

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.222.3; 579.258
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-224-233>

Поступила в редакцию 14.04.2023
Received 14.04.2023

А. А. Букляревич, М. А. Титок

*Белорусский государственный университет, Минск,
Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО ШОКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

Аннотация. В результате проведенного исследования установлено, что синтез поверхностно-активных соединений бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap можно повысить путем воздействия на них кратковременным температурным шоком (55 °C в течение 20 мин) через 24 ч выращивания в минимальной солевой среде, содержащей мелассу (3 %) и гексадекан (2 %) (индекс эмульгирования увеличивается на 9 %). При данном режиме культивирования регистрировали активацию экспрессии генетических детерминант, которые кодируют глобальные регуляторы клеточного метаболизма и выполняют в том числе защитную функцию при стрессе. В частности, показано увеличение в 90,8 раза количества мРНК, определяющей синтез альтернативного транскрипционного фактора *SigH*, а также генов, содержащих в промоторах сайты его связывания и кодирующих синтез кошаперона (ген *fmdB*), шаперона (ген *hsp22.5*) и тиоредоксинредуктазы (ген *trxB*) (соответственно в 59,3; 81,1 и 73,1 раза). Кроме того, показана активация транскрипции генов *groEL1*, *groEL2* и *dnaJ*, обеспечивающая увеличение синтеза белков теплового шока (в 2,2; 2,6 и 4,4 раза соответственно). Полученные данные позволяют предположить, что увеличение синтеза альтернативного фактора сигма Н, активирующего защитный клеточный метаболизм, а также структурных белков теплового шока при кратковременном температурном стрессе приводит к возрастанию продукции поверхностно-активных соединений, что может быть использовано при оптимизации синтеза данных вторичных метаболитов для биотехнологического использования.

Ключевые слова: поверхностно-активные соединения, оптимизация, температурный стресс, транскрипция генов

Для цитирования: Букляревич, А. А. Влияние температурного шока на эффективность синтеза поверхностно-активных соединений бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap / А. А. Букляревич, М. А. Титок // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 224–233. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-224-233>

Hanna A. Bukliarevich, Marina A. Titok

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF A TEMPERATURE SHOCK ON THE SYNTHESIS EFFICIENCY OF SURFACTANTS BY *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5Ap BACTERIA

Abstract. It was found that the synthesis of surfactants by *R. pyridinivorans* 5Ap bacteria can be increased by exposing them to a short temperature shock (55 °C for 20 minutes) after 24 hour cultivation in a minimal medium containing molasses (3 %) and hexadecane (2 %) (9 % increase in the emulsification index). Gene activation encoding global regulators of cell metabolism, including those performing a protective function under stress, was recorded in this cultivation mode. In particular, the mRNA amount determining the synthesis of the alternative transcription factor SigH increased 90.8 times and containing in the promoters its binding sites *fmdB* cochaperone – 59.3 times, *hsp22.5* chaperone – 81.1 times, and the *trxB* gene encoding thioredoxin reductase – 73.1 times. In addition, it was shown that the transcriptional activation of *groEL1*, *groEL2* and *dnaJ* genes determining the synthesis of heat shock proteins was 2.2, 2.6 and 4.4 times, respectively. The obtained results suggest that an increase in the alternative factor sigma H synthesis, which activates protective cellular metabolism, as well as structural, heat shock proteins under short temperature stress, leads to an increased production of surfactants, which can be used to optimize the synthesis of these secondary metabolites for biotechnological use.

Keywords: surface-active compounds, optimization, temperature stress, gene transcription

For citation: Bukliarevich H. A., Titok M. A. Influence of a temperature shock on the synthesis efficiency of surfactants by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap bacteria. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 224–233 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-224-233>

Введение. Бактерии рода *Rhodococcus* широко используются в экологической биотехнологии благодаря их способности утилизировать широкий спектр органических и неорганических соединений природного и антропогенного происхождения [1]. Кроме того, отдельные представители данного рода являются продуцентами поверхностно-активных веществ (биоПАВ).

В силу своей высокой активности, специфичности, низкой токсичности и биоразлагаемости данные соединения находят применение в различных сферах практической деятельности человека. В частности, для биоремедиации загрязненных территорий от различного рода поллютантов (повышают сродство бактерий к ксенобиотикам, способствуют их транспорту через мембрану бактериальной клетки) [2, 3]; в нефтедобывающей промышленности – для повышения нефтеотдачи, очистки емкостей от нефти, облегчения транспортировки тяжелой сырой нефти по трубопроводам [4]; в пищевой промышленности – для улучшения качества жиросодержащих продуктов [5]; в косметической промышленности – в качестве основы для кремов, косметических масок, антимикробных агентов [6]; в медицине – для создания антимикробных, иммуностимулирующих, противораковых препаратов [7].

Основным препятствием для широкомасштабного производства биоПАВ является их высокая стоимость. С целью снижения затрат на их производство оптимизируют процессы их синтеза и очистки, а также используют возобновляемые источники питания.

В качестве продуцента биоПАВ определенный интерес представляют бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, характеризующиеся высокой эмульгирующей активностью и способные утилизировать широкий спектр органических субстратов. Одновременное присутствие в клетках данных микроорганизмов активно функционирующих систем синтеза и деградации делает их удобными модельными объектами для изучения процессов клеточного метаболизма.

На эффективность синтеза поверхностно-активных соединений, как и любых других вторичных метаболитов, влияют факторы внешней среды. Оптимизация условий культивирования бактерий позволяет повысить продукцию этих соединений в десятки раз. В частности, большую роль играют состав среды, источники углерода и азота, а также их соотношение, наличие микроэлементов, температура, концентрация ионов водорода и др. [8]. Определенный интерес представляют стрессовые факторы (например, температурный и осмотический шок), в ответ на действие которых в бактериальной клетке индуцируется целый ряд белков, восстанавливающих и активирующих ее ферментативный аппарат [9].

В ходе предыдущих исследований установлена роль структурных и регуляторного генов, кодирующих белки теплового шока, на продукцию биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. В частности, показано, что синтез трегалолипидов у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (низкомолекулярные эмульгаторы) при разных температурных режимах (28 и 42 °C) зависит от функциональной активности структурного гена *dnaJ* и регуляторного гена *hrcA*. Однако у данных мутантов, а также у мутанта с нарушенными генами *groESL* при пониженной температуре (28 °C) эмульгирующая активность сохранялась на уровне дикого типа. При повышенной температуре (42 °C) эмульгирующая активность достоверно снижалась у мутантов с нарушенными генами *hrcA* и *groESL*. Полученные результаты свидетельствовали о сложной химической природе биоПАВ, продуцируемых бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap (эмульгаторы, включающие трегалолипиды и соединения иного химического состава), в синтезе которых при разных температурных режимах ключевую роль играли регуляторный белок HrcA, шаперон GroE (его синтез повышался у мутанта с нарушенным геном *hrcA* при пониженной температуре) и продукт гена *dnaJ*, влияющий на синтез трегалолипидов [10].

Следует отметить, что ген *dnaJ* кодирует белок, необходимый для функциональной активности ключевого шаперона DnaK, исправляющего нарушенную конформацию белков, которая возникает под действием стрессов, в то время как регуляторный ген *hrcA* только при пониженной температуре детерминирует образование активного репрессора транскрипции генов *groESL*, *groEL2* и *fmdB*, содержащих в промоторных участках сайты его связывания CIRCE. При повышенной температуре HrcA теряет свойство репрессора, в результате чего активируется синтез *groESL* и *groEL2*. В то же время транскрипция генов *fmdB*, *hsp22.5* и *dnaJ* при стрессовых условиях может обеспечиваться альтернативным сигма Н фактором, сайты связывания с которым

обнаруживаются в промоторных областях данных детерминант [10]. Поскольку белок HrcA, утратив свойство репрессора при повышенной температуре (42 °С), по-прежнему влиял на синтез биоПАВ (у мутанта с нарушенным геном *hrcA* синтез трегалолипидов снижался в 6,6 раза, а эмульгирующая активность – в 1,9 раза), можно предположить, что его роль в клетке не ограничивается функцией негативного регулятора транскрипции, а совместно с альтернативными сигма Н и сигма В факторами он способен активировать транскрипцию генов клеточного метаболизма, как было показано для некоторых грамположительных бактерий [11].

Поскольку белки теплового шока активируются в течение первых 20 мин после воздействия стресса [12, 13], представлялось важным установить влияние кратковременного температурного воздействия на синтез биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap и оценить возможность его использования для увеличения синтеза этих биотехнологически важных соединений.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния кратковременного температурного шока на продукцию поверхностно-активных соединений бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap и транскрипционную активность отдельных генетических детерминант, которые определяют синтез белков клеточного метаболизма и выполняют в том числе и защитную функцию при стрессе.

Материалы и методы исследования. В работе использовали штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г).

Бактерии культивировали в минеральной модифицированной среде Мюнца [14], содержащей гексадекан (2 %) и мелассу (3 %).

Для построения кривой роста ночную культуру бактерий разводили в 10 раз и культивировали при 28 °С с аэрацией (140 об/мин). Измерение оптической плотности ($\lambda = 600$ нм) и определение числа жизнеспособных клеток осуществляли каждые 2 ч.

Термическую обработку проводили в течение 20 мин при 42, 50, 55 и 60 °С на водяной бане после культивирования бактерий в течение 1, 7 или 24 ч. После температурного шока бактерии выращивали при 28 °С в течение 72 ч.

Экстракцию сурфактанта осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира [15] с последующим разведением полученного препарата в 50 раз. С помощью фенол-сернокислого метода [16] на спектрофотометре MetertechSP-8001 (Тайвань) определяли содержание трегалозы, являющейся частью гликолипида. Концентрацию сахара устанавливали согласно построенному градуировочному графику зависимости оптической плотности раствора от концентрации трегалозы (0–130 мг/л) при $\lambda = 483$ нм.

Индекс эмульгирования определяли методом, описанным в работе [17], и рассчитывали как отношение объема эмульсии, образуемой при перемешивании культуральной жидкости с гексадеканом, к общему объему раствора.

ПЦР в реальном времени. Для определения экспрессии генов использовали культуру бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap после термообработки при 55 °С в течение 20 мин. Для получения препаратов тотальной РНК использовали набор Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, США), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, качество препаратов – с помощью электрофореза в агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой (ThermoFisher Scientific, США). Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Реакцию амплификации осуществляли с помощью набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) при режиме: 95 °С – 3 мин; 95 °С – 20 с, 60 °С – 20 с, 72 °С – 5 с (40 циклов). Контаминация геномной ДНК во всех исследуемых образцах не превышала 3 %. В качестве референсного использовали ген *16S* рРНК (SD – 0,5; CV – 4,8 %).

Относительное количество мРНК определяли по формуле Pfaffl [18]. Для статистической обработки данных применяли непарный критерий Стьюдента с помощью программы RStudio версии 2022.07.0. Все исследования проведены в пяти независимых повторах.

Для амплификации фрагмента гена *groEL* в режиме реального времени использовали праймеры *gro2R-F* (5'-cctgctcgtcagctccaaga-3') и *gro2R-R* (5'-gtgccgcatctgttgag-3'), для гена *groESL* –

gro1R-F (5'-ggcttctctgctgcctactt-3') и gro1R-R (5'-gccggactctgcatcttct-3'), для гена *hrcA* – hrcRT-F (5'-catcggtagaggagaccgatgc-3') и hrcRT-R (5'-atgcatggttcccgggatagtc-3'), для гена *dnaJ* – dnaJ-F (5'-ccaccgagatcaccatcgcac-3') и dnaJ-R (5'-gcaccagacctcgcagatgc-3'), для гена *fmdB* – fmdB-F (5'-cacctactcatatgcctgcac-3') и fmdB-R (5'-gatgccgaccgagttgaagag-3'), для гена *hsp22.5* – hsp22-F (5'-gacggagaccgaagaggac-3') и hsp22-R (5'-cagagcactgacgagtgacg-3'), для гена *sigH* – sigH-F (5'-tgtggaagaactgaccgagc-3') и sigH-R (5'-aggtctctgtacgaggtcc-3'), для гена *trxB* – trxB-F (5'-cccacgattcacgacctatc-3') и trxB-R (5'-ggaagttctgacctcggtg-3'), для референсного гена *16S* – 5Ap_835f (5'-gccgtagccaacgattaag-3') и 5Ap_1163r (5'-caccttctccgagttgacc-3'). Для каждой пары праймеров эффективность амплификации определяли по значению угла наклона калибровочной кривой. Для подтверждения специфичности реакции анализировали кривую плавления и результаты электрофореза в агарозном геле.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием программы GraphPadPrism версии 8.0.1 для Windows, GraphPad Software (Сан-Диего, Калифорния, США), www.graphpad.com.

Результаты и их обсуждение. Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap обладали высокой эмульгирующей активностью (индекс эмульгирования более 50 %) только при наличии в среде культивирования гексадекана в концентрации 2 % в качестве индуктора. При этом максимальную продукцию биоПАВ регистрировали через 72 ч культивирования в минеральной среде с пониженной концентрацией ионов калия, повышенной концентрацией ионов натрия с добавлением двухвалентного железа (модифицированная среда Мюнца) [10, 19].

Отсутствие катаболитной репрессии, являющейся отличительной особенностью родококков, позволяет им в присутствии легкоусвояемых источников углерода утилизировать широкий спектр углеводородных субстратов природного и антропогенного происхождения. При этом наиболее распространенные в окружающей среде алканы, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий, водорослей и грибов, а также входящие в состав нефти, нефтешламов (отходы переработки нефти) и нефтепродуктов (составляют от 20 до 50 %) [20], являются индукторами синтеза биоПАВ, которые, в свою очередь, облегчают поступление плохо растворимых углеводородных субстратов в клетку [1].

Возможность использования легкоусвояемых источников углерода при добавлении алканов (гексадекана) позволяет применять возобновляемые и дешевые субстраты для синтеза биосурфактантов [21]. Анализ продукции биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap позволил установить, что их выращивание в ранее оптимизированной среде с добавлением 3 % мелассы (отходы сахарного производства) в качестве источника углерода и 2 % гексадекана в качестве индуктора обеспечивает увеличение синтеза низкомолекулярных эмульгаторов (трегалолипидов) более чем в 6 раз (с 0,3 до 2 г/л). В связи с этим все дальнейшие исследования проводили в данной среде, пригодной для биотехнологического использования.

Поскольку биоПАВ являются вторичными метаболитами, ключевым моментом для термической обработки является стадия роста бактериальной культуры. Кинетику роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap определяли в минимальной среде с добавлением мелассы (3 %) в качестве источника углерода и гексадекана (2 %) в качестве индуктора синтеза биоПАВ. Как следует из данных, приведенных на рис. 1, ранняя экспоненциальная фаза роста начиналась через 1 ч культивирования, через 7 ч бактерии находились в поздней экспоненциальной фазе, а через 9 ч достигали стационарной фазы. При этом образование биоПАВ начинали фиксировать через 24 ч культивирования.

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap подвергали температурному шоку в течение 20 мин (42, 50 и 60 °С) в ранней (через 1 ч) и поздней (через 7 ч) экспоненциальной фазе роста, а также через 24 ч культивирования (в стационарной фазе роста). В результате было установлено, что термическая обработка бактериальной культуры в экспоненциальной фазе роста (через 1 и 7 ч) не приводит к увеличению эмульгирующей активности, а при воздействии температуры 60 °С наблюдается гибель клеток (значение КОЕ/мл снижалось в 3–4 раза) (табл. 1).

В связи с этим бактерии в стационарной фазе роста подвергали кратковременному шоку при большем количестве температурных режимов (42, 50, 55 и 60 °С). В результате для всех вариан-

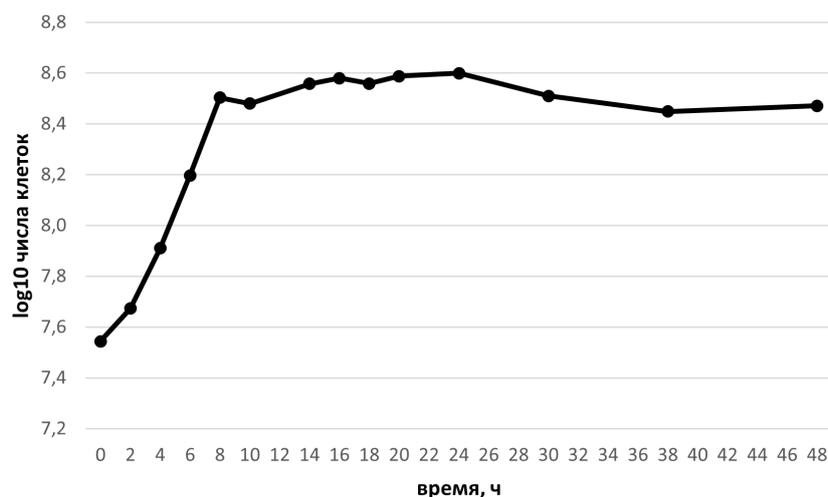


Рис. 1. Кривая роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в модифицированной среде Мюнца с гексадеканом (2 %) и мелассой (3 %)

Fig. 1. Growth curve of *R. pyridinivorans* 5Ap in a modified Munz medium with hexadecane (2 %) and molasses (3 %)

Т а б л и ц а 1. Эмульгирующая активность и количество жизнеспособных клеток после термической обработки бактериальной культуры в экспоненциальной фазе роста

Table 1. Emulsifying activity and the number of viable cells after heat treatment of a bacterial culture in the exponential growth phase

Параметр	Контроль	Режим термообработки культур в экспоненциальной фазе роста 1 ч			Режим термообработки культур в экспоненциальной фазе роста 7 ч		
		42 °C	50 °C	60 °C	42 °C	50 °C	60 °C
Кол-во жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	$(7,11 \pm 1,62) \cdot 10^8$	$(7,67 \pm 2,24) \cdot 10^8$	$(6,56 \pm 1,74) \cdot 10^8$	$(2,63 \pm 0,34) \cdot 10^8$	$(6,58 \pm 2,39) \cdot 10^8$	$(7,75 \pm 1,54) \cdot 10^8$	$(1,94 \pm 0,3) \cdot 10^8$
Индекс эмульгирования, %	$56,7 \pm 2,2$	$52,3 \pm 3,2$	$56,8 \pm 0,1$	$56,3 \pm 4,0$	$47,7 \pm 3,2$	$55,7 \pm 3,3$	$54,4 \pm 1,3$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 исследуемые параметры определяли через 72 ч культивирования бактерий.

тов наблюдали возрастание эмульгирующей активности, однако статически достоверное увеличение синтеза биоПАВ регистрировали только при температуре 55 °C (табл. 2). После данного температурного воздействия регистрировали в 2 раза больше жизнеспособных клеток и увеличение индекса эмульгирования на 9 %. Однако при этом не выявлено увеличения синтеза трегалолипидов. Полученные данные свидетельствовали о том, что повышенная продукция биоПАВ не связана с активацией продукции низкомолекулярного эмульгатора трегалолипида, а обеспечивается соединениями другой химической природы. Известно, что бактерии синтезируют биоПАВ, представленные целым рядом химических соединений (например, липопептидами, фосфо-

Т а б л и ц а 2. Эмульгирующая активность и количество жизнеспособных клеток через 24 ч после термической обработки бактериальной культуры в стационарной фазе роста

Table 2. Emulsifying activity and the number of viable cells after heat treatment of a bacterial culture in the stationary growth phase

Параметр	Контроль	Режим термообработки культур			
		42 °C	50 °C	55 °C	60 °C
Кол-во жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	$(7,11 \pm 1,62) \cdot 10^8$	$(8,20 \pm 2,57) \cdot 10^8$	$(8,0 \pm 2,0) \cdot 10^8$	$(1,46 \pm 0,24) \cdot 10^9$	$(6,56 \pm 2,6) \cdot 10^8$
Индекс эмульгирования, %	$56,7 \pm 2,2$	$59,8 \pm 4,0$	$58,7 \pm 3,3$	$62,0 \pm 2,7$	$59,1 \pm 5,4$
p-value		$>0,05$		0,0001	$>0,05$

липидами, полисахаридами, липопротеинами и др). Следует отметить, что факт синтеза бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap биоПАВ, отличных от трегалолипидов, отмечался ранее. В частности, у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* регистрировали снижение синтеза трегалолипидов при сохранении эмульгирующей активности на уровне штамма дикого типа [10].

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о возможности использования кратковременного температурного шока для повышения синтеза биоПАВ. Данный эффект наблюдался через 24 ч культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в пригодной для биотехнологического использования среде после термической обработки культуральной жидкости при 55 °С в течение 20 мин. Представлялось важным установить, происходит ли изменение экспрессии генов при данных условиях культивирования. Поскольку в качестве стресса использовали температурный фактор, предполагали, что изменения могли затронуть структурные гены, кодирующие белки теплового шока, глобальный регулятор транскрипции сигма Н и детерминанты, содержащиеся в промоторных участках сайты его связывания (*trxB*, *fmdB* и расположенный сразу за ним ген *hsp22.5*).

Особый интерес представлял регуляторный ген *hrcA*, кодирующий репрессор транскрипции генов *groELS*, *groEL2* и *fmdB*, кодирующих белки теплового шока. Известно, что белок HrcA при повышенной температуре теряет свойство репрессора, а следовательно, при данном температурном режиме не обладает функциональной активностью. Однако было установлено, что у мутанта с нарушенным геном *hrcA* при температуре 42 °С более чем в 6 раз снижался синтез трегалолипидов и в 2 раза уменьшалась эмульгирующая активность [10]. В связи с этим сделано предположение, что функция данного белка не ограничивается негативной регуляцией транскрипции и при конститутивном синтезе он активирует экспрессию генов совместно с альтернативными сигма Н и сигма В факторами, как это установлено для некоторых грамположительных бактерий [11]. Среди генов, регулируемых белком HrcA, определенный интерес представляли детерминанты, в промоторах которых обнаружены сайты связывания с фактором сигма Н. Известно, что данный альтернативный фактор начинает активно экспрессироваться под действием стресса и индуцирует транскрипцию большого числа регулонов, продукты которых обеспечивают выживание бактерий при данных условиях. Следует отметить, что сайты связывания с сигма Н обнаруживались в промоторе гена *fmdB* (дополнительно содержит сайт связывания с базовым сигма 70, который перекрывается с последовательностью CIRCE, обеспечивающей взаимодействие с HrcA) [10, 22].

Учитывая тот факт, что в качестве индуктора для синтеза биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap использовали гексадекан в большой концентрации, определенного внимания заслуживала детерминанта *trxB*, кодирующая тиоредоксинредуктазу, необходимую для протекания окислительных реакций в клетке [23]. В промоторе данного гена присутствовал сайт связывания с фактором сигма Н, и активация его экспрессии обеспечивалась данным альтернативным сигма фактором совместно с HrcA [11]. Исходя из изложенного выше, транскрипционную активность анализировали для генов *groELS*, *groEL2* и *dnaJ*, кодирующих белки теплового шока, а также для гена *sigH*, определяющего синтез альтернативного фактора транскрипции, и детерминант *fmdB*, *hsp22.5* и *trxB*, содержащих в промоторной области сайт его связывания.

В результате проведенного анализа установлено, что под действием кратковременного температурного шока в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в наибольшей степени увеличивалась транскрипция гена, кодирующего альтернативный фактор сигма Н (в 90,8 раза) (рис. 2). Такой результат является вполне закономерным, поскольку именно данный альтернативный фактор является одним из ключевых, активирующих транскрипцию большого числа регулонов, продукты которых обеспечивают выживание клетки при стрессе [24]. В этом плане весьма показательными являются гены *fmdB*, *hsp22.5* и *trxB*, содержащие в промоторах сайт связывания с фактором сигма Н, транскрипция которых возрастала в 59,3; 81,1 и 73,1 раза соответственно (рис. 2). В частности, ген *trxB*, кодирующий необходимую для протекания окислительных реакций тиоредоксинредуктазу [23]. Активация синтеза данного фермента при наличии в среде углеводородного соединения (в данном случае гексадекана в концентрации 2 %) может играть важную роль в его окислении, и, как следствие, влиять на продукцию биоПАВ [19].

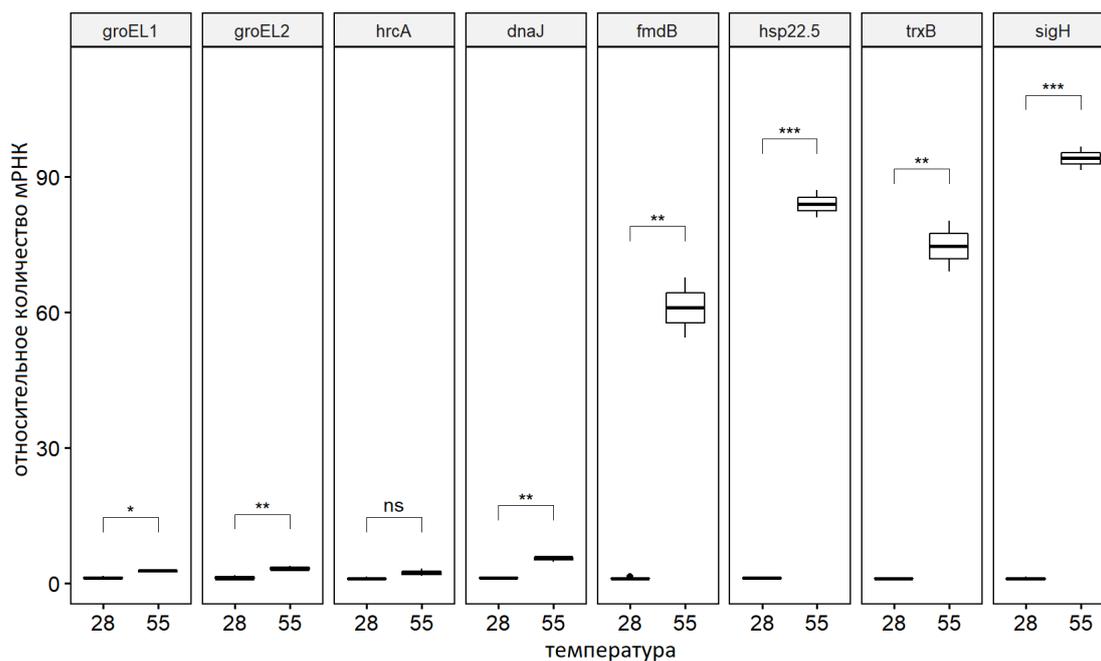


Рис. 2. Относительное количество мРНК генов в результате температурной обработки при 55 °С бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (28 – контроль без обработки, 55 – пробы с обработкой 55 °С).
NS – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$

Fig. 2. Relative mRNA amount as a result of 55°C treatment of *R. pyridinivorans* 5Ap bacteria. Designations: 28 – control without treatment, 55 – samples at 55 °C treatment. NS – $p > 0,05$, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$

Продукт гена *hsp22.5* относят к глобальным регуляторам транскрипции. Например, для бактерий *M. tuberculosis* показано, что данный ген, кодирующий белок теплового шока, регулировал экспрессию 382 генов, активируя транскрипцию оперонов и отдельных генов, продукты которых обеспечивали выживание бактерий под действием температурного стресса (в частности, DnaK, GrpE), а также определяли процессы клеточного метаболизма, такие как синтез белка, дыхание, липидный обмен и др. [25].

Не менее значимым в стрессовых условиях представляется продукт гена *fmdB*. Присутствуя в геноме большинства прокариот, в том числе в составе оперонов *dnaK*, он определял синтез белка, крайне чувствительного к окислительному стрессу [26]. В присутствии активных форм кислорода белок FmdB принимал функционально активную форму и, взаимодействуя с шаперонами DnaK и DnaJ, предотвращал необратимую денатурацию более 70 ферментов, необходимых, в частности, для процессов окисления и синтеза жирных кислот [22]. Таким образом, можно заключить, что температурный шок приводил к активации систем клеточного метаболизма бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, в том числе ключевых белков шаперонов, поддерживающих функциональную активность ферментов при стрессовых условиях (например, DnaK).

Установлено увеличение количества матричной РНК, кодируемой генами *groELS*, *groEL2* и *dnaJ*, в 2,2; 2,6 и 4,4 раза соответственно. При этом уровень экспрессии гена *hrcA* (основной негативный регулятор генов *groE*) не менялся (рис. 2). Присутствие в промоторной области гена *hrcA* сайта связывания с базовым сигма-фактором (σ^{70}) дополнительно свидетельствовало о конститутивной экспрессии данной детерминанты при разных температурных режимах [10].

Как указывалось ранее, предполагали, что регуляторный белок HrcA может совместно с альтернативным фактором сигма Н активировать экспрессию гена *trxB*, кодирующего тиоредоксин-редуктазу. Ожидалось, что при наличии совместной позитивной регуляции белка HrcA и σ^H будет наблюдаться снижение уровня транскрипции гена *trxB* у мутанта с нарушенным геном *hrcA*, однако достоверной разницы в количестве мРНК зафиксировано не было. Тем не менее полученный результат не исключает возможности участия белка HrcA в позитивной регуляции транс-

крипции. Для этого необходимо проведение дополнительных исследований, в частности изучение транскриптома бактерий дикого типа *R. pyridinivorans* 5Ap в сравнении с мутантом, содержащим нарушенный ген *hrcA*.

Заклучение. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что увеличение синтеза альтернативного фактора сигма Н, активирующего защитный клеточный метаболизм, а также структурных белков теплового шока при кратковременном температурном стрессе приводит к возрастанию продукции поверхностно-активных соединений, что может быть использовано при оптимизации синтеза данных вторичных метаболитов для биотехнологического применения.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» (задание 3.6.2) и гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Б21-142).

Acknowledgments. This work was supported by the State Program of Scientific Research “Biotechnology-2” (project 3.6.2) and the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project № B21-142).

Список использованных источников

1. *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants / M. T. Nazari [et al.] // J. Environ. Management. – 2022. – Vol. 323 – Art. 116220. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116220>
2. da Rosa, C. F. C. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil / C. F. C. da Rosa, D. M. G. Freire, H. C. Ferraz // J. Environ. Chem. Eng. – 2015. – Vol. 3, N 1. – P. 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.008>
3. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants / L. A. Sarubbo [et al.] // Chem. Ecol. – 2015. – Vol. 31, N 8. – P. 707–723. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>
4. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills / R. de C. F. S. Silva [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15, N 7. – P. 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>
5. Microbial biosurfactants as additives for food industries / J. M. Campos [et al.] // Biotechnol. Prog. – 2013. – Vol. 29, N 5. – P. 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
6. Eminence of microbial products in cosmetic industry / P. L. Gupta [et al.] // Nat. Prod. Bioprospect. – 2019. – Vol. 9, N 4. – P. 267–278. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0215-0>
7. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 57, N 4. – P. 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1024>
8. Statistical design, a powerful tool for optimizing biosurfactant production : a review / B. Bertrand [et al.] // Colloids and Interfaces. – 2018. – Vol. 2, N 3. – P. 36. <https://doi.org/10.3390/colloids2030036>
9. Ghribi, D. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition / D. Ghribi, N. Zouari, S. Jaoua // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 98, N 4. – P. 823–831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02490.x>
10. Bukliarevich, H. A. Role of the structural and functional genes encoding heat shock proteins in biosurfactant synthesis by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap / H. A. Bukliarevich, M. A. Titok // Microbiology. – 2023. – Vol. 92, N 3.
11. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors σ_B , σ_C , σ_H , and σ_L in *Listeria monocytogenes* / S. Chaturongakul [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, N 1. – P. 187–200. <https://doi.org/10.1128/AEM.00952-10>
12. Tian, Y. Overproduction of the *Escherichia coli* chaperones GroEL–GroES in *Rhodococcus ruber* improves the activity and stability of cell catalysts harboring a nitrile hydratase / Y. Tian, C. Yu, Z. Shen // J. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 26, N 2. – P. 337–346. <https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09084>
13. A novel molecular chaperone GroEL2 from *Rhodococcus ruber* and its fusion chimera with nitrile hydratase for co-enhanced activity and stability / Y. Chen [et al.] // Chem. Eng. Sci. – 2018. – Vol. 192 – P. 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.07.045>
14. Pirog, T. P. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane / T. P. Pirog, T. A. Shevchuk, I. A. Klimenko // Appl. Biochem. Microbiol. – 2010. – Vol. 46, N 6. – P. 599–606. <https://doi.org/10.1134/S0003683810060074>
15. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction / M. S. Kuyukina [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2001. – Vol. 46, N 2. – P. 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00259-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00259-7)
16. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. DuBois [et al.] // Analyt. Chem. – 1956. – Vol. 28, N 3. – P. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
17. Cooper, D. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species / D. G. Cooper, B. G. Goldenberg // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53, N 2. – P. 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
18. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // Nucl. Acids Res. – 2001. – Vol. 29, N 9. – P. e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
19. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monooxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus* / H. A. Bukliarevich [et al.] // Microbiology. – 2023. – Vol. 92, N 2. – P. 242–255. <https://doi.org/10.1134/S0026261722603311>

20. Characterization of the medium- and long-chain *n*-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes / H. Liu [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 8. – P. e105506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105506>
21. A review on recent advances in the application of biosurfactants in wastewater treatment / S. T. Malkapuram [et al.] // Sustainable Energy Technologies and Assessments. – 2021. – Vol. 48. – Art. 101576. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101576>
22. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0991c is a redox-regulated molecular chaperone / S. H. Becker [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11, N 4. – P. e01545–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01545-20>
23. Ballal, A. Control of thioredoxin reductase gene (*trxB*) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus* / A. Ballal, A. C. Manna // J. Bacteriol. – 2010. – Vol. 192, N 1. – Art. 336. <https://doi.org/10.1128/JB.01202-09>
24. Sigma regulatory network in *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 / V. Štěpánek [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2022. – Vol. 369, N 1. – Art. fnac014. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac014>
25. Characterization of a novel heat shock protein (Hsp22.5) involved in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* / B. Abomoelak [et al.] // J. Bacteriol. – 2011. – Vol. 193, N 14. – P. 3497–3505. <https://doi.org/10.1128/JB.01536-10>
26. Ortiz de Orué Lucana, D. ROS-mediated signalling in bacteria: zinc-containing Cys-X-X-Cys redox centres and iron-based oxidative stress / D. Ortiz de Orué Lucana, I. Wedderhoff, M. R. Groves // J. Signal Transduct. – 2012. – Vol. 2012. – P. 605905. <https://doi.org/10.1155/2012/605905>

References

1. Nazari M. T., Simon V., Machado B. S., Crestani L., Marchezi G., Concolato G., Ferrari V., Colla L. M., Piccin J. S. *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *Journal of Environmental Management*, 2022, vol. 323, art. 116220. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116220>
2. da Rosa C. F. C., Freire D. M. G., Ferraz H. C. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2015, vol. 3, no. 1, pp. 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.008>
3. Sarubbo L. A., Rocha Jr B. R., Luna J. M., Rufino R. D., Santos V. A., Banat I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chemistry and Ecology*, 2015, vol. 31, no. 8, pp. 707–723. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>
4. Silva R. de C. F. S., Almeida D. G., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Sarubbo L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, vol. 15, no. 7, pp. 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>
5. Campos J. M., Stamford T. L. M., Sarubbo L. A., de Luna J. M., Rufino R. D., Banat I. M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 1097–1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1796>
6. Gupta P. L., Rajput M., Oza T., Trivedi U., Sanghvi G. Eminence of microbial products in cosmetic industry. *Natural Products and Bioprospecting*, 2019, vol. 9, no. 4, pp. 267–278. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0215-0>
7. Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Anti-microbial Chemotherapy*, 2006, vol. 57, no. 4, pp. 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl024>
8. Bertrand B., Martínez-Morales F., Rosas-Galván N. S., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández M. R. Statistical design, a powerful tool for optimizing biosurfactant production: a review. *Colloids and Interfaces*, 2018, vol. 2, no. 3, p. 36. <https://doi.org/10.3390/colloids2030036>
9. Ghribi D., Zouari N., Jaoua S. Improvement of bioinsecticides production through adaptation of *Bacillus thuringiensis* cells to heat treatment and NaCl addition. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, vol. 98, no. 4, pp. 823–831. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02490.x>
10. Bukliarevich H. A., Titok M. A. Role of the structural and functional genes encoding heat shock proteins in biosurfactant synthesis by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap. *Microbiology*, 2023, vol. 92, no. 3.
11. Chaturongakul S., Raengpradub S., Palmer M. E., Bergholz T. M., Orsi R. H., Hu Y., Ollinger J., Wiedmann M., Boor K. J. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors σ B, σ C, σ H, and σ L in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 77, no. 1, pp. 187–200. <https://doi.org/10.1128/AEM.00952-10>
12. Tian Y., Yu C., Shen Z. Overproduction of the *Escherichia coli* chaperones GroEL–GroES in *Rhodococcus ruber* improves the activity and stability of cell catalysts harboring a nitrile hydratase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 26, no. 2, pp. 337–346. <https://doi.org/10.4014/jmb.1509.09084>
13. Chen Y., Jiao S., Wang M., Chen J., Yu H. A novel molecular chaperone GroEL2 from *Rhodococcus ruber* and its fusion chimera with nitrile hydratase for co-enhanced activity and stability. *Chemical Engineering Science*, 2018, vol. 192, pp. 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.07.045>
14. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Klimenko I. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46, no. 6, pp. 599–606. <https://doi.org/10.1134/S0003683810060074>
15. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Philp J. C., Christofi N., Dunbar S. A., Ritchkova M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, vol. 46, no. 2, pp. 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00259-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00259-7)
16. DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, vol. 28, no. 3, pp. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

17. Cooper D. G., Goldenberg B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, no. 2, pp. 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
18. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, no. 9, p. e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
19. Bukliarevich H. A., Gurinovich A. S., Filonov A. E., Titok M. A. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monoxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus*. *Microbiology*, 2023, vol. 92, no. 2, pp. 242–255. <https://doi.org/10.1134/S0026261722603311>
20. Liu H., Xu J., Liang R., Liu J. Characterization of the medium- and long-chain *n*-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 8, p. e105506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105506>
21. Malkapuram S. T., Sharma V., Gumfekar S. P., Sonawane S., Sonawane S., Boczkaj G., Seepana M. M. A review on recent advances in the application of biosurfactants in wastewater treatment. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 2021, vol. 48, art. 101576. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101576>
22. Becker S. H., Ulrich K., Dhabaria A., Ueberheide B., Beavers W., Skaar E. P., Iyer L. M., Aravind L., Jakob U., Darwin K. H. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0991c is a redox-regulated molecular chaperone. *mBio*, 2020, vol. 11, no. 4, p. e01545–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01545-20>
23. Ballal A., Manna A. C. Control of thioredoxin reductase gene (*trxB*) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2010, vol. 192, no. 1, art. 336. <https://doi.org/10.1128/JB.01202-09>
24. Štěpánek V., Dostálová H., Busche T., Blumenstein J., Grulich M., Plašil L., Rucká L., Nešvera J., Pátek M. Sigma regulatory network in *Rhodococcus erythropolis* CCM2595. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, vol. 369, no. 1, art. fnac014. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac014>
25. Abomoelak B., Marcus S. A., Ward S. K., Karakousis P. C., Steinberg H., Talaat A. M. Characterization of a novel heat shock protein (Hsp22.5) involved in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 2011, vol. 193, no. 14, pp. 3497–3505. <https://doi.org/10.1128/JB.01536-10>
26. Ortiz de Orué Lucana D., Wedderhoff I., Groves M. R. ROS-mediated signalling in bacteria: zinc-containing Cys-X-X-Cys redox centres and iron-based oxidative stress. *Journal of Signal Transduction*, 2012, vol. 2012, p. 605905. <https://doi.org/10.1155/2012/605905>

Информация об авторах

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

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

Information about the authors

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

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