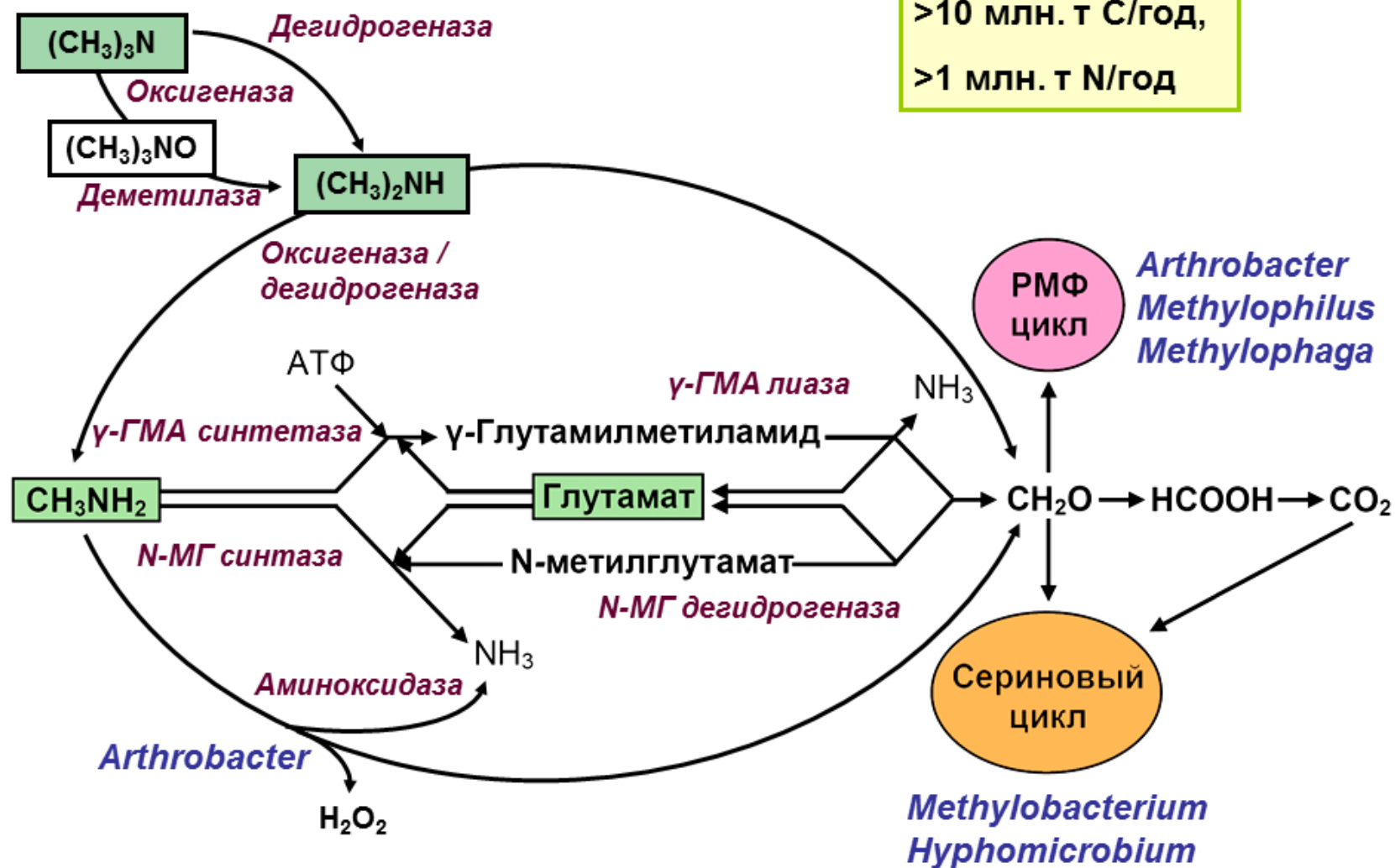


Трофические и метаболические связи анаэробных и аэробных агентов метанового цикла Зёнгена в глобальных биосферных циклах углерода (Гт С/г)

Парниковые газы:	CO_2	~ 1500
	CH_4	~ 800 (наибольший "парниковый" эффект)
	CH_3OH	~ 300

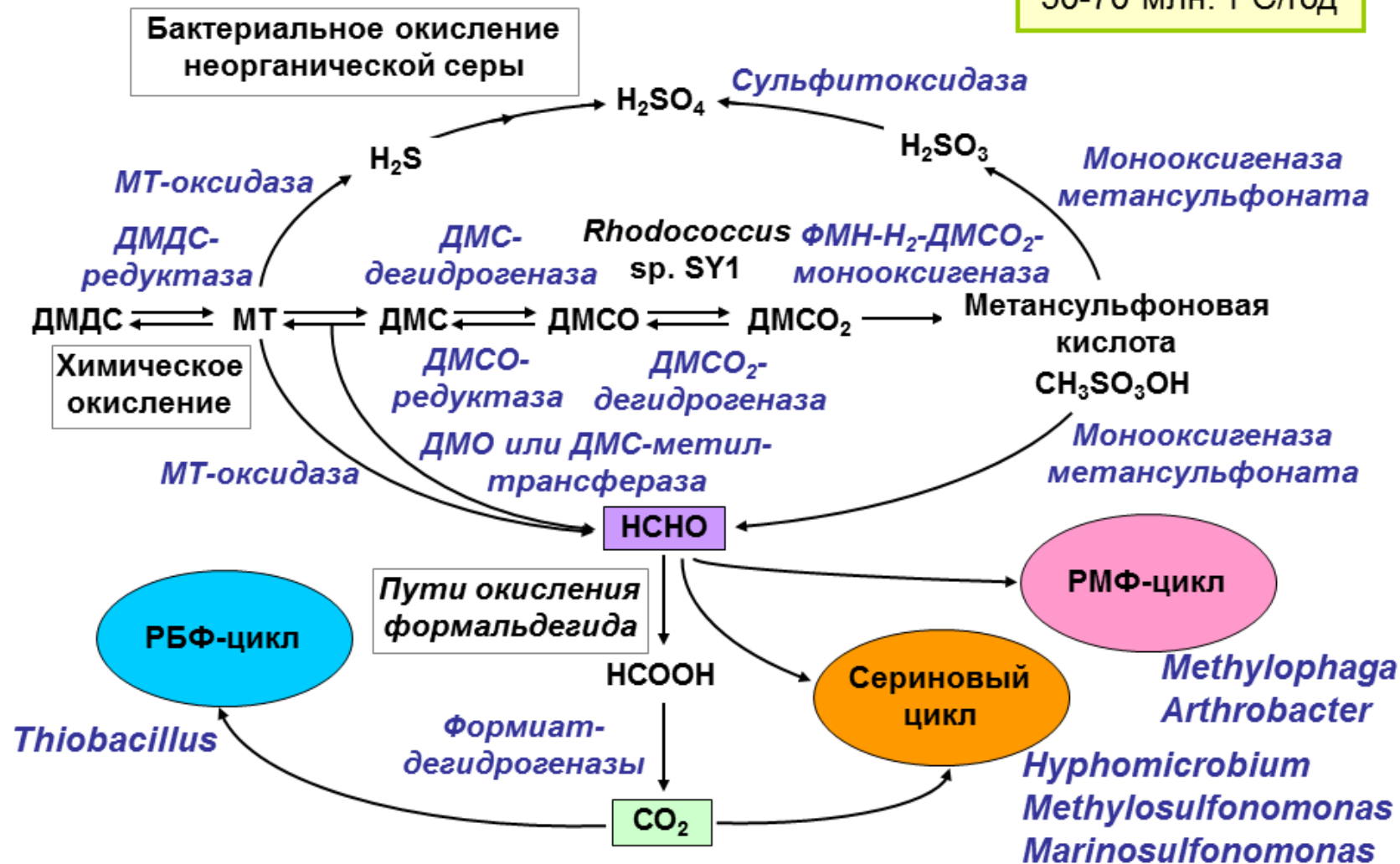
Роль аэробных метиловых бактерий в глобальных биосферных циклах метилированных аминов

>10 млн. т С/год,
>1 млн. т N/год



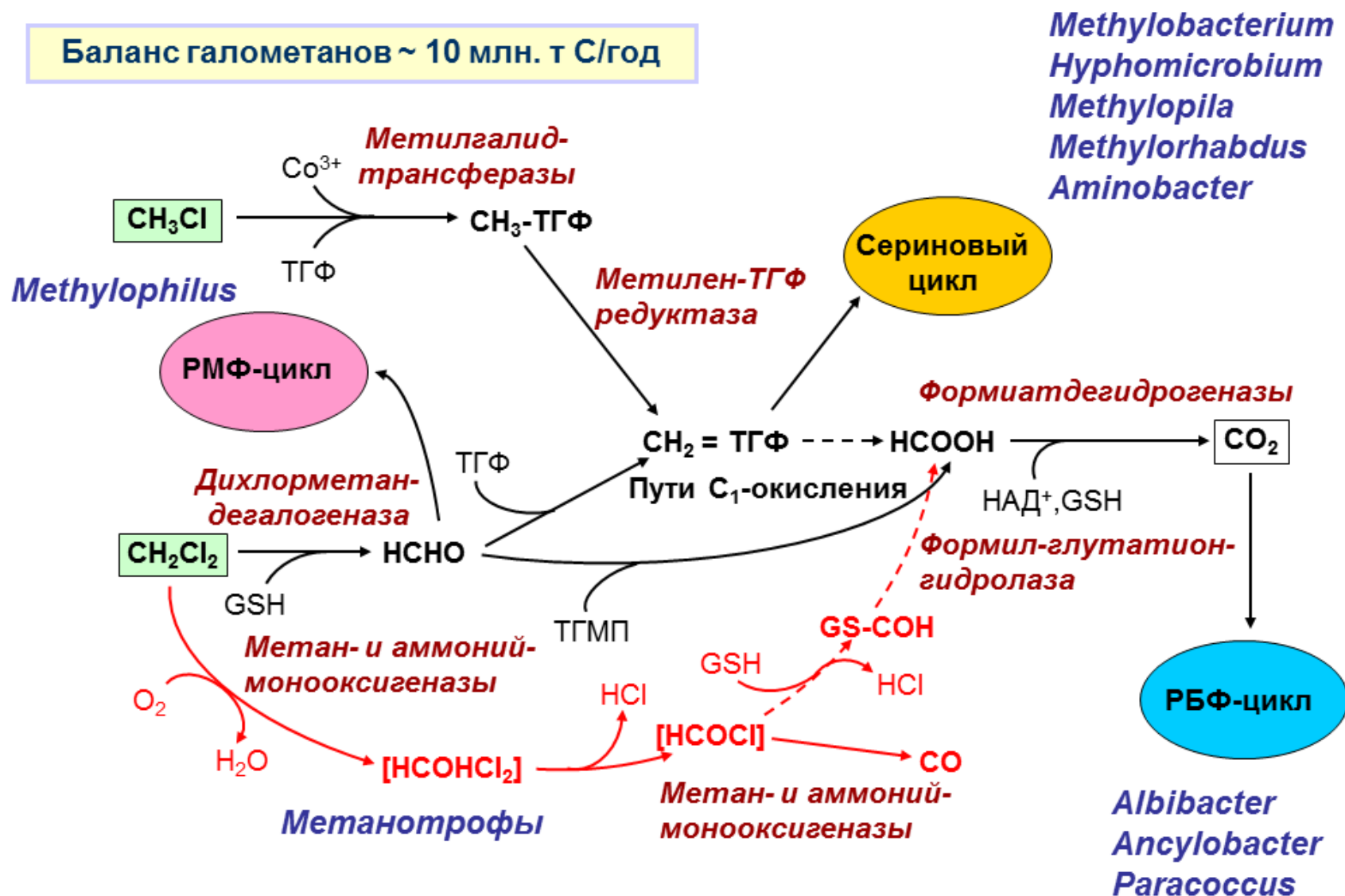
Роль аэробных метиловобактерий в глобальных биосферных циклах метилсернистых соединений

50-70 млн. т С/год

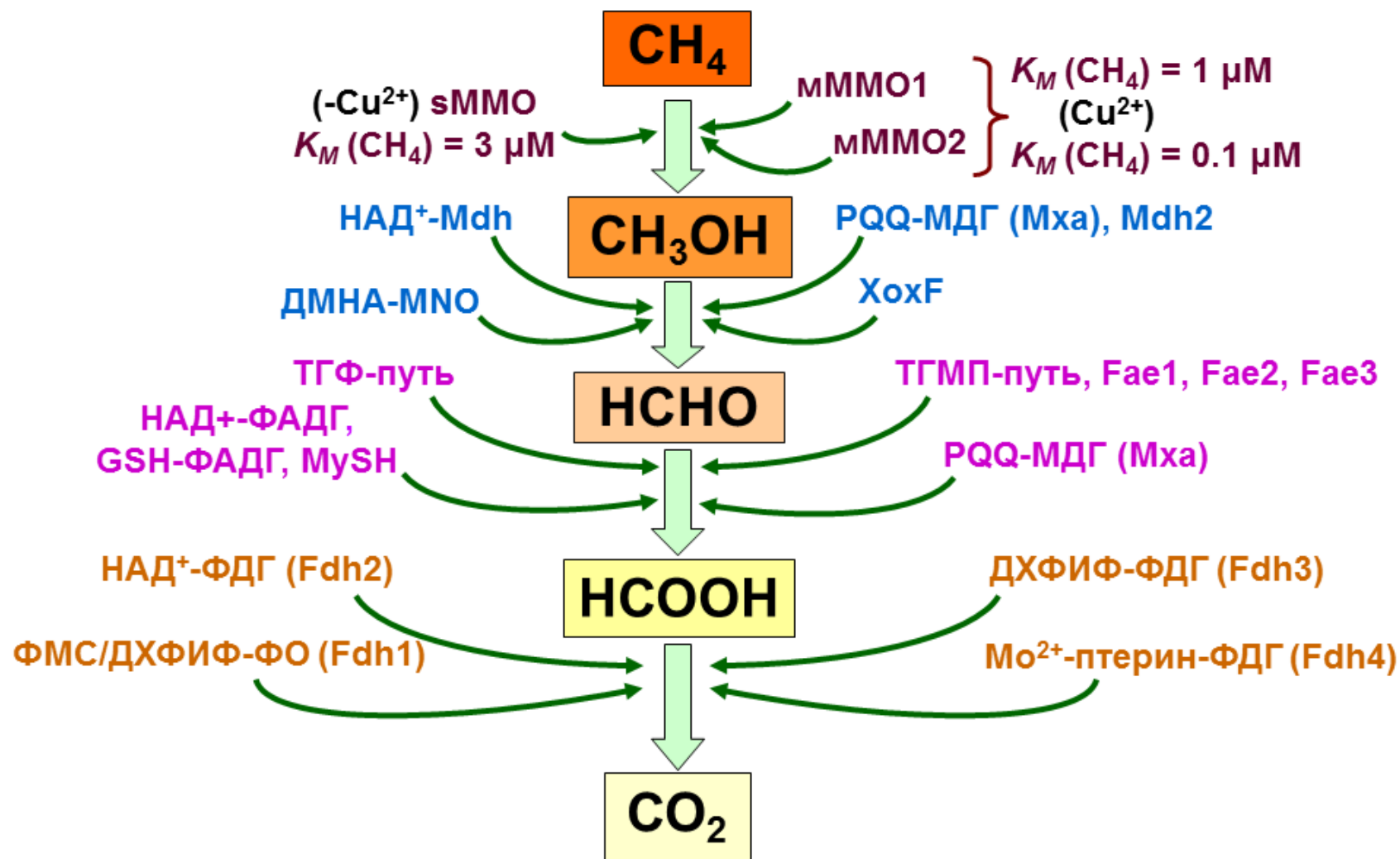


Роль аэробных метилотрофов в биodeградации галометанов

Баланс галометанов ~ 10 млн. т С/год



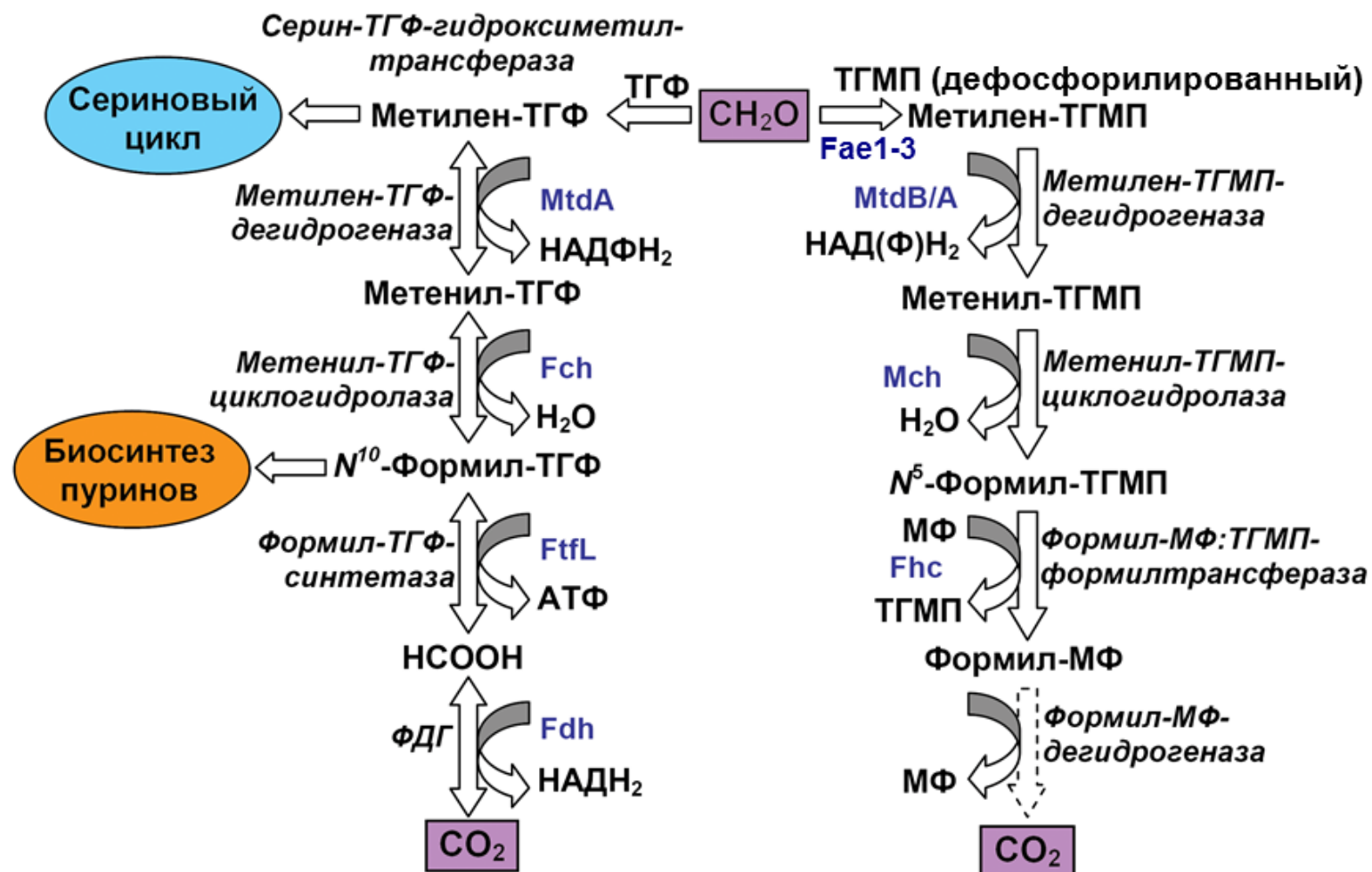
Множественные молекулярные формы ферментов первичного окисления C_1 -соединений у метилотрофных бактерий



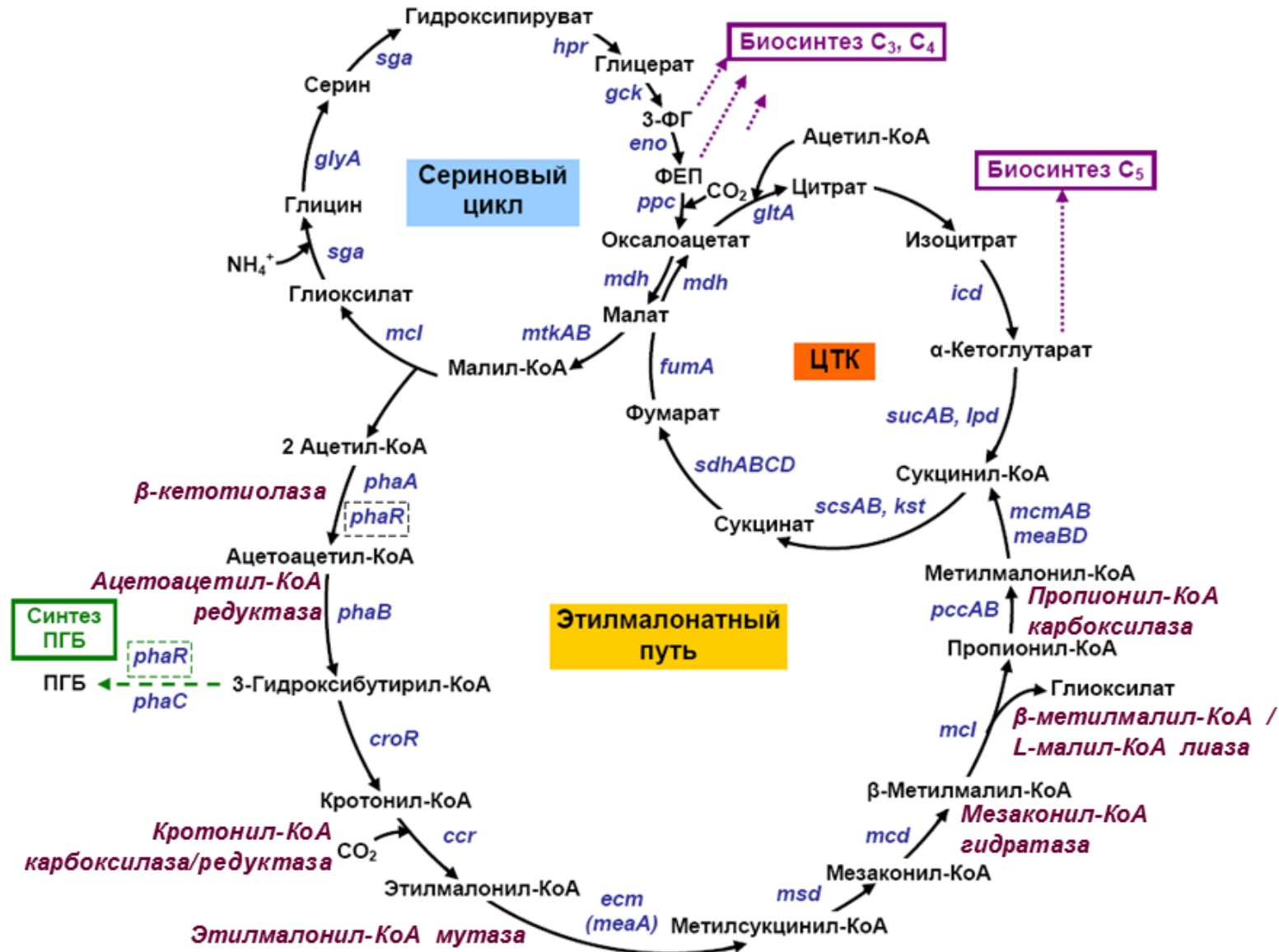
Птериновые пути окисления формальдегида у аэробных метилотрофных бактерий

Тетрагидрофолатный путь

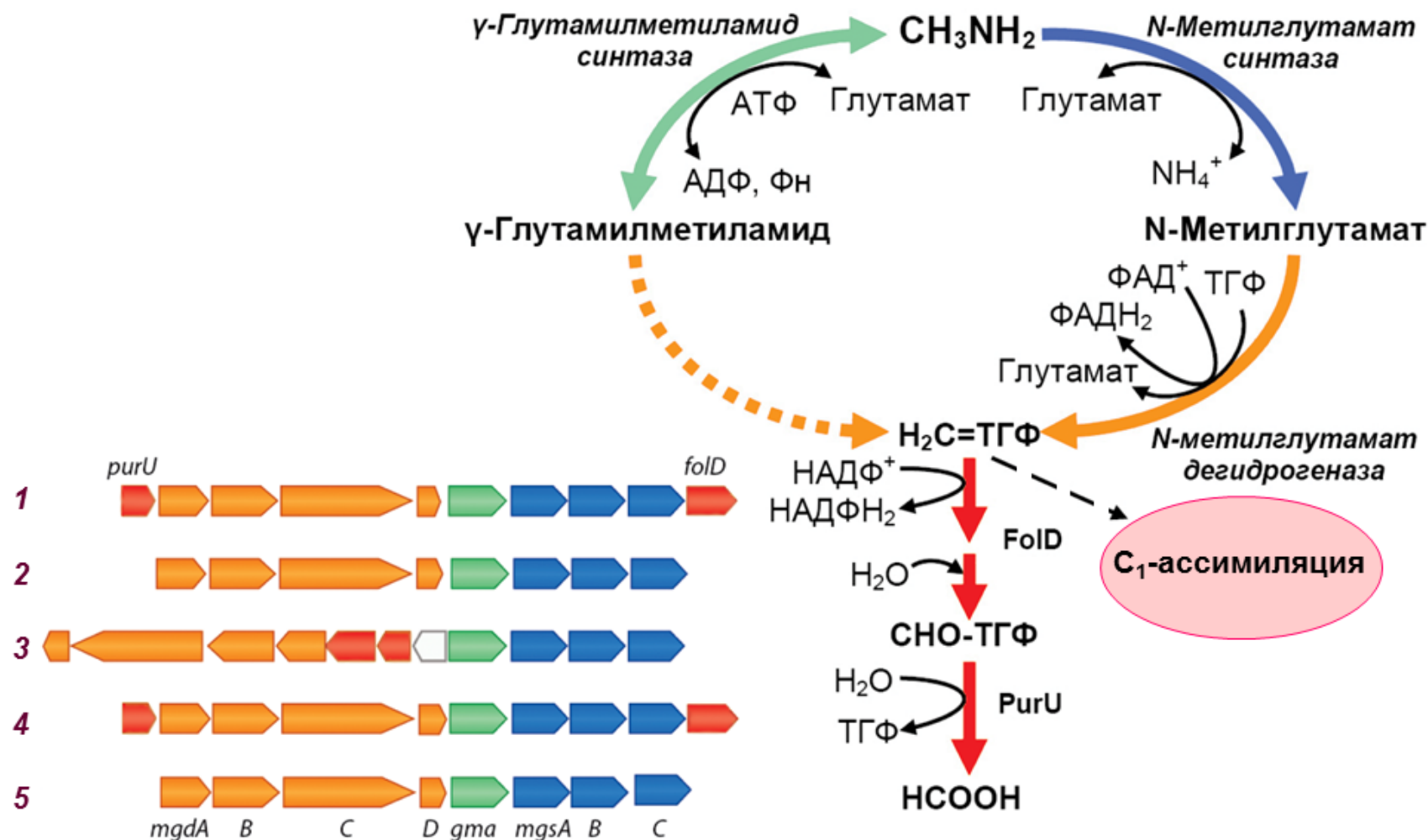
Тетрагидрометаноптериновый путь



Ферменты и гены ицл серинового пути

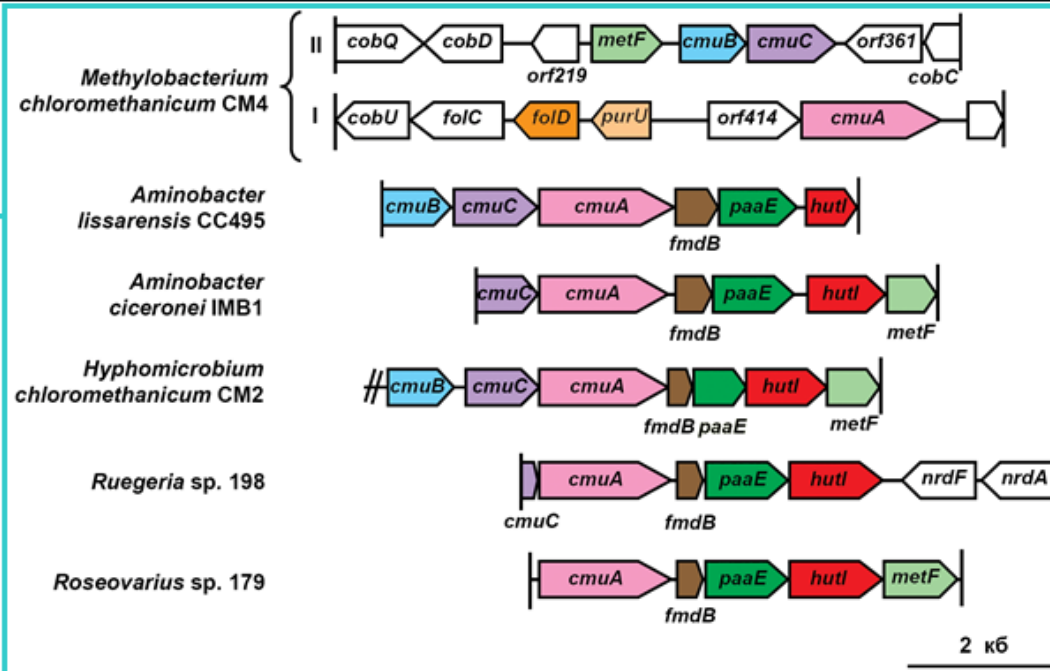
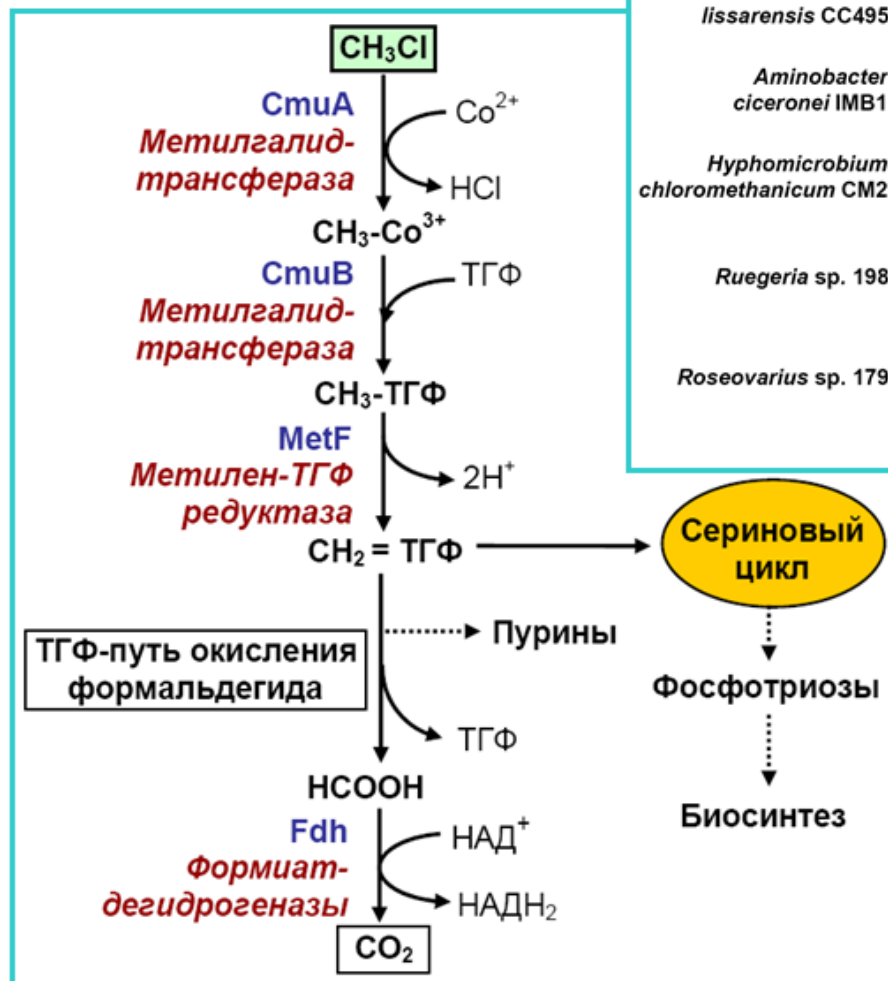


Гены и ферменты N-метилглутаматного пути у метиловых бактерий

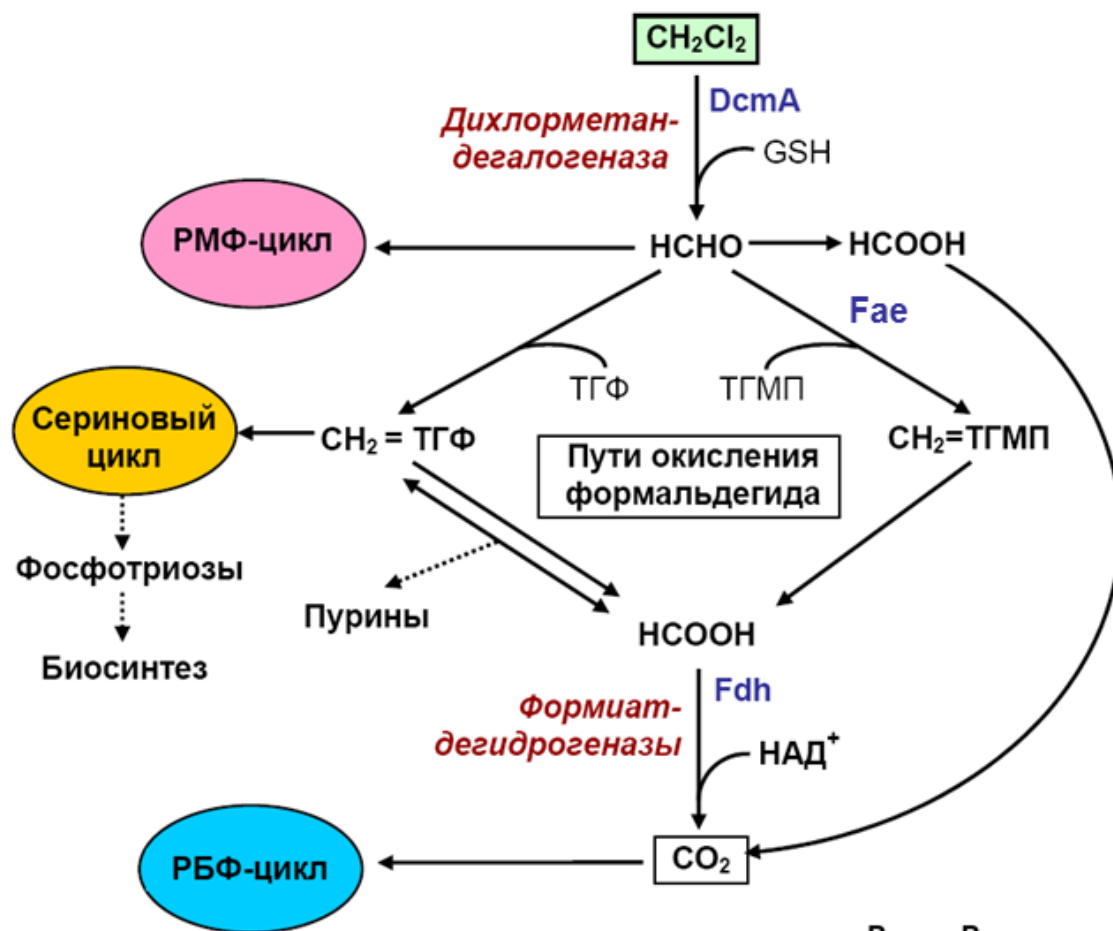


- 1 - *Burkholderia phymatum*, 2 - *Methylobacillus flagellatus*,
 3 - *Pseudomonas mendocina*, 4 - *Thiomicrospira crunogena*,
 5 - *Methyloversatilis universalis*

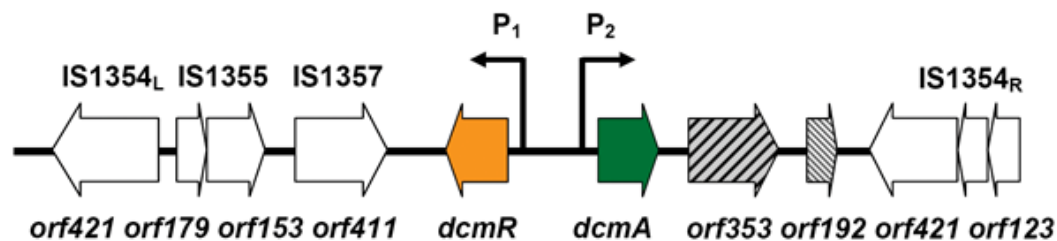
Гены и ферменты биодegradации хлорметана у метиловых бактерий



Гены и ферменты биодegradации дихлорметана у метиловых бактерий



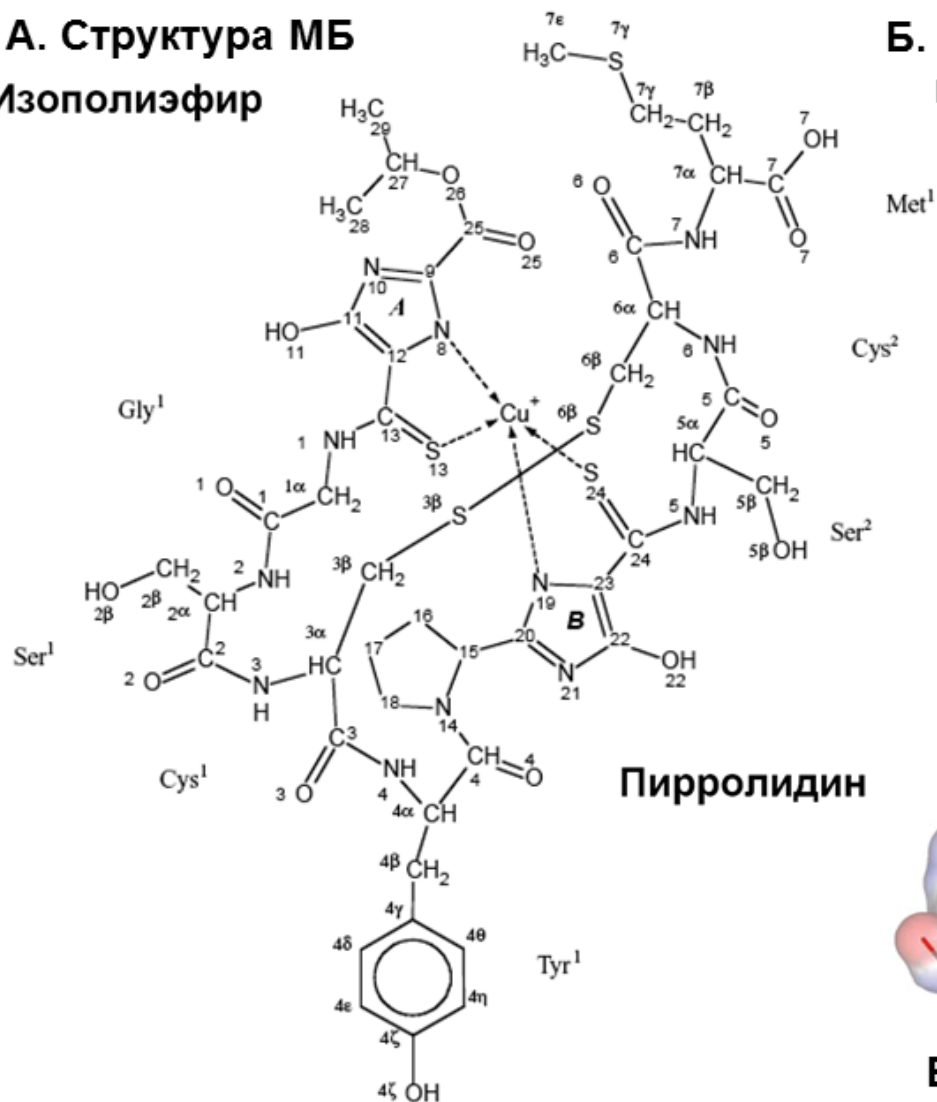
*Methylobacterium
dichloromethanicum* DM4



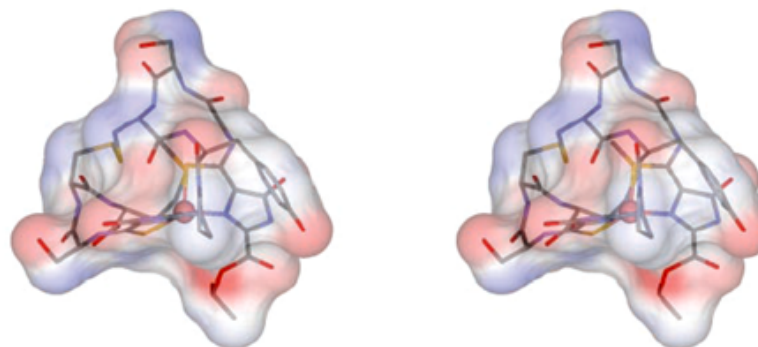
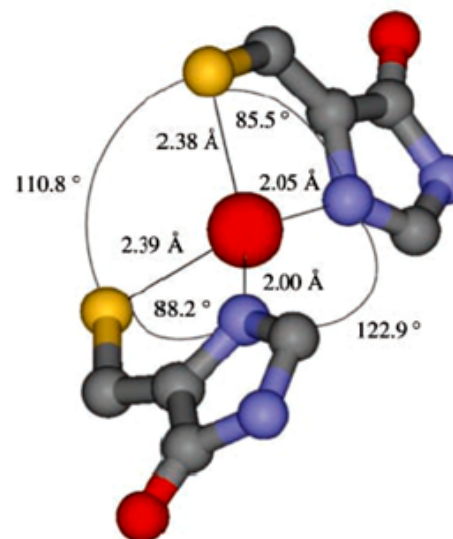
Метанобактин - новый кофактор переноса и связывания Cu^{2+} мембранной метанмонооксигеназой

А. Структура МБ

Изополиэфир



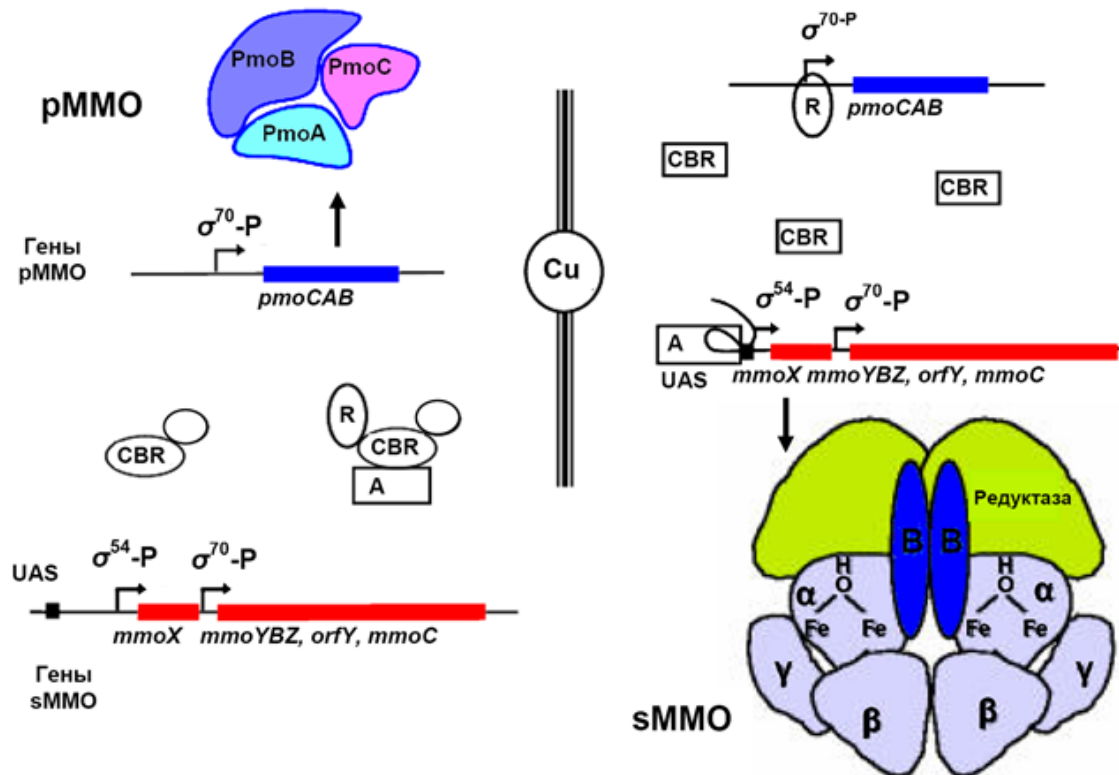
Б. Координация Cu^{2+} между двумя 4-гидрокси-5-тионил имидазолами



В. Стереомодель метанобактина

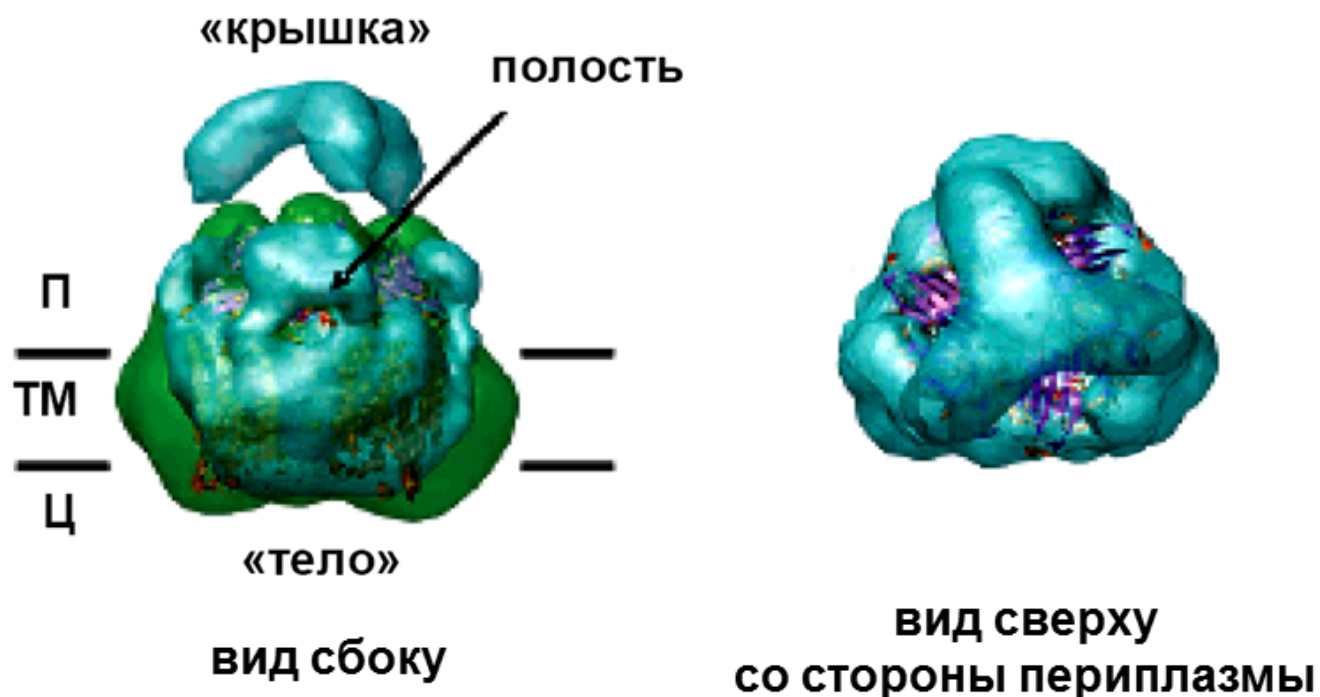
Модель реципрокной регуляции транскрипции генов *pMMO* и *sMMO* у *Methylosinus trichosporium* OB3b

Высокое отношение меди к биомассе Низкое отношение меди к биомассе



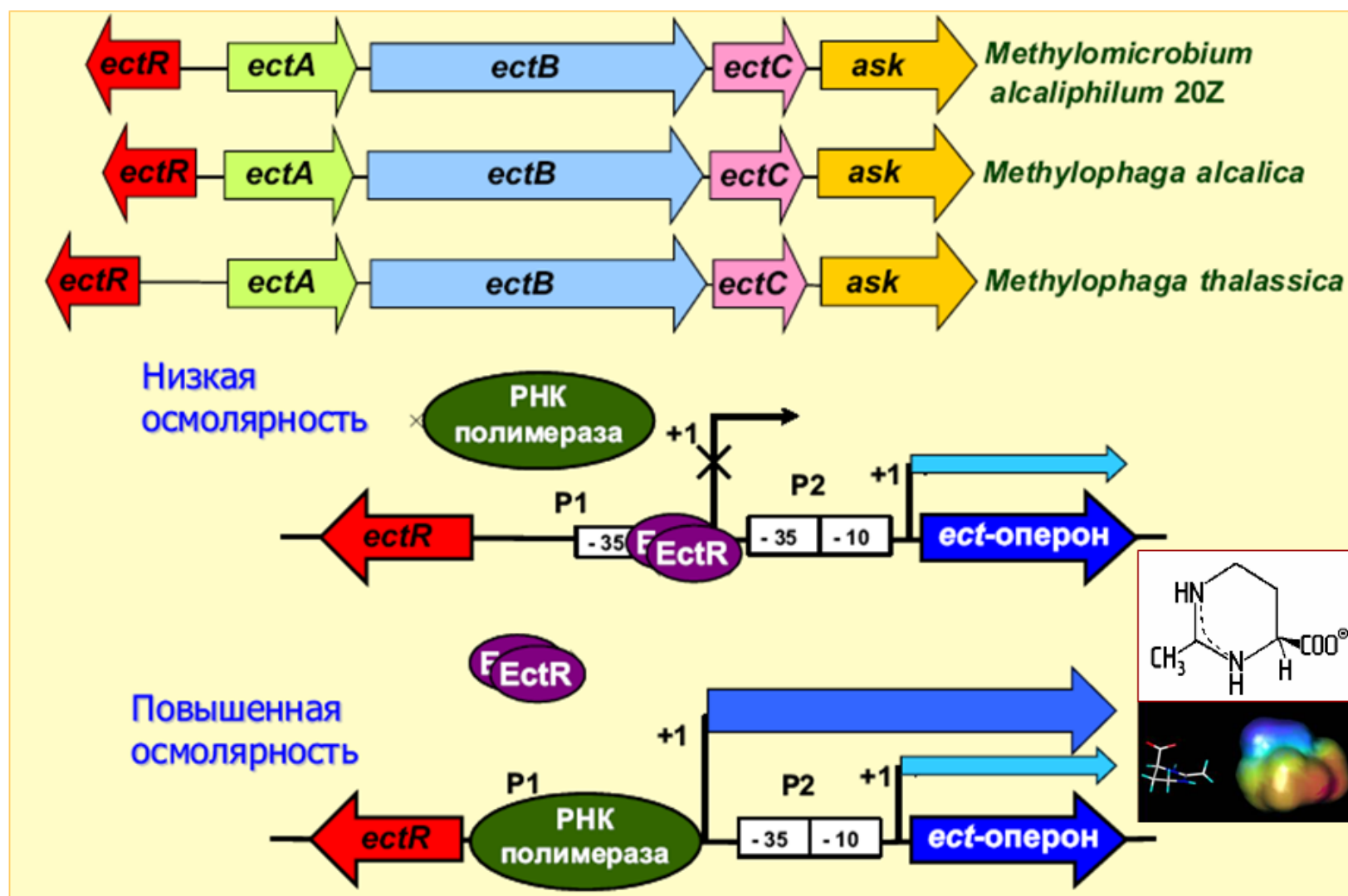
При высокой концентрации меди в среде предполагаемый репрессор (R) оперона *pmmO* связывается с Cu^{2+} -связывающим регулятором (CBR). Комплекс CBR- Cu^{2+} также связывает предполагаемый активатор (A) транскрипции генов *sMMO*. В этом случае начинается транскрипция *pMMO*. При низкой концентрации меди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

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



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

Структурная организация ect-оперонов и регуляция биосинтеза эктоина у аэробных метилотрофных бактерий



Профили экспрессии генов *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

Аннотация	Кратность изменений
9% NaCl vs 0.1% NaCl экспрессия ≈200 генов повышалась ≈140 генов снижалась	
Консервативный мембранный белок неизвестной функции	18.93
<i>pmoB</i> , метанмонооксигеназа	11.26
<i>pmoC</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 ⁺ /P _i 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 ²⁺ -репрессируемый белок	3.47
<i>nirB</i> , НАД(Ф)Н-связывающая субъединица нитритредуктазы	3.08
<i>glnK</i> , азот-регулирующий белок Р-II 2	3.00

Аннотация	Кратность изменений
pH 7.6 vs pH 9.0 экспрессия ≈100 генов снижалась ≈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

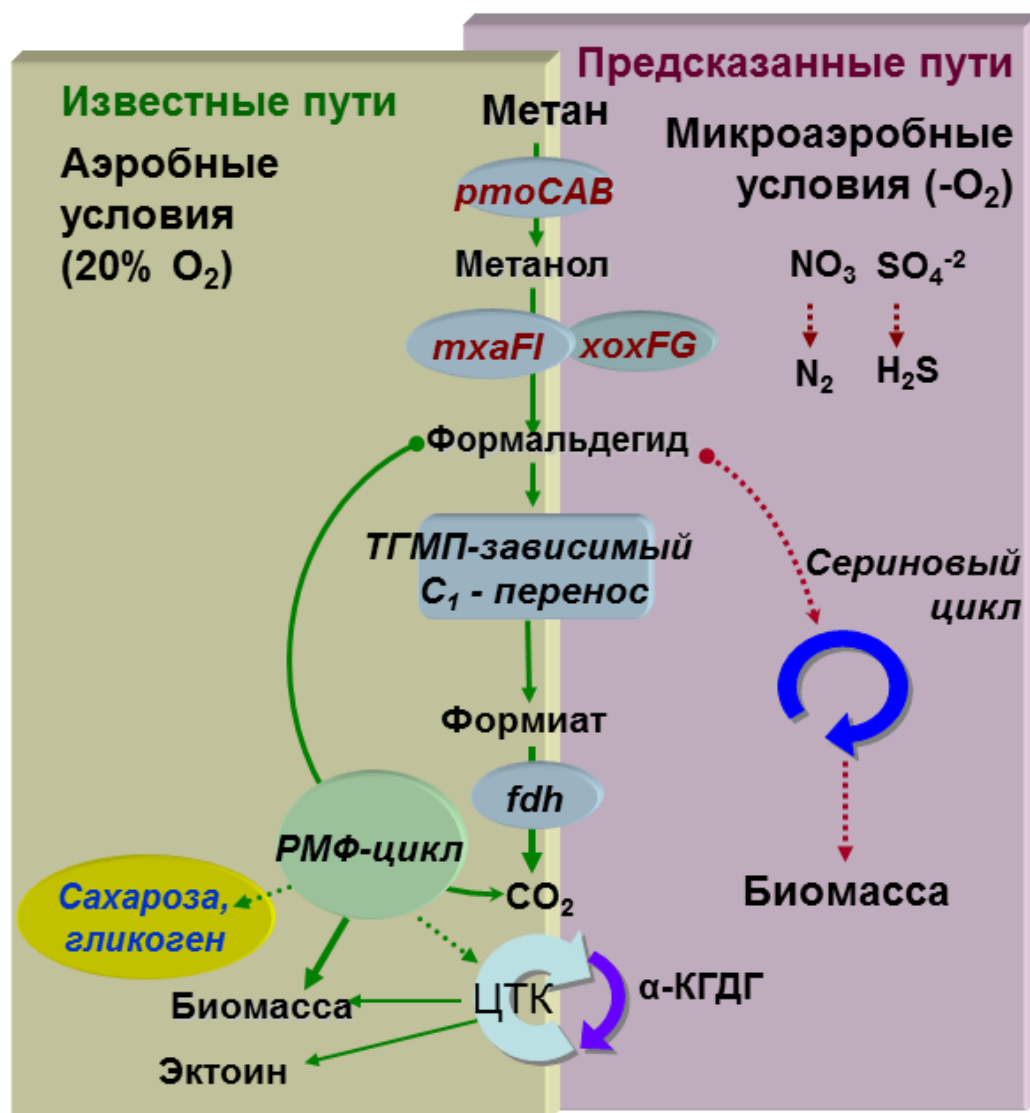
При росте *Methylobacterium alcaliphilum* при высоких и низких значениях солености и pH, в аэробных и микроаэробных условиях существенно изменялась экспрессия многих генов.

Необходимо дальнейшее экспериментальное изучение специфических функций недавно идентифицированных генов.

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

Аннотация	Кратность изменений	Аннотация	Кратность изменений
Микроаэробные условия по сравнению с 20% O₂ экспрессия ≈200 генов повышалась, а ≈300 генов снижалась			
<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-КоА 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>sbp</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 _L	9.39
<i>хохF</i> , вероятная дегидрогеназа	6.81	<i>тохI</i> , субъединица метанолдегидрогеназы	4.15
<i>groH</i> , сигма 32 (сигма H) фактор РНК-полимеразы	5.93	<i>fdhA</i> , форматдегидрогеназа, α-субъединица	6.86
<i>oxyR</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



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 рММО генного кластера.

Идентифицированы ключевые гены серинового цикла (*sga*, *glyA* и *hpr*), но не обнаружены гомологи генов *rss* 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 рО₂ (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 CH_4 и 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!