

ПЕРВИЧНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

М.И. Чернявская¹, А.А. Букляревич¹, А.Э. Охремчук¹, Л.Н. Валентович², М.А. Титок¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

e-mail: mm-cher@tut.by

Введение

Нефть и нефтепродукты (ННП) являются одними из основных загрязнителей природных и производственных сред, представляющими угрозу для сообществ живых организмов. Кроме того при разливах ННП повышается угроза возникновения пожаров, характеризующихся затяжным характером и высокой интенсивностью горения [1]. В связи с этим ликвидация нефтяных загрязнений является актуальной задачей, для решения которой используют механические, физические и биологические методы. Привлекательность биологических методов заключается в наибольшей безопасности для экосистем.

Нефть представляет собой сложную смесь углеводородов, серо-, азот- и кислородсодержащих органических веществ, а также неорганических компонентов, в частности ионов тяжелых металлов [2]. Учитывая многокомпонентность этого соединения, отдельные штаммы - деструкторы нефти, безусловно, не могут утилизировать все ее составляющие, но должны обладать устойчивостью к ним. Крайне высоким потенциалом в биодеградации токсичных соединений, в том числе входящих в состав нефти, обладают актинобактерии рода *Rhodococcus*. Информативным методом, позволяющим оценить метаболический потенциал бактерий-деструкторов, является полногеномное секвенирование, с последующим функциональным анализом систем катаболизма.

Целью данной работы являлся анализ нуклеотидных последовательностей генома бактерий – деструкторов нефти *R. pyridinivorans* 5Ap и их сравнение с известными детерминантами филогенетически родственных штаммов.

Методы исследования

Объектом исследования служили бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, обладающие широким спектром утилизируемых субстратов. Помимо нефти, они деградировали керосин, дизельное топливо, гексан, нонан, гексадекан, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, бензол, этилбензол, фенол, толуол, о-, м-, п-ксилолы, нафталин, фенантрен, антрацен, флюорен, бифенил, пирен, пиридин [3].

Тотальную ДНК бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap для полногеномного секвенирования выделяли саркозиловым методом [4]. Библиотеку ДНК для секвенирования готовили с использованием набора реактивов Nextera XT library prep kit, Illumina. Секвенирование проводили с использованием системы MiSeq, Illumina и набора реагентов «MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle)» MS-102-3003.

Адаптерные и недостоверные последовательности удаляли с помощью программы Trimmomatic-0.36 [5]. Отобранные парноконцевые прочтения были объединены в более протяженные контиги с помощью программы SPAdes-3.8.1 [6]. Полученные контиги анализировали с использованием программы BLASTN2.2.1 [7].

При сборке контигов в последовательность хромосомы для сравнения использовали нуклеотидные последовательности хромосом бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (номер в базе данных ГенБанк NCBI - CP006996.1) и *R. rhodochrous* ATCC 21158 (AZHI01000107).

Для автоматической аннотации генома использовали программы RAST и RASTtk [8-9].

Для сравнения нуклеотидных последовательностей использовали программы MEGA4 [10] и Mauve [11].

Результаты и обсуждение

В результате секвенирования генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap было получено 1 505 850 парноконцевых прочтений, которые после удаления (с использованием программы Trimmomatic-0.36) адаптерных и недостоверных последовательностей были объединены в более протяженные контиги (всего 287 файлов со средним покрытием k-мерами 27,5618) с помощью программы SPAdes-3.8.1. С помощью программы BLASTN2.2.1 было отобрано 76 контигов, 55 из которых были объединены в нуклеотидную последовательность хромосомы размером 5 220 443 п.н. (http://www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html). Для объединения контигов их последовательности сравнивали с последовательностями хромосом бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996.1) и *R. rhodochrous* ATCC 21158 (AZH101000107). Не заполненными остались лишь два участка, протяженность которых составила, предположительно, около 100 п.н. (2 150 017-2 150 116 п.н.) и 500 п.н. (1 994 004-1 994 503 п.н.), представленные ДНК профагов.

Остальные контиги (http://www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html) предположительно содержали последовательности ДНК внехромосомных генетических элементов. Общая протяженность секвенированного генома составила 5 881 652 п.н. С использованием программы для аннотирования RASTtk выявлено 5053 хромосомных гена, детерминирующих синтез полипептидов, 53 гена тРНК и 12 – рРНК (4 кластера 5S, 16S, 23S).

Наиболее близкими к геному *R. pyridinivorans* 5Ap были геномы бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996.1) и *Rhodococcus* sp. p52 (CP016819.1). Тем не менее, при сравнении с использованием программы Mauve [11] между ними были обнаружены различия в расположении гомологичных областей. Кроме того, в геноме исследованных бактерий присутствовали области, не имеющие аналогов в геномах *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996.1) и *Rhodococcus* sp. p52 (CP016819.1), в частности профаги, инсерционные последовательности и некоторые гены биодegradации. В хромосоме *R. pyridinivorans* 5Ap выявлено всего 5 локусов размером от 8 408 п.н. до 52 001 п.н. (координаты 760 222-794 623 п.н.; 1 989 163-1 998 781 п.н.; 2 147 385-2 155 782 п.н.; 3 054 029-3 106 029 п.н.; 3 557 892-3 601 322 п.н.), которые содержали гены, проявляющие сходство с геномами фагов.

Хромосомы штаммов *R. pyridinivorans* 5Ap и *R. pyridinivorans* SB3094 имели сходные размеры около 5,2 млн п.н., тогда как хромосома штамма *Rhodococcus* sp. p52 характеризовалась меньшей протяженностью - около 4,9 млн п.н. (таблица 1). Общим для штаммов было наличие 4 кластеров генов, кодирующих рРНК, а также близкие значения содержания Г/Ц-пар – около 68%. Кроме того, во всех трех штаммах были выявлены плазмиды (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, *R. pyridinivorans* SB3094 и *Rhodococcus* sp. p52

Характеристики	<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	<i>R. pyridinivorans</i> SB3094 (CP006996.1, CP006997.1, CP006998.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (CP016819.1, CP016822.1, CP016821.1, CP016820.1)
Источник выделения	Почва, загрязненная нефтепродуктами, Ливия	Почва, загрязненная нефтепродуктами, США	Почва, загрязненная нефтепродуктами, Китай
Размер хромосомы, п.н.	Около 5 220 443	5 227 080	4 893 347
Содержание Г/Ц, %	67,9	68	68,1
Количество предсказанных ОРС	5 053	5 158	5 023

Продолжение таблицы 1

Характеристики	<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	<i>R. pyridinivorans</i> SB3094 (CP006996.1, CP006997.1, CP006998.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (CP016819.1, CP016822.1, CP016821.1, CP016820.1)
Количество псевдогенов	Не определено	59	153
Количество генов тРНК	53	55	53
Количество генов рРНК	12 (4 кластера 5S, 16S, 23S)	12 (4 кластера 5S, 16S, 23S)	12 (4 кластера 5S, 16S, 23S)
Количество плазмид	Предположительно 3 (2 конъюгативные, 1 неконъюгативная (?))	2 (кольцевая плазмида размером 361 397 п.н. – 1 копия на клетку; многокопийная кольцевая плазмида размером 2 035 п.н.)	3 (кольцевая плазмида pDF01 – 170 002 п.н.; линейная плазмида pDF02 – 242 246 п.н.; линейная плазмида pDF03 – 107 688 п.н.)

Предположение о наличии двух конъюгативных плазмид (таблица 1) в геноме *R. pyridinivorans* 5Ap основано на присутствии в составе отдельных нуклеотидных последовательностей (контиги NODE_25 и NODE_35, соответственно) генов, определяющих конъюгативный перенос (*tra*-локусы). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей генов, локализованных в составе контигов NODE_25 и NODE_35 и детерминирующих синтез белка ТраА, позволил установить их принадлежность к разным группам (рисунок 1). Следует отметить, что в клетках бактерий *Rhodococcus* sp. p52 также выявлена плазмида биodeградации дибензофурана pDF02 (CP016820.1), система конъюгационного переноса которой сходна с обнаруженной на контиге NODE_25, и pDF03 (CP016822.1), *tra*-локус которой гомологичен обнаруженному на контиге NODE_35.

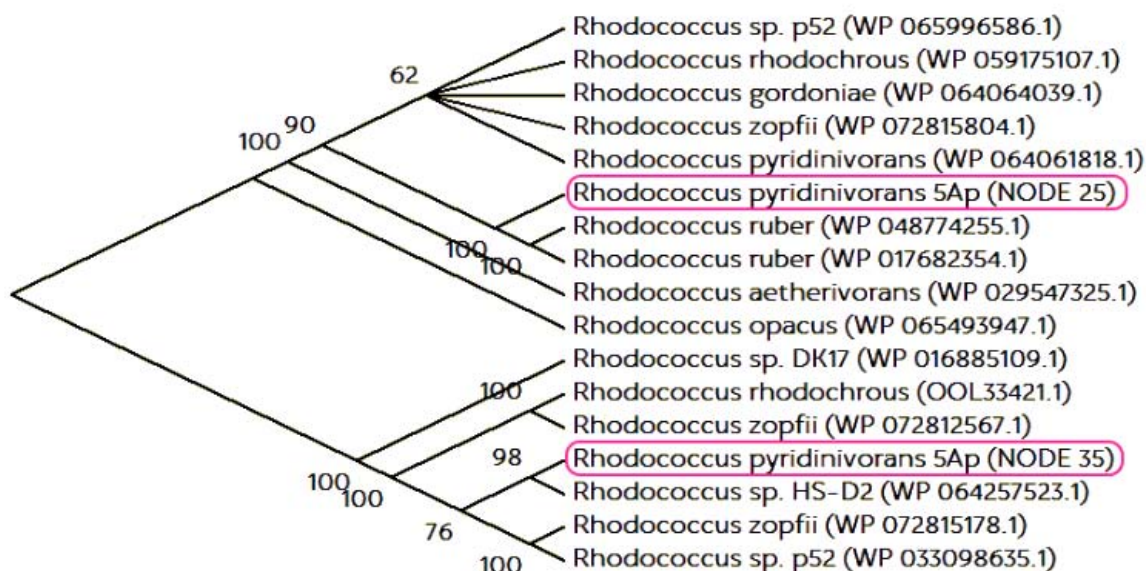


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево белков ТраА бактерий рода *Rhodococcus*. Числовые значения в узлах – значения бутстрепов. Сравнение проводили по методу ближайшего соседа

Контиг NODE_17 (152 т.п.н.) не содержал последовательностей, сходных с известными плазмидными генами, кодирующими белки, участвующие в репликации и конъюгации. В его составе были обнаружены гены, кодирующие систему рестрикции-модификации I типа. Подобного рода системы, обеспечивающие защиту клетки от чужеродной ДНК, включают

белки, обладающие эндонуклеазной (R) и метилтрансферазной (M) активностью, функциональная активность которых проявляется в комплексе с субъединцей, ответственной за сайт-специфическое распознавание ДНК (S-субъединица) [12]. На основании сходства с известными, обнаруженная система, предположительно обеспечивает метилирование аденозиновых оснований. Аминокислотные последовательности M и R-субъединиц проявляли соответственно 95% и 94% сходства с гомологичными белками бактерий *R. ruber* и *R. rhodochrous* и 93% - с соответствующими белками *R. pyridinivorans*. В то же время для S-субъединицы было обнаружено только 40% сходство аминокислотной последовательности с гомологичными белками *R. ruber* и *R. rhodochrous* и 57% – со *Streptomyces* sp. Присутствие системы рестрикции-модификации может объяснять крайне низкую эффективность рекомбинации (10^{-8} – 10^{-9}) при проведении инсерционного мутагенеза отдельных генетических детерминант, поскольку ограничивает вероятность введения векторных молекул, и низкую частоту конъюгационного переноса конъюгативных плазмид в клетки других видов бактерий. Кроме того, выявленная система рестрикции-модификации может обеспечить стабилизацию внехромосомных генетических элементов и геномных островков в клетках исследуемых бактерий [12].

Помимо генов системы рестрикции-модификации контиг NODE_17 содержал гены нетипичной для родококков системы биосинтеза сидерофоров. Во-первых, нуклеотидные последовательности в этом локусе характеризовались более низким (по сравнению с хромосомой) содержанием Г/Ц-оснований – 55-63%. Во-вторых, подобных генов либо кодируемых ими аминокислотных последовательностей не было обнаружено у близкородственных видов. Наибольшее сходство нуклеотидных последовательностей (65-70%) было выявлено с генами *Mycoboccus hansupus* (CP012109.1), а аминокислотные последовательности белков были наиболее сходны с таковыми бактерий *Streptomyces* spp. (66-80%). Продукция сидерофоров обеспечивает бактериям эффективное потребление ионов железа из внешней среды, а также может определять стимулирующее действие на рост растений, что делает таких бактерий перспективными для использования при фитобиоремедиации (с участием растений и микроорганизмов) загрязненных углеводородами территорий [13].

Выводы

Таким образом, в результате первичного сиквенс-анализа было установлено, что геном бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap представлен хромосомой (размером около 5,2 млн п.н.) и внехромосомными генетическими элементами, два из которых являются конъюгативными. Одна из секвенированных последовательностей (NODE_17) представляет собой новый, ранее не описанный плазмидный репликон, в состав которого входят гены, определяющие биосинтез сидерофоров и систему рестрикции-модификации I типа. Высокая степень сходства генов, кодирующих белки, участвующие в конъюгационном переносе плазмид у разных видов (рисунок 1), свидетельствует об активных процессах горизонтального переноса генетического материала у родококков. Дальнейший генетический анализ отдельных детерминант позволит оценить их вклад в функциональные особенности бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Договор № Б16Р-082).

Список литературы

1. Журов, М.М. Композиционный адсорбент на основе модифицированной бентонитовой глины для ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов : автореф. дисс... канд. тех. наук. : 05.26.02 / М.М. Журов; ГУО «Университет гражданской защиты Министерства по чрезвычайным ситуациям Республики Беларусь». - Минск, 2017. - 32 л.

2. Хант, Дж. Геохимия и геология нефти / Дж. Хант; перевод с англ. А.И. Конюхова, Г.В. Семерниковой, В.В. Чернышева; под ред. Н.Б. Вассоевича, А.Я. Архипова. – М.: «Мир», 1982. – 706 с.

3.Чернявская, М.И. Метаболический потенциал микроорганизмов, выделенных из загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв / М.И. Чернявская, М.В. Козлова, М.А. Титок // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2014. – № 3. – С. 33-37.

4.te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S.D. Ehrlich // Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. – 1986. – Vol. 83, № 8. - P. 2541-2545.

5.Bolger, A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [Electronic resource] / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – btu170. — Mode of access: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/04/12/bioinformatics.btu170.full>.- Date of access: 01.09.2016.

6.SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich [et al.] // J. Comp. Biol. – 2012. – Vol. 19, iss. 5. – P. 455-477.

7.Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // J. Mol. Biol. – 1990. - Vol. 215, iss. 3. – P. 403-404.

8.The RAST server: rapid annotations using subsystems technology [Electronic resource] / R.K. Aziz [et al.] // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – Article number: 75. — Mode of access: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-75>. - Date of access: 01.09.2016.

9.RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotating batches of genomes [Electronic resource] / T. Brettin [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – Article number: 8365. — Mode of access: <http://www.nature.com/articles/srep08365>. - Date of access: 01.09.2016.

10.MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2007. – Vol. 24, № 8. – P. 1596-1599.

11.Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements / A. C. E. Darling [et al.] // Genome Res. – 2004. – Vol. 14, №. 7. – P. 1394-1403.

12.Vasu K., Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense / K. Vasu, V. Nagaraja // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2013. – Vol. 77, №. 1. – P. 53-72.

13.Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits / M. Pacwa-Płociniczak [et al.] // Journal of Environmental Management. – 2016. – Vol. 168. – P. 175-184.

PRIMARY GENOMICS ANALYSIS OF OIL-DEGRADING BACTERIA *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* STRAIN 5Ap

M.I. Charniauskaya¹, H.A. Buklyarevich¹, A.E. Akhremchuk¹, L.N. Valentovich², M.A. Titok¹

¹Belarusian State University, Minsk, The Republic of Belarus

²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, The Republic of Belarus

e-mail: mm-cher@tut.by

The genome of oil-degrading bacteria *Rhodococcus pyridinivorans* strain 5Ap was sequenced and annotated which revealed a chromosome size of 5, 200 kb and three putative extrachromosomal genetic elements. Prophages which were not described for this bacterial species previously were detected in chromosome. One of the extrachromosomal genetic elements contains genes determined unique restriction-modification system and siderophore biosynthesis. Because of siderophore biosynthesis genes presence bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap may be promising agents in plant growth promoting as well as in microbe assisted phytoremediation of hydrocarbon-polluted area.