

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.873.6
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-26-36>

Поступила в редакцию 04.09.2020
Received 04.09.2020

А. А. Букляревич, М. А. Титок

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

Аннотация. Анализ генов и кодируемых ими белков GroEL бактерий рода *Rhodococcus*, способного деградировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, показал, что данные детерминанты могут быть использованы в качестве молекулярно-генетических маркеров для видовой идентификации. Разработана схема, позволяющая на основании рестрикционного анализа продуктов ПЦР генов *groEL* с применением рестриктаз *BglI*, *NarI*, *SfiI*, *SinI* и *RseI* устанавливать видовую принадлежность природных бактерий рода *Rhodococcus*. Аннотировано 52 локуса генома, определяющие устойчивость бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap к стрессовым условиям среды (49 структурных и 4 регуляторных гена, детерминирующих синтез 23 белков теплового шока, 9 универсальных стрессовых белков, 17 цитохромов P450). Среди изученных детерминант выявлены уникальные нуклеотидные последовательности плазмидного и хромосомного происхождения, кодирующие синтез белка теплового шока DnaK (1 плазмидный ген) и цитохромов P450 (2 хромосомных и 1 плазмидный), которые могут использоваться для молекулярного типирования биотехнологического штамма *R. pyridinivorans* 5Ap.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, белки теплового шока, идентификация, *groESL*, рестрикционный анализ

Для цитирования: Букляревич, А. А. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации природных бактерий рода *Rhodococcus* / А. А. Букляревич, М. А. Титок // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 26–36. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-26-36>

Hanna A. Bukliarevich, Marina A. Titok

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS MARKERS FOR IDENTIFICATION OF *RHODOCOCCUS* BACTERIA SPECIES

Abstract. It was established that *groEL* genes can be used as molecular genetic markers for species identification of *Rhodococcus* bacteria. A restriction analysis scheme was developed for the PCR products of *groEL* genes using restriction enzymes *BglI*, *NarI*, *SfiI*, *SinI*, and *RseI* to identify the species of natural *Rhodococcus* bacteria. Fifty-two genome loci determining the resistance to stressful environmental condition were annotated in genome of *R. pyridinivorans* strain 5Ap (i.e. 49 structural and 4 regulatory genes that determine the synthesis of 23 heat shock proteins, 9 universal stress proteins, 17 P450 cytochromes). The unique nucleotide sequences encoding the synthesis of the heat shock protein DnaK (1 plasmid gene) and P450 cytochromes (2 chromosomal and 1 plasmid) were found among these genes. Thus, they can be used for molecular typing of the biotechnological *R. pyridinivorans* strain 5Ap.

Keywords: *Rhodococcus*, heat shock proteins, identification, *groESL*, restriction analysis

For citation: Bukliarevich H. A., Titok M. A. Molecular-genetic analysis markers for identification of *Rhodococcus* bacteria species. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 1, pp. 26–36 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-1-26-36>

Введение. Определение видового статуса является важным этапом изучения природных микроорганизмов. Видовой статус позволяет судить о степени биологической безопасности микроорганизмов (патогенный, условно патогенный и непатогенный), служит основой для изучения особенностей генетической организации и является залогом успешного практического использования. Определенный научный интерес представляет систематика бактерий рода *Rhodococcus*. Представители данной таксономической группы, характеризующиеся способностью деградировать широкий спектр органических и неорганических субстратов, продуцировать поверхностно-активные соединения, широко используются в области экологической биотехнологии [1]. В то же время некоторые виды являются патогенами животных (например, *R. equi*) и растений

(например, *R. fascians*) [2]. Для идентификации родококков используют целый арсенал физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов [3]. Особое внимание уделяют патогенам. Например, для выявления патогенных бактерий *R. equi* (синоним *R. hoagie*) используют нуклеотидные последовательности генов *vapA*, *vapN*, *choE*, *gapdh*, *mdh*, *rpoB*, *adk*, *tpi*, *iel*, *recA* [4–8]. Систематика почвенных бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus* разработана в меньшей степени.

Традиционно для диагностики данных микроорганизмов используют последовательности генов 16S рНК [9] и некоторые другие генетические маркеры (например, гены, кодирующие катехолдиоксигеназы, алканмоноксигеназы, гиразы) [7, 10]. Однако знание полных нуклеотидных последовательностей отдельных детерминант и даже целых геномов не всегда позволяет установить точный видовой статус природных изолятов. Филогенетический анализ бактерий рода *Rhodococcus*, основанный на сходстве нуклеотидных последовательностей геномов, жизненно важных генов и консервативных белков, позволил выделить 7 филогенетических групп (А, В, С, D, Е, F и G) [11]. При этом виды, входящие в состав одной филогенетической линии, характеризуются высоким сходством генов 16S рНК (до 99 %), что не позволяет идентифицировать их на основании анализа данной детерминанты [11].

Особые затруднения вызывают представители филогенетических линий, представленных разными видами. В этом плане наиболее разнообразными являются группа В (представлена видами *R. coprophilus*, *R. aetherivorans*, *R. ruber*, *R. pyridinivorans*, *R. biphenylivorans*, *R. rhodochrous*) и С (представлена видами *R. opacus*, *R. imtechensis*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*). Следует отметить, что сложности в систематике возникают при идентификации любых микроорганизмов, выделенных из природной среды обитания. Особую сложность представляет идентификация почвенных изолятов. В силу аккумуляции в почвах различного рода химических соединений выживание микробной популяции обеспечивается горизонтальным переносом генов, что приводит к появлению новых фенотипических признаков, не характерных для типичных представителей вида. С развитием методов полногеномного секвенирования сформировано более четкое понятие о видовом пангеноме. При этом понятие вида не утратило своей актуальности и имеет большое значение для выявления патогенных микроорганизмов и микроорганизмов, перспективных в биотехнологическом отношении.

В качестве маркеров, позволяющих идентифицировать природные микроорганизмы (в частности, род *Rhodococcus*), необходимо использовать генетические детерминанты, характеризующиеся консервативностью и вариабельностью. В этом плане определенный интерес представляют гены, детерминирующие синтез белков теплового шока. Данные детерминанты выявляются в клетках всех живых организмов, а их продукты являются ключевыми в процессах адаптации к стрессовым условиям среды. Поскольку бактерии рода *Rhodococcus* способны существовать в экстремальных условиях, не пригодных для жизнедеятельности других организмов (например, в присутствии широкого спектра углеводов, ионов тяжелых металлов, при повышенном содержании NaCl, экстремальных значениях температуры и pH-среды), системы адаптации этих бактерий должны быть организованы таким образом, чтобы обеспечить их выживание под действием стрессовых факторов. Подобно системам деградации, гены адаптации могут быть представлены несколькими копиями хромосомного и внехромосомного происхождения [12] и характеризоваться видо- и даже штаммоспецифичностью. Поиск и характеристика таких детерминант позволят не только определить видовой статус вновь выделенных микроорганизмов рода *Rhodococcus*, но и провести паспортизацию биотехнологически важных штаммов для их дальнейшего коммерческого использования.

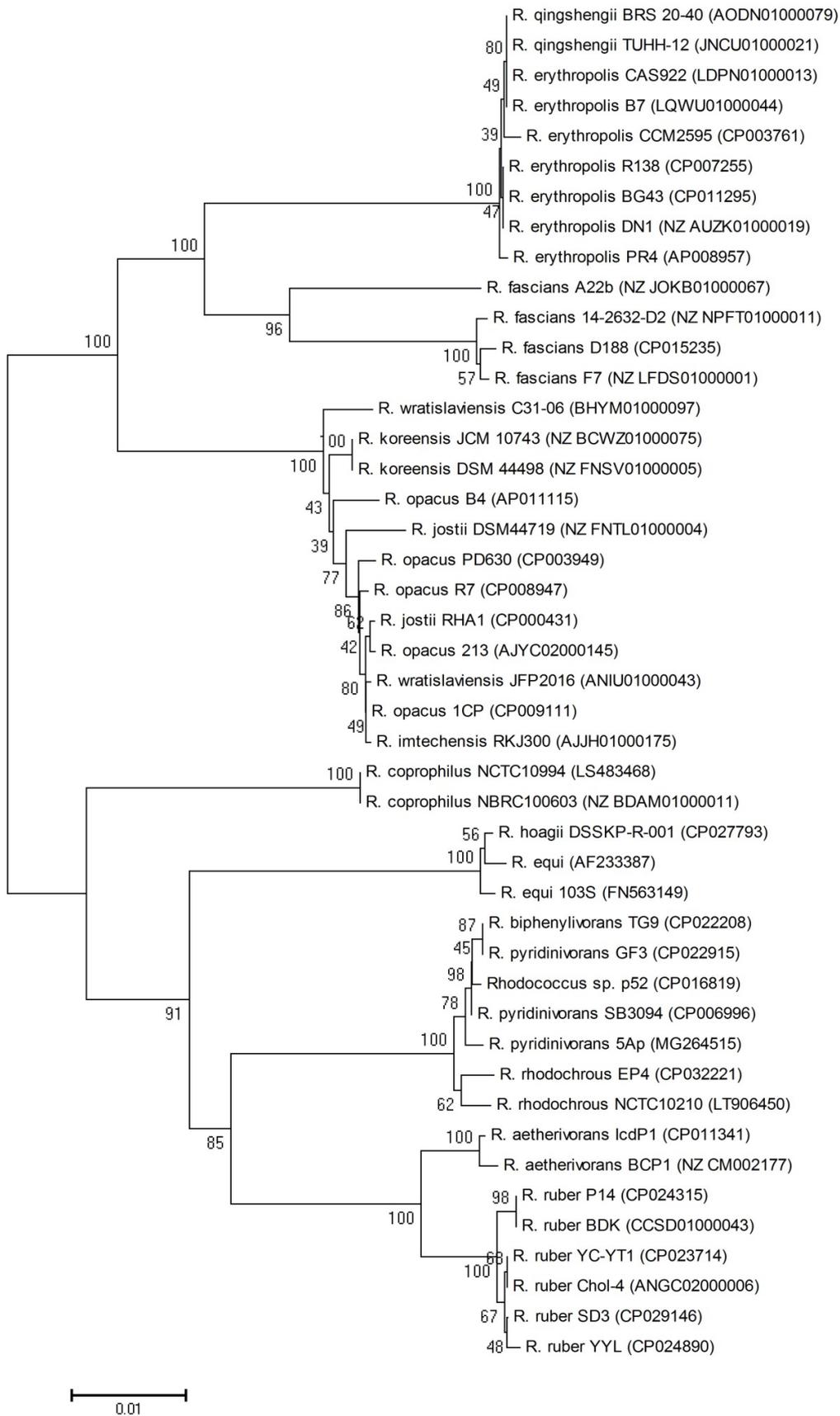
Цель настоящего исследования – молекулярно-генетический анализ генов, кодирующих белки теплового шока бактерий рода *Rhodococcus*, пригодных для их видовой идентификации, а также поиск детерминант для типирования биотехнологического штамма *R. pyridinivorans* 5Ap, способного деградировать широкий спектр органических субстратов в стрессовых условиях среды (экстремальная температура, осмолярность, наличие тяжелых металлов, высокие и низкие значения pH-среды и др.).

Материалы и методы исследования. В ходе работы были использованы нуклеотидные последовательности бактерий из базы данных GenBank *R. jostii* RHA1 (CP000431), *R. jostii* DSM 44719 (NZ_FNTL01000004), *R. opacus* B4 (AP011115), *R. opacus* R7 (CP008947), *R. opacus* PD630 (CP003949), *R. opacus* 1CP (CP009111), *R. opacus* 213 (AJYC02000145), *R. wratislaviensis* C31-06 (BHYM01000097), *R. wratislaviensis* JFP2016 (ANIU01000043), *R. koreensis* JCM 10743 (NZ_BCWZ01000075), *R. koreensis* DSM 44498 (NZ_FNSV01000005), *R. imtechensis* RKJ300 (AJJH01000175), *R. erythropolis* R138 (CP007255), *R. erythropolis* BG43 (CP011295), *R. erythropolis* CCM2595 (CP003761), *R. erythropolis* PR4 (AP008957), *R. erythropolis* B7 (LQWU01000044), *R. erythropolis* CAS922 (LDPN01000013), *R. erythropolis* DN1 (NZ_AUZZK01000019), *R. qingshengii* BRS 20-40 (AODN01000079), *R. qingshengii* TUHH-12 (JNCU01000021), *R. fascians* D188 (CP015235), *R. fascians* F7 (NZ_LFDS01000001), *R. fascians* A22b (NZ_JOKB01000067), *R. fascians* 14-2632-D2 (NZ_NPFT01000011), *R. coprophilus* NCTC10994 (LS483468), *R. coprophilus* NBRC100603 (NZ_BDAM01000011), *R. aetherivorans* IcdP1 (CP011341), *R. aetherivorans* BCP1 (NZ_CM002177), *R. ruber* YC-YT1 (CP023714), *R. ruber* SD3 (CP029146), *R. ruber* YYL (CP024890), *R. ruber* P14 (CP024315), *R. ruber* BDK (CCSD01000043), *R. ruber* Chol-4 (ANGC02000006), *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996), *R. pyridinivorans* 5Ap (MG264515.1), *R. biphenylivorans* TG9 (CP022208.1), *R. pyridinivorans* GF3 (CP022915), *Rhodococcus* sp. p52 (CP016819), *Rhodococcus* sp. 2G (CP018063), *R. rhodochrous* EP4 (CP032221), *R. rhodochrous* NCTC10210 (LT906450), *R. hoagii* DSSKP-R-001 (CP27793), *R. equi* 103S (FN563149), *R. equi* (AF233387).

Для поиска последовательностей генов, определяющих устойчивость бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap к стрессовым условиям среды, использовали программу SnapGene Viewer (последовательность генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap размещена на сайте www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html). Молекулярно-генетический анализ проводили с помощью программы BLAST, используя методы анализа нуклеотидных (алгоритмы megablast и blastn) и аминокислотных последовательностей, филогенетический анализ – с помощью программы MEGA, используя метод ближайших соседей (Neighbor – Joining).

Результаты и их обсуждение. Для выявления и идентификации природных бактерий рода *Rhodococcus* использовали гены, детерминирующие синтез белков теплового шока *groEL*. Данные белки являются ключевыми в системе адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям среды. Присутствуя в геноме всех живых организмов, они характеризуются разным числом копий с разным нуклеотидным составом [12]. Для установления возможности использования данных детерминант для идентификации бактерий рода *Rhodococcus* проведен анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей генов *groEL2* размером 1626 п. н., кодирующих полипептиды, состоящие из 541 аминокислоты. Показано, что для ряда представителей актиномицетов данные детерминанты являются жизненно необходимыми [13–15].

Для филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности генов *groEL2* бактерий, наиболее широко представленных в базе данных NCBI (гены бактерий групп А, В, С, D и Е). Именно представители этих филогенетических линий наиболее часто выявляются в природной среде и характеризуются биodeградативными свойствами (представители групп В, С и D) либо являются патогенами растений (группа Е) и животных (группа А). В результате было установлено, что гены *groEL2* характеризуются несколько отличным от 16S рРНК филогенетическим родством. Данные детерминанты близкородственных видов достоверно отличаются между собой. В частности, гены *groEL2* группы В, включающей виды *R. coprophilus*, *R. aetherivorans*, *R. ruber*, *R. pyridinivorans*, *R. biphenylivorans* и *R. rhodochrous*, разбиваются на три филогенетические подгруппы, представленные детерминантами бактерий видов *R. coprophilus* (условно подгруппа 1), *R. pyridinivorans*, *R. biphenylivorans* и *R. rhodochrous* (условно подгруппа 2), *R. aetherivorans* и *R. ruber* (условно подгруппа 3). При этом внутри каждой подгруппы у представителей разных видов они также отличаются между собой (см. рисунок). Отдельные филогенетические подгруппы образуют гены *groEL2* бактерий рода *Rhodococcus*, являющихся патогенами растений (группа Е) и животных (группа А). Несколько иная картина наблюдалась для филогенетической линии С (представлена видами *R. opacus*, *R. imtechensis*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis* и *R. koreensis*). Исследуемые детерминанты сходны между собой у представителей данных видов (см. рисунок).



Филогенетическое дерево генов *groEL2* бактерий рода *Rhodococcus*
 Phylogenetic tree of *groEL2* genes of the genus *Rhodococcus*

Детальный анализ аминокислотных последовательностей GroEL2 исследуемых бактерий позволил подтвердить выявленные закономерности. В частности, установлены уникальные аминокислотные последовательности в пределах каждой таксономической группы, а также для отдельных видов внутри группы (табл. 1). Исключение составили бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii*, которые не отличались между собой по составу белков GroEL2 и имели единственное отличие от других бактерий рода *Rhodococcus*, а именно: содержали уникальную аминокислоту в позиции 62, представленную аспарагином (у всех остальных 62-я аминокислота – аспарагиновая).

Т а б л и ц а 1. Особенности аминокислотного состава белков GroEL2 бактерий рода *Rhodococcus*Table 1. The amino acid composition of GroEL2 proteins of the genus *Rhodococcus*

Группа	Уникальная аминокислота (позиция)*	Представители	Уникальные аминокислоты
A	S (154), T (155), S (180), A (241), S (421), S (473), M (529)	<i>R. hoagii</i>	**
B	V (312), S (339), S (525), S (526)	<i>R. coprophilus</i>	**
	G (144), G (223), A (246), D (332)	<i>R. aetherivorans</i> , <i>R. ruber</i>	I (274), A (487), V (274), G (487)
	E (470), D (481)	<i>R. pyridinivorans</i> , <i>R. biphenylivorans</i> , <i>R. rhodochrous</i>	L (314), E (426), V (529) V (314), K (426), V (529), L (314), E (426), A (529)
D	D (62)	<i>R. erythropolis</i> R138, <i>R. qingshengii</i> BRS 20–40	**
E	A (124), E (128), S (129), A (132), S (133), S (334), S (337), N (426), V (437)	<i>R. fascians</i> D188	**

Примечание. * – аминокислоты обозначены согласно общепринятой номенклатуре, ** – аминокислоты соответствуют уникальным аминокислотным последовательностям, характерным для группы.

Таким образом, можно заключить, что белки GroEL2 отличаются у бактерий разных групп и имеют внутригрупповые отличия. Исключение составили идентичные белки теплового шока бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* (группа D). Однако сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *groEL2* данных бактерий с таковыми представителей других групп позволил выявить определенную закономерность. Все исследованные штаммы *R. erythropolis* и *R. qingshengii* имели 11 одинаковых точечных нуклеотидных замен, отличающих их от всех остальных бактерий рода *Rhodococcus*. При этом все выявленные мутационные изменения являлись синонимическими, не меняющими смысл кодонов (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Уникальные точечные синонимические мутации генов *groEL2* бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii*Table 2. Unique synonymous mutations in the *R. erythropolis* and *R. qingshengii* *groEL2* genes

Координата, п. н.	Позиция аминокислоты в белке	Аминокислота	Кодон	Представители остальных групп	
				Кодон	Аминокислота
6 (A)	2	Аланин	<u>GCG</u>	GCC	Аланин
375 (T)	125	Аланин	<u>GCT</u>	GCC	Аланин
447 (T)	149	Изолейцин	<u>ATT</u>	ATC	Изолейцин
489 (T)	163	Аланин	<u>GCT</u>	GCC	Аланин
919 (T)	307	Лейцин	<u>TTG</u>	CTC	Лейцин
1017 (A)	339	Аланин	<u>GCA</u>	GCC	Аланин
1029 (T)	343	Аргинин	<u>CGT</u>	CGC	Аргинин
1071 (T)	357	Аспарагиновая кислота	<u>GAT</u>	GAC	Аспарагиновая кислота
1095 (A)	365	Глютаминовая кислота	<u>GAA</u>	GAG	Глютаминовая кислота
1545 (A)	515	Глютаминовая кислота	<u>GAA</u>	GAG	Глютаминовая кислота
1551 (T)	517	Валин	<u>GTT</u>	GTC	Валин

Примечание. Нуклеотидные замены подчеркнуты.

Тем не менее, присутствие в пределах гена *groEL2* бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* уникальных нуклеотидов, характерных для достаточно большой выборки штаммов, позволяет рассматривать их как потенциальные сайты, пригодные для идентификации бактерий этой таксономической группы. Вместе с тем характерных особенностей, позволяющих отличить *R. erythropolis* от *R. qingshengii*, выявить не удалось. Такая же картина наблюдалась при анализе генов *groEL2* у разных видов, относящихся к филогенетической группе С. Однако, в отличие от других исследованных бактерий, все представители группы С содержали дополнительно третий ген *groEL3*, который характеризовался межвидовыми особенностями (нуклеотидные последовательности данных детерминант отличались между собой у представителей видов *R. opacus*, *R. wratislaviensis*, *R. imtechensis*, *R. jostii* и *R. koreensis*).

Выявленные полиморфные локусы в генах *groEL2* (933–1017, 1276–1443 и 1573–1578 п. н.), а также нуклеотидные последовательности генов *groEL3* бактерий *R. opacus*, *R. wratislaviensis*, *R. imtechensis*, *R. jostii* и *R. koreensis*, характеризовавшиеся межвидовым полиморфизмом, обосновали поиск определенных ферментов рестрикции, пригодных для идентификации бактерий рода *Rhodococcus*. В результате проведенного анализа было установлено, что полиморфные участки различаются сайтами рестрикции для ферментов *BglI*, *NarI*, *SfiI*, *SinI* и *RseI*, что позволяет идентифицировать бактерии рода *Rhodococcus* до вида. Для этого с помощью праймеров F (5'-ATGGCMAAGATCATCGCGTTTCG-3') и R (5'-TYAGAAGTCCATRCCRCCCATG-3'), используемых в следующем режиме: при 95 °С – 5 мин (1 цикл), при 95 °С – 30 с, при 60 °С – 45 с, при 72 °С – 1 мин 40 с (30 циклов), при 72 °С – 10 мин (1 цикл), необходимо амплифицировать последовательности генов *groEL2*. Рестрикция полученных ампликонов размером 1626 п. н. ферментами *BglI*, *NarI*, *SfiI* и *SinI* позволяет отнести анализируемые штаммы к определенной филогенетической группе (табл. 3).

Таблица 3. Результаты рестрикционного анализа генов *groEL2* для установления принадлежности бактерий к определенной филогенетической группе

Table 3. The results of the *groEL2* genes restriction analysis for species specific identification of *Rhodococcus* bacteria

Группа	Идентификация группы		Представители группы
	Фермент	Сайты рестрикции	
А	<i>SinI</i>	91, 186, 276, 633, 687, 1266, 1449	<i>R. hoagii</i>
В	<i>SfiI</i>	370	<i>R. pyridinivorans</i> , <i>R. biphenylivorans</i> , <i>R. rhodochrous</i>
	<i>NarI</i>	206	<i>R. coprophilus</i>
	<i>BglI</i>	370, 823, 1108, 1333	<i>R. aetherivorans</i> , <i>R. ruber</i>
С	<i>NarI</i>	131, 326	<i>R. opacus</i> , <i>R. koreensis</i> , <i>R. wratislaviensis</i> , <i>R. jostii</i> , <i>R. jostii</i>
		326, 1594	<i>R. imtechensis</i>
Д	<i>BglI</i>	823, 1108	<i>R. erythropolis</i> , <i>R. qingshengii</i>
Е	<i>BglI</i>	823, 1108, 1141	<i>R. fascians</i>

После этого с использованием рестрикционного анализа можно установить видовую принадлежность исследуемых бактерий (табл. 4). Так, для представителей филогенетической группы С (кроме бактерий вида *R. imtechensis*) дополнительно необходимо амплифицировать последовательности генов *groEL3* (данная группа отличается от остальных присутствием в геноме трех

детерминант *gro*). Для этого с помощью праймеров F (5'-ATG GCC AAG ATC ATC GCG TTC-3') и R (5'-ACCATGCCTTCGGCGAGATC-3'), используемых в следующем режиме: при 95 °С – 5 мин (1 цикл), при 95 °С – 30 с, при 60 °С – 45 с, при 72 °С – 1 мин 40 с (30 циклов), при 72 °С – 10 мин (1 цикл), получали ампликоны размером 1629 п. н., которые обрабатывали определенными ферментами рестрикции (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Видовая идентификация бактерий рода *Rhodococcus* на основании рестрикционного анализа генов *groEL*

Table 4. Species specific identification of bacteria of the genus *Rhodococcus* based on restriction analysis of *groEL* genes

Вид	Видовая идентификация		Группа
	Фермент	Сайты рестрикции	
<i>R. hoagii</i>	<i>SinI</i>	91, 186, 276, 633, 687, 1266, 1449	A
<i>R. pyridinivorans</i>	<i>RseI</i>	0	B
<i>R. biphenylivorans</i>	<i>RseI</i>	937	
<i>R. rhodochrous</i>	<i>BglI</i>	370, 823, 1333	
<i>R. coprophilus</i>	<i>BglI</i>	379, 823, 1108, 1264	
	<i>SinI</i>	186, 633, 687	
<i>R. aetherivorans</i>	<i>NarI</i>	131, 206, 431	
	<i>SinI</i>	186, 687, 1395, 1449	
<i>R. ruber</i>	<i>NarI</i>	131, 206, 431, 1139, 1460	
	<i>SinI</i>	186, 687, 1449	
<i>R. opacus*</i>	<i>SinI</i>	130, 294, 684, 1077	C
<i>R. koreensis*</i>	<i>SinI</i>	294, 342, 636, 684, 763, 1626	
	<i>NarI</i>	206, 1583, 1594	
<i>R. wratislaviensis*</i>	<i>SinI</i>	130, 294, 311, 684, 1077	
<i>R. jostii*</i>	<i>NarI</i>	206, 326, 1583	
	<i>SfiI</i>	370, 823, 1108	
<i>R. imtechensis</i>	<i>NarI</i>	326, 1594	D
<i>R. erythropolis</i>	<i>BsrI</i>	717, 1274	
<i>R. qingshengii</i>	<i>BsrI</i>	296, 717, 1274	
<i>R. fascians</i>	<i>SinI</i>	687, 1449	E
	<i>NarI</i>	0	

П р и м е ч а н и е. * – видовая идентификация определяется на основании рестрикционного анализа продуктов амплификации генов *groEL3* размером 1629 п. н.

Таким образом, анализ генов и кодируемых ими белков GroEL бактерий рода *Rhodococcus* позволил установить возможность использования данных детерминант в качестве молекулярно-генетических маркеров для видовой идентификации. Разработана схема, с помощью которой на основании рестрикционного анализа продуктов ПЦР генов *groEL2* и *groEL3* с использованием рестриктаз *BglI*, *NarI*, *SfiI*, *SinI*, *RseI* и *BsrI* устанавливается видовая принадлежность природных бактерий рода *Rhodococcus*. При этом рестрикционный анализ генов *groEL2* отдельных представителей этого рода позволяет сразу идентифицировать их до вида в результате однократной обработки ферментами *BglI* (*R. rhodochrous*), *NarI* (*R. coprophilus*, *R. aetherivorans*, *R. ruber*, *R. imtechensis*) и *SfiI* (*R. jostii*). Отдельно следует отметить, что рестрикцию генов *groEL2* ферментом *SinI* можно использовать для выявления патогенных бактерии *R. fascians* и *R. hoagii* (синоним *R. equi*) (см. табл. 3, 4).

На следующем этапе работы проводили анализ систем адаптации бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar. Данный штамм представляет большой практический интерес, поскольку способен утилизировать широкий спектр органических соединений в условиях стресса (повышенная температура, высокая осмолярность, экстремальные значения pH и др.) и может быть использован для очистки от загрязнений природного и антропогенного происхождения в экстремальной окружающей

среде [16]. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома данных бактерий [17] позволяет выявить особенности его генетической организации, в том числе систем адаптации, а также установить наличие уникальных генетических детерминант, пригодных для молекулярного типирования при его коммерческом использовании. Следует отметить, что детальное изучение генетических систем адаптации данных микроорганизмов представляет интерес не только с точки зрения понимания фундаментальных процессов, происходящих в клетке под действием стресса, но и с позиции поиска новых подходов к вопросам повышения толерантности штаммов-деструкторов в условиях, далеких от физиологической нормы.

В результате детального анализа генома было выявлено 52 локуса, определяющих устойчивость бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap к стрессовым условиям среды (49 структурных и 4 регуляторных гена, детерминирующих синтез 23 белков теплового шока, 9 универсальных стрессовых белков, 17 цитохромов P450). Транскрипция данных генетических детерминант может обеспечиваться РНК-полимеразой, в состав которой входят специфические сигма-факторы (всего выявлено 18 хромосомных и 1 плазмидный ген, кодирующие данные белки). Большинство аннотированных генов, а также кодируемые ими белки идентичны на 99–100 % с гомологичными последовательностями других известных бактерий *R. pyridinivorans* и некоторых близкородственных видов (в частности, *R. rhodochrous* и *R. biphenylivorans*). Отдельные структурные гены входили в состав оперонов. Например, в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap находится 2 оперона *dnaK-grpE-dnaJ*. В состав первого оперона входит 4 гена *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, а также ген *hspR*, кодирующий белок транскрипционного регулятора. Гены, входящие в состав данного оперона, а также в кодируемые ими белки, идентичны на 99–100 % с таковыми известных представителей *R. pyridinivorans* и одного штамма *R. biphenylivorans* TG9. Второй оперон, представленный пятью генами (дополнительно входит ген *clpB*, определяющий синтез протеазы, разрушающей инактивированные белковые агрегаты), является более консервативным, а входящие в его состав гены, а также кодируемые ими белки идентичны на 99–100 % с гомологичными последовательностями бактерий рода *Rhodococcus*, *Gordonia* и *Nocardia*. Следует отметить, что второй оперон в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap локализован рядом с мобильным генетическим элементом, что может способствовать процессу его горизонтального переноса между микроорганизмами разных систематических групп. Кроме того, перед *groESL*-опероном в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (координаты 3 555 670–3 557 670 п. н.) локализован геном бактериофага размером около 42 тыс. п. н. Причем перед генами фагового происхождения находятся детерминанты, кодирующие сайт-специфическую рекомбиназу XerD (координаты 3 557 883–3 558 916 п. н.) и тирозиновую рекомбиназу XerC (координаты 356 021–3 561 190 п. н.). Указанные детерминанты в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 находятся далеко друг от друга и от *groELS*-оперона (координаты гена, кодирующего XerD: 384 229–385 140 п. н.; координаты гена, кодирующего тирозиновую рекомбиназу XerC: 233 173–234 111 п. н.). Данный факт весьма примечателен и свидетельствует о том, что в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap перед *groESL*-оперонами локализуются горячие точки рекомбинации и встроены геном профага. Эти генетические локусы могут обеспечивать изменения в геноме, причем непосредственно рядом с *groESL*-опероном, играющим важную роль в адаптации бактерий в стрессовых условиях среды.

Среди охарактеризованных детерминант выявлены уникальные нуклеотидные последовательности плазмидного и хромосомного происхождения, кодирующие синтез белков теплового шока DnaK (один плазмидный ген) и цитохромов P450 (два хромосомных и один плазмидный) (табл. 5). В эту группу включен хромосомный ген, кодирующий синтез цитохрома P450, нуклеотидная последовательность которого на 99 % сходна с таковой гена бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996.1) в двух участках (1–458, 697–1038 п. н.). Последовательность между 458-м и 697-м нуклеотидом у бактерий данного вида отсутствует. Следует отметить, что в состав этого фрагмента входят аминокислоты (от 153 до 233), характерные для домена, определяющего метаболизм ксенобиотиков. В целом данный белок идентичен таковому бактерий *R. pyridinivorans* только на 78 %. Две другие детерминанты плазмидного и хромосомного происхождения, кодирующие синтез цитохромов, имели сходство с гомологичными последовательностями бактерий более отдаленных таксономических групп (*Kutzneria albida* и *Gordonia rubripertincta*) (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Уникальные детерминанты системы адаптации бактерий *R. pyridinivorans* 5ApT a b l e 5. Unique determinants of the bacterial adaptation system of *R. pyridinivorans* strain 5Ap

Ген	Координаты	Размер, п. н.	Сходство с известными последовательностями бактерий			
			гена	%	белка	%
<i>dnaK</i>	63 397–65 241(Node 22)	1845	Нет сходства		<i>R. pyridinivorans</i> (WP_082331874.1)	100
<i>p450*</i>	808 662–809 699	1038	<i>R. pyridinivorans</i> SB3094(CP006996.1)	99	<i>R. pyridinivorans</i> (WP_060651923.1)	78
<i>p450</i>	4 925 260–4 926 471	1212	<i>G. rubripertincta</i> CWB2 (CP022580.1)	91	<i>G. rubripertincta</i> (WP_005196845.1)	93
<i>p450</i>	93 920–95 323 (17Nod)	1404	<i>K. albida</i> DSM43870 (CP007155.1) 559 п. н. на 3'-конце	72	<i>R. wratislaviensis</i> (WP_005564713.1)	90

Примечание. * – ген на 99 % идентичен гомологичному гену бактерий *R. Pyridinivorans* SB3094 в области между 1–458 и 697–1038 п. н.

Заключение. Таким образом, в составе генома биотехнологического штамма бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap содержится большое число генов, продукты которых являются белками систем адаптации. Среди аннотированных детерминант выявлены уникальные генетические детерминанты, которые могут быть использованы для молекулярного типирования данных бактерий.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Биотехнологии», 2016–2020 гг., подпрограмма «Микробные биотехнологии», задание 3.36.

Acknowledgements. The work is done within the framework of the subprogram “Microbial Biotechnology” of the State Program of Scientific Research “Biotechnology” for 2016–2020 (project 3.36).

Список использованных источников

1. Solyanikova, I. Biochemical features of the degradation of pollutants by *Rhodococcus* as a basis for contaminated wastewater and soil cleanup / I. Solyanikova, L. Golovleva // Mikrobiologiya. – 2011. – Vol. 80, N 5. – P. 591–607. <https://doi.org/10.1134/s0026261711050158>
2. The genus *Rhodococcus* / K. S. Bell [et al.] // UK J. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 85, N 2. – P. 195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>
3. Majidzadeh, M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections / M. Majidzadeh, M. Fatahi-Bafghi // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 37, N 11. – P. 2045–2062. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3364-x>
4. Detection of *vapN* in *Rhodococcus equi* isolates cultured from humans [Electronic resource] / L. K. Bryan [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, N 1. – P. e0190829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190829>
5. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcusequi* / J. Navas[et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, N 16. – P. 4796–4805. <https://doi.org/10.1128/jb.183.16.4796-4805.2001>
6. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene / N. Ladrón [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, N 7. – P. 3241–3245. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3241-3245.2003>
7. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species / A. Táncsics [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105, N 4. – P. 1026–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03832.x>
8. Duquesne, F. Development of a multilocus sequence typing scheme for *Rhodococcus equi* / F. Duquesne // Vet. Microbiol. – 2017. – Vol. 210. – P. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.010>
9. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR / K. S. Bell [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87, N 4. – P. 472–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00824.x>
10. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA–DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii* / A. Táncsics [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2014. – Vol. 64, N 1. – P. 298–301. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059097-0>
11. Next-generation systematics: An innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa / V. Sangal [et al.] // Sci. Reports. – 2016. – Vol. 6. – Art. 38392. <https://doi.org/10.1038/srep38392>
12. Ruiz-González, M. X. Coevolution analyses illuminate the dependencies between amino acid sites in the chaperonin system GroES-L / M. X. Ruiz-González, M. A. Fares // BMC Evol. Biol. – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-156>

13. Transcriptional analysis of the *groES–groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters / C. Barreiro [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 14. – P. 4813–4817. <https://doi.org/10.1128/jb.186.14.4813-4817.2004>

14. A mycobacterium tuberculosis mutant lacking the *groEL* homologue *cpn60.1* is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection / Y. Hu [et al.] // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76, N 4. – P. 1535–1546. <https://doi.org/10.1128/iai.01078-07>

15. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria / A. Ojha [et al.] // *Cell.* – 2005. – Vol. 123, N 5. – P. 861–873. <https://doi.org/10.3410/f.1030372.358632>

16. Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата: пат. 2617941 РФ: МПК С12N1/20, В09С1/10, С02F3/34, С12R1/01 (2015). М., 2015. – Я. А. Делеган, А. А. Ветрова, М. И. Чернявская, М. А. Титок, А. А. Иванова, А. Е. Филонов, А. М. Боронин. Дата публ. 28.04.2017.

17. Первичный анализ генома бактерий – деструкторов нефти *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap / М. И. Чернявская [и др.] // *Тр. БГУ. Сер. : Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем.* – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 219–223.

References

1. Solyanikova I., Golovleva L. Biochemical features of the degradation of pollutants by *Rhodococcus* as a basis for contaminated wastewater and soil cleanup. *Mikrobiologiya*, 2011, vol. 80, no. 5, pp. 591–607. <https://doi.org/10.1134/s0026261711050158>

2. Bell K. S., Philp J. C., Aw D. W. J., Christofi N. The genus *Rhodococcus*. *UK Journal of Applied Microbiology*, 1998, vol. 85, no. 2, pp. 195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>

3. Majidzadeh M., Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, vol. 37, no. 11, pp. 2045–2062. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3364-x>

4. Bryan L. K., Alexander E. R., Lawhon S. D., Cohen N. D. Detection of *vapN* in *Rhodococcus equi* isolates cultured from humans. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 1, p. e0190829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190829>

5. Navas J., González-Zorn B., Ladrón N., Garrido P., Vázquez-Boland J. A. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology*, 2001, vol. 183, no. 16, pp. 4796–4805. <https://doi.org/10.1128/jb.183.16.4796-4805.2001>

6. Ladrón N., Fernández M., Agüero J., Zorn B. G., Vázquez-Boland J. A., Navas J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol. 41, no. 7, pp. 3241–3245. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3241-3245.2003>

7. Tánicsics A., Szoboszlai S., Kriszt B., Kukolya J., Baka E., Márialigeti K., Révész S. Applicability of the functional gene catechol 1, 2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, vol. 105, no. 4, pp. 1026–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03832.x>

8. Duquesne F., Houssin E., Sévin C., Duytschaever L., Tapprest J., Fretin D., Hébert L., Laugier C., Petry S. Development of a multilocus sequence typing scheme for *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, 2017, vol. 210, pp. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.010>

9. Bell K. S., Kuyukina M. S., Heidbrink S., Philp J. C., Aw D. W. J., Ivshina I. B., Christofi N. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, vol. 87, no. 4, pp. 472–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00824.x>

10. Tánicsics A., Benedek T., Farkas M., Máthé I., Márialigeti K., Szoboszlai S., Kukolya J., Kriszt B. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA–DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, vol. 64, no. 1, pp. 298–301. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059097-0>

11. Sangal V., Goodfellow M., Jones A. L., Schwalbe E. C., Blom J., Hoskisson P. A., Sutcliffe I. C. Next-generation systematics: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, art. 38392. <https://doi.org/10.1038/srep38392>

12. Ruiz-González M. X., Fares M. A. Coevolution analyses illuminate the dependencies between amino acid sites in the chaperonin system GroES–L. *BMC Evolutionary Biology*, 2013, vol. 13, no. 1, p. 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-156>

13. Barreiro C., González-Lavado E., Pátek M., Martín J.-F. Transcriptional analysis of the *groES–groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters. *Journal of Bacteriology*, 2004, vol. 186, no. 14, pp. 4813–4817. <https://doi.org/10.1128/jb.186.14.4813-4817.2004>

14. Hu Y., Henderson B., Lund P. A., Tormay P., Ahmed M. T., Gurcha S. S., Besra G. S., Coates A. R. M. A mycobacterium tuberculosis mutant lacking the *groEL* homologue *cpn60.1* is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection. *Infection and Immunity*, 2008, vol. 76, no. 4, pp. 1535–1546. <https://doi.org/10.1128/iai.01078-07>

15. Ojha A., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W. R., Hatfull G. F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, 2005, vol. 123, no. 5, pp. 861–873. <https://doi.org/10.3410/f.1030372.358632>

16. Delegan Ya. A., Vetrova A. A., Chernyavskaya M. I., Titok M. A., Ivanova A. A., Filonov A. E., Boronin A. M. Thermotolerant bacterial strains consortium for oil and oil products degradation in soil and waters in hot climates: Patent RF, no. 2617941, 2017.

17. Chernyavskaya M. I., Buklyarevich A. A., Okhremchuk A. E., Valentovich L. N., Titok M. A. Primary analysis of the genome of oil-degrading bacteria *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem* [Proceedings of the Belarusian State University. Series: Physiological, biochemical and molecular foundations of the functioning of biosystems], 2016, vol. 11, no. 1, pp. 219–223 (in Russian).

Информация об авторах

Букляревич Анна Александровна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bukliarevich@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0003-3643-1366>

Титок Марина Алексеевна – д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ma_titok@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>

Information about the authors

Hanna A. Bukliarevich – Junior Researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bukliarevich@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0003-3643-1366>

Marina A. Titok – D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ma_titok@bsu.by, <https://orcid.org/0000-0002-8623-5083>