

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
АНАЛИЗ ГЕНОВ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*, КОДИРУЮЩИХ
СИНТЕЗ АЛКАН-1-МОНООКСИГЕНАЗ© 2023 г. А. А. Букляревич^а, А. С. Гуринович^а, А. Е. Филонов^б, М. А. Титок^{а, *}^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Выявлены особенности в организации и локализации генов *alkB* и кодируемых ими алкан-1-монооксигеназ у бактерий рода *Rhodococcus*. Установлено, что для всех представителей одной филогенетической группы характерен определенный тип генов *alkB* (тип *alkB1* в составе оперонов, содержащих гены, кодирующие рубредоксины, рубредоксинредуктазу и регуляторный белок, и/или тип *alkB2* в составе оперонов без гена, кодирующего рубредоксинредуктазу, и дополнительно отдельно локализованные детерминанты типа *alkB3–alkB8*). Гены *alkB1*-типа присутствовали в хромосомах бактерий групп В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*), D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), G (*R. triatomae*) и E (*R. fascians*). Гены *alkB2*-типа находились в строго определенных локусах хромосом бактерий филогенетических групп А (*R. hoagii/R. equi*), В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) и D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). Отдельно локализованные гены *alkB3–alkB5* обнаруживались в хромосомах бактерий группы D (*alkB5* только у представителей вида *R. qingshengii*), гены *alkB6* – бактерий группы В1 и В2, гены *alkB7–alkB8* – бактерий группы E. Белки, кодируемые генами *alkB1* и *alkB2*, представлены тремя филогенетическими группами. Первая из них включала белки AlkB1-типа бактерий группы В1 и С, а также белки AlkB2-типа бактерий группы D и А; вторая – белки AlkB2-типа бактерий группы В2; третья – белки AlkB1-типа бактерий группы G и D. Алкан-1-монооксигеназы, кодируемые отдельно локализованными генами *alkB3–alkB8*, представлены тремя филогенетическими линиями: первая – AlkB3–AlkB5, вторая – AlkB6 третья – AlkB7 и AlkB8. В геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar выявлены характерные для представителей группы В1 гены *alkB2* и *alkB6*. Показано, что данные детерминанты необходимы для синтеза биоПАВ. У мутанта с нарушенным геном *alkB2* эмульгирующая активность уменьшалась при 28 и 42°C, соответственно, в 16 и 3 раза, а количество содержащих трегалозу сурфактантов – в 7 и 3 раза. У мутанта с нарушенным геном *alkB6* вне зависимости от температуры культивирования регистрировали снижение эмульгирующей активности в 1.2 раза и уменьшение синтеза содержащих трегалозу сурфактантов более чем в 2 раза. Полученные результаты свидетельствовали о ключевой роли гена *alkB2* в синтезе биоПАВ при разных температурных режимах. В то же время роль гена *alkB6* возрастала при температуре 42°C, что могло быть обусловлено его повышенной транскрипционной активностью.

Ключевые слова: гены *alkB*, алкан-1-монооксигеназы, биоПАВ**DOI:** 10.31857/S0026365622600687, **EDN:** ATIXSO

Сырая нефть и продукты ее переработки широко используются в качестве основных источников энергии. В результате утечек при добыче, транспортировке и несоблюдения условий хранения углеводороды природного и антропогенного происхождения накапливаются в окружающей среде и негативно влияют на жизнедеятельность всех живых организмов. Наиболее распространенными загрязнителями являются алканы, составляющие от 20 до 50% сырой нефти, а также входящие

в состав нефтепродуктов и отходов переработки нефти (нефтешламы) (Liu et al., 2014). Кроме того, алканы могут выделяться в окружающую среду в результате жизнедеятельности бактерий, водорослей и грибов (Schirmer et al., 2010). Такие свойства, как неполярность, низкая растворимость в воде, высокая степень накопления в клеточных мембранах, большие энергетические затраты на окисление делают эти молекулы инертными и сложными для микробного метаболизма (Rojo,

2009; Liu et al., 2014). Тем не менее, широкий круг микроорганизмов (бактерии, одноклеточные грибы и водоросли) способны утилизировать алифатические углеводороды за счет присутствия в их хромосомах генов, кодирующих синтез гидроксилаз (алкан-1-моноксигеназы, цитохромы P450), обеспечивающих окисление алканов (van Beilen, Funhoff, 2007; Rojo, 2009; Nie et al., 2014). Алкан-1-моноксигеназы, содержащие гистидин в функционально значимых доменах Hist1 [HELGHK]; Hist2 [EHNXGHN], Hist3 [LQRHSDHNA] и HYG [NYLEHYGI] (Shanklin et al., 1994; Smits et al., 1999; Whyte et al., 2002), могут входить в состав ферментативных комплексов, функциональная активность которых зависит от переносчиков электронов (рубредоксины и рубредоксинредуктазы) (van Beilen et al., 2002; Nie et al., 2014).

Среди деструкторов особое место принадлежит бактериям рода *Rhodococcus*, способным использовать в качестве единственного источника углерода и энергии широкий спектр алифатических, ароматических и полициклических углеводородов природного и антропогенного происхождения (Larkin et al., 2005; Martínková et al., 2009; Kim et al., 2018). Практически неограниченные метаболические возможности данных микроорганизмов, большинство видов которых не являются патогенными для растений и животных (патогены растений представлены штаммами вида *R. fascians*, патогены животных — *R. hoagii/R. equi*), во многом обусловлены особенностями генетической организации (Sepiceros et al., 2017). Они не только содержат сложно организованные системы деградации, но и способны синтезировать поверхностно-активные вещества (биоПАВ) с уникальными свойствами (Kügler et al., 2015). Эти соединения, обладая высокой функциональной активностью в небольших концентрациях, снижают поверхностное и межфазное натяжение жидкостей и эмульгируют гидрофобные субстраты, повышая их доступность для микробной деградации (da Rosa et al., 2015; Eras-Muñoz et al., 2022). Для отдельных представителей данной таксономической группы достаточно подробно охарактеризованы системы деградации и установлен химический состав поверхностно-активных соединений. При этом наиболее детально изучены гликолипиды, продуцируемые бактериями *R. erythropolis* (Kuyukina et al., 2015; Luong et al., 2018). Показано, что оптимальным индуктором синтеза данных соединений является гексадекан (Mutalik et al., 2008). Первый этап окисления гексадекана обеспечивается алкан-1-моноксигеназами, а в результате последующих химических реакций образуются продукты (ацетилКоА, жирные кислоты), способные в ходе глюконеогенеза включаться в синтез углеводов (например, триозы) и синтез жирных кислот, входящих в состав клеточной стенки (миколаты) (Kuyukina, Ivshina, 2010). Для штамма *Rhodococcus*

sp. SD-74 показано, что при нарушении гена *alkB* не происходила синтеза биоПАВ (сукцинилтретгалозолипидов) (Inaba et al., 2013).

В силу практической значимости идентификации бактерий рода *Rhodococcus* уделяется достаточно большое внимание. Тем не менее, ряд практически важных штаммов не определены до вида даже при наличии полной нуклеотидной последовательности их геномов. Дело в том, что таксономический статус филогенетически близких видов бактерий рода *Rhodococcus* затруднен в силу генетического полиморфизма и сходства генов, кодирующих синтез 16S РНК (Majidzadeh, Fatahi-Bafghi, 2018). На основании сравнения геномов, жизненно важных генов, консервативных белков, ДНК–ДНК гибридизации и физиолого-биохимических особенностей выделено 7 основных филогенетических групп бактерий рода *Rhodococcus* (A, B, C, D, E, F и G), наиболее полиморфными из которых являются группы B (B1 и B2) и E (E1 и E2) (Gürtler et al., 2004; Sangal et al., 2016). Типичными представителями группы А являются бактерии *R. hoagii/R. equi*; группы B1 — *R. aetherivorans*, *R. ruber*; группы B2 — *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*; группы C — *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*; группы D — *R. erythropolis*, *R. qingshengii*; группы E — *R. fascians*; F — *R. corynebacterioides*, *R. kroppenstedtii*; группы G — *R. triatomae*. Для идентификации бактерий рода *Rhodococcus* использовали, в том числе, последовательности генов *alkB* (Táncsics et al., 2015). Однако систематический анализ данных детерминант и кодируемых ими белков в зависимости от филогенетического статуса содержащих их бактерий не проводился.

Целью данной работы являлся молекулярно-генетический анализ *alkB*-генов и кодируемых ими белков бактерий рода *Rhodococcus* в зависимости от их филогенетического статуса, а также установление роли генов, кодирующих алкан-1-моноксигеназы, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовали штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г), *E. coli* BW19851 (Metcalf et al., 1994) и плазмиду pK18mob (Schäfer et al., 1994). Бактерии культивировали при температуре 28 и 42°C в полной пептонно-дрожжевой среде (г/л: пептон ферментативный — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 8) с добавлением гексадекана (2%) в качестве индуктора и минеральной модифицированной среде Мюнца (Pirog et al., 2010), содержащей сукцинат натрия (0.4%) или гексадекан (2%) в качестве

источников углерода. Агаризованные среды содержали 1.5% агара.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозидовым методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (“Jena Bioscience”, Германия).

Аmplификация и клонирование генов. Для амплификации использовали Pfu ДНК-полимеразу производства “Thermo Scientific” (ЕС) и праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 5% DMSO, 3% глицерина, 2.5 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер. Для амплификации фрагмента гена *alkB2* размером 550 п.н. использовали праймеры *alk-H1F* (5'-cigiicacgaittiggicaaagaagg-3') и *alk-H3R* (5'-igcitgitgatciiigtgicgctgiag-3') (Chénier et al., 2003) при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 55°C – 1 мин, 68°C – 40 с (30 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл). Для амплификации гена *alkB6* размером 660 п.н. использовали праймеры *alkB1-F* (5'-cttctacgtcgaacasaatcg-3') и *alkB1-R* (5'-tgaatcgcattctgttctcag-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 60°C – 1 мин, 68°C – 30 с (30 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл).

Продукты амплификации генов *alkB2* и *alkB6* очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit производства “Jena Bioscience” (Германия) и лигировали с суицидальным вектором pK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *SmaI*.

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методу, приведенному в работе (Wood, 1983).

Плазмиды pK18mob с клонированными фрагментами генов *alkB2* и *alkB6* в клетки *R. pyridinivorans* 5Ar вводили методом конъюгации, описанным в работе (van der Geize et al., 2001). В качестве доноров в конъюгационных скрещиваниях для введения гибридных плазмид использовали штамм бактерий *E. coli* BW19851. В качестве реципиентов использовали рифампицинрезистентные варианты бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar, отобранные в результате спонтанного мутагенеза. Для получения спонтанных мутантов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar устойчивых к рифампицину, бактерии культивировали в 5 мл жидкой полноценной пептонно-дрожжевой среды в течение 24 ч при 28°C, 140 об./мин. Центрифугировали 5 мин при 6500 об./мин. Осадок высевали на плотную среду с рифампицином (100 мг/мл) и инкубировали при 28°C до появления устойчивых к антибиотику колоний.

Анализ инсерционных мутантов. Интеграцию гибридных плазмид в хромосому бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. В результате с исполь-

зованием праймера M13F (5'-actggccgctgctttaca-3'), отжигающегося на последовательности вектора pK18mob, и праймеров FAlkB2-r (5'-tgatgctgaagatcggactc-3') и RAlkB6-out (5'-ctaactgcgaccacsgtatc-3'), отжигающихся, соответственно, вне области встраивания гибридных векторов в ген *alkB2* и *alkB6*, были получены фрагменты искомого размера 663 и 743 п.н. В обоих случаях амплификацию проводили при режиме 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 50 с (25 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Анализ синтеза биоПАВ. Для определения содержания гликолипидов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar культивировали в полноценном пептонно-дрожжевом бульоне с добавлением 2% гексадекана в течение 72 ч с аэрацией (140 об./мин). Экстракцию сурфактанта осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира (Kuyukina et al., 2001) с последующим разведением полученного препарата в 10 раз. С использованием фенол-сернокислого метода (DuBois et al., 1956) определяли содержание трегалозы, являющейся частью гликолипида, на спектрофотометре Metertech SP-8001 (Тайвань). Концентрацию сахара устанавливали согласно построенному градуировочному графику зависимости оптической плотности раствора от концентрации трегалозы (0–130 мг/л) при длине волны 483 нм.

Индекс эмульгирования определяли по методике, описанной в работе (Cooper, Goldenberg, 1987), и рассчитывали как отношение объема эмульсии, образующейся при перемешивании культуральной жидкости с гексадеканом, к общему объему раствора.

ПЦР в реальном времени. Для определения экспрессии генов *alkB* использовали культуру бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar на поздней экспоненциальной фазе роста после культивирования в модифицированной среде Мюнца с гексадеканом 2%, либо 0.4% сукцината натрия в качестве единственного источника углерода. Для получения препаратов тотальной РНК использовали набор Aurum™ Total RNA Mini Kit (“Bio-Rad”, США), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, качество препаратов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакцию амплификации проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия) при режиме: 95°C – 3 мин; 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 5 с (40 циклов). Контаминация геномной ДНК во всех исследуемых образцах не превышала 3%. В качестве референсного использовали ген 16S

рПНК ($SD = 0.82$; $CV = 8.5\%$). Относительное количество мПНК определяли по формуле Pfaffl (Pfaffl, 2001). Для статистического анализа данных использовали непарный критерий Стьюдента для сравнения данных с помощью программы RStudio версии 4.0.0. Все результаты получены из пяти независимых повторностях.

Для амплификации фрагмента генов *alkB2* в режиме реального времени использовали праймеры F-*alkB2*-r (5'-tgatgtcgaagatcggactc-3') и R-*alkB2*-r (5'-tagaagtgtccgtagaacgac-3'). Для амплификации гена *alkB6*: F-*alkB1*-r (5'-tattgatcatcctggctctgttc -3') и R-*alkB1*-rn (5'-tgaatcgattctgttctcag-3'), для референсного гена 16S: 5Ap_835f (5'-gccgtagccaacgcattaag-3') и 5Ap_1163r (5'-caccttctccgagttgacc-3'). Для каждой пары праймеров эффективность амплификации определяли по значению угла наклона калибровочной кривой. Специфичность реакции подтверждали анализом кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле.

Информативный анализ. С помощью программы SyntTax (сайт: <https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/Default.aspx>) проводили анализ детерминант, локализованных выше и ниже по течению от оперонов с генами *alkB1–alkB2* и отдельно расположенными генами *alkB3–alkB8* в 122 геномах бактерий рода *Rhodococcus*. Для анализа генов *alkB* использовали полные нуклеотидные последовательности геномов или отдельные контиги из ГенБанка NCBI.

Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы BLASTN2.8.0 (сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных алкан-1-монооксигеназ бактерий рода *Rhodococcus* осуществляли в базе данных NCBI с использованием программы psi-blast. Для поиска гомологичных алкан-1-монооксигеназ использовали типовые аминокислотные последовательности белков AlkB2 (BCN60035) бактерий *R. hoagii* JCM94-27 (группа А); AlkB1 (UGQ42164), AlkB6 (UGQ42459) бактерий *R. aetherivorans* CVO21-1; AlkB2 (AHD20546), AlkB6 (AHD21141) бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (группа В); AlkB1 (UDG96167) бактерий *R. opacus* PD630 (группа С); AlkB1 (AUS30370), AlkB2 (AUS31590), AlkB3 (AUS34488), AlkB4 (AUS31854), AlkB5 (AUS30751) бактерий *R. qingshengii* djl-6-2 и AlkB1 (ALU73034), AlkB2 (ALU71748), AlkB3 (ALU68780), AlkB4 (ALU71564) бактерий *R. erythropolis* R138 (группа D); AlkB1 (AMY52517), AlkB7 (AMY52949), AlkB8 (AMY51400) бактерий *R. fascians* D188 (группа E) и AlkB1 (QNG18787) бактерий *R. triatoma* DSM 44893 (группа G). Аминокислотные последовательности гомологичных алкан-1-монооксигеназ выравнивали с помощью программы ClustalX version 2.1 и использовали для поиска функциональных доменов с примене-

нием программы MEME (сайт: <http://meme-suite.org/index.>, версия 5.1.1).

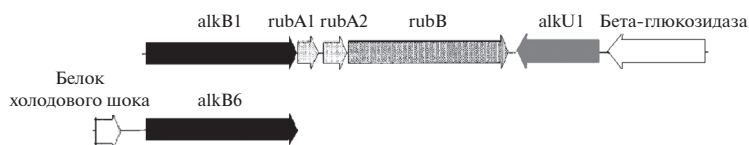
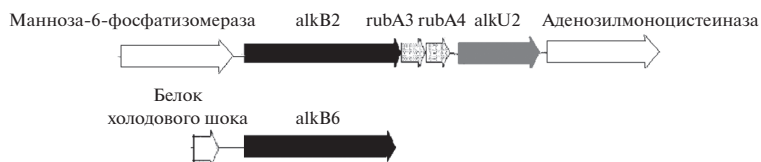
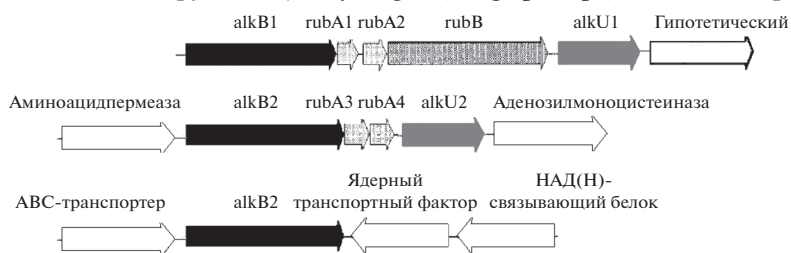
Построение филогенетического дерева полно-размерных аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ осуществляли методом ближайших соседей (1000 бутстрепов) в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности генетической организации генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. В состав всех известных алкан-1-монооксигеназ входят функциональные домены Hist1 [HELGHK]; Hist2 [EHNXGHN], Hist3 [LQRHSDHNA] и HYG [NYLEHYGI], наиболее консервативным из которых является аминокислотная последовательность HYG-домена, присутствующая в родственных монооксигеназах, таких как три ксилолмонооксигеназы (XylM), нитротолуолмонооксигеназа (NtnMa) и две цименмонооксигеназы (CymAa) (Whyte et al., 2002). Анализ генов *alkB* бактерий рода *Rhodococcus*, кодирующих содержащие данные функциональные домены белки (исключение составили бактерии группы F, для которых отсутствовали данные о полногеномном секвенировании), позволил установить, что их количество и генетическая организация зависела от принадлежности к определенной филогенетической группе (рис. 1).

На основании генетической организации можно выделить три типа генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ у бактерий рода *Rhodococcus*. Гены *alkB1* и *alkB2* входили в состав оперонов. При этом опероны, содержащие гены *alkB1*, представлены пятью генами (*alkB1*, *rubA1*, *rubA2*, *rubB* и *alkU1*), три из которых, определяли синтез переносчиков электронов (рубредоксины, кодируемые генами *rubA1*, *rubA2* и рубредоксин-редуктазы, кодируемые генами *rubB*), необходимых для функциональной активности алкан-1-монооксигеназ (van Beilen et al., 2002; Nie et al., 2014). Последний ген в оперонах являлся регуляторным. Гены *alkB2* локализованы в оперонах (*alkB2*, *rubA3*, *rubA4* и *alkU2*), в которых отсутствовали детерминанты, кодирующие рубредоксин-редуктазы. Все остальные гены (обозначены как *alkB3–alkB8*) были представлены отдельными транскрипционными единицами, локализованными в разных участках хромосом.

В результате анализа геномов было установлено, что в хромосомах бактерий филогенетических групп В1, С, D, E и G в составе оперонов выявлялись гены *alkB1*. При этом у бактерий группы В1 регуляторный ген *alkU1* не входил в состав оперона, а присутствовал в виде детерминанты, расположенной в конце оперона (за геном *rubB*), и транскрибировался в противоположном направлении

Филогенетическая группа А (*R. hoagii*)Филогенетическая группа В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*)Филогенетическая группа С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. koreensis*, *R. wratislaviensis*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*, *Rhodococcus* sp.)

Фумарилацетоацетатгидролаза alkB4 Глутамат-тРНК-синтаза



Сортаза класса F alkB5* Гипотетический

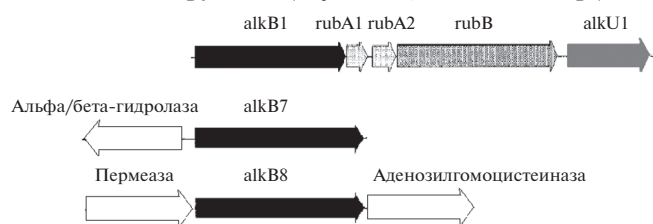
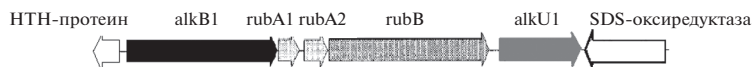
Филогенетическая группа Е (*R. fascians*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа G (*R. triatomae*)

Рис. 1. Схема генетической организации локусов, содержащих гены *alkB* бактерий рода *Rhodococcus* филогенетических групп А, В1, В2, С, D, Е, G.

В геномах бактерий филогенетической группы А (*R. hoagii/R. equi*) и В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) гены *alkB1*-типа отсутствовали, но выявлялись *alkB2*-гены, входящие в состав оперонов (*alkB2*, *rubA3*, *rubA4* и *alkU2*), в которых отсутствовали детерминанты, кодирующие рубредоксинредуктазы. Такой же тип детерминант выявлен в хромосомах бактерий группы D, в которой также присутствовали гены *alkB1*-типа.

В хромосомах бактерий группы В, D и E дополнительно выявлено от одного до пяти отдельно локализованных генов *alkB* (*alkB3–alkB8*). В то же время отдельные детерминанты не выявлены в геномах бактерий филогенетических группы А, С и G. Наибольшее число отдельных генов *alkB* (*alkB3*, *alkB4*, *alkB5*) обнаружено в хромосомах бактерий филогенетической группы D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). При этом гены *alkB3* и *alkB4* присутствовали у всех представителей этой филогенетической группы, тогда как гены *alkB5* выявлялись только в хромосомах представителей вида *R. qingshengii* (рис. 1).

Разнообразие в организации генов *alkB* в геномах бактерий рода *Rhodococcus* свидетельствует в пользу установленных ранее закономерностей, выявленных при анализе алкан-1-монооксигеназ бактерий разных систематических групп (Nie et al., 2014; Williams, Austin, 2022).

Во-первых, для функциональной активности алкан-1-монооксигеназы могут использовать разные и взаимозаменяемые белки-переносчики электронов (рубредоксины и ферредоксины, рубредоксинредуктазы и ферредоксинредуктазы), кодируемые генами, локализованными отдельно от генов *alkB*. Системы переноса электронов, необходимые для первых реакций аэробного окисления углеводов, в достаточно большом количестве представлены в геномах бактерий-деструкторов, в том числе бактерий рода *Rhodococcus*. Предполагается, что такая организация является наиболее лабильной и расширяет спектр функциональных возможностей алкан-1-монооксигеназ, в том числе, для генно-инженерных манипуляций (Williams, Austin, 2022). Исходя из вышесказанного, можно предположить, что разные типы генов *alkB* (отдельно локализованные и в составе оперонов) обладают функциональной активностью, а увеличение их количества либо страхует жизненно важные процессы, либо увеличивает спектр функциональных возможностей. В этом плане определенный интерес представляют бактерии *R. qingshengii*, в геноме которых выявляется пять *alkB*-генов (*alkB1–alkB5*).

Во-вторых, становление генетических систем, определяющих деградацию алканов, могло происходить до процессов видообразования (Nie et al., 2014). Выявленные в данной работе закономерности подтверждают данное предположение, по-

скольку виды, образующие одну филогенетическую группу, характеризуются одинаковой организацией генов *alkB*. Например, в филогенетически гетерогенной группе В выявлялись гены *alkB1*, присутствующие у всех представителей подгруппы В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*) и *alkB2*, характерные для бактерий подгруппы В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*). Однако в хромосомах всех представителей этой разнородной филогенетической группы выявлены одиночно локализованные гены *alkB6*, имеющие достаточно консервативную локализацию (перед генами *alkB6* расположены детерминанты, кодирующие синтез белков холодового шока). Данный факт может однозначно свидетельствовать в пользу монофилиетического происхождения бактерий группы В. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что при становлении геномов одними из первых могли появиться одиночные детерминанты *alkB*, использующие для своей функциональной активности переносчики электронов, кодируемые генами, локализованными в других локусах хромосом. В то же время для более эффективной деградации определенных типов алканов появлялись *alkB*-гены в составе оперонов, кодирующих часть (рубредоксины) или комплексные системы переноса электронов (рубредоксины и рубредоксинредуктазы), имеющие собственные системы регуляции (соответственно, гены типа *alkB2* и *alkB1*) (Nie et al., 2014). В пользу этого предположения свидетельствует консервативная локализация генов *alkB2* в составе оперонов и отдельно локализованных генов *alkB3*, *alkB4*, *alkB5* и *alkB8*. Генетические детерминанты, окружающие данные опероны и отдельные гены, определяли синтез функционально схожих белков у всех представителей группы А, В2, D и E, независимо от их видового статуса (штаммы бактерий *R. hoagii/equi*, *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. qingshengii* и *R. fascians*). Опероны, содержащие гены *alkB1*, имели менее консервативную локализацию, тем не менее, ниже по течению содержали функционально сходные детерминанты у всех представителей филогенетических групп В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*) и D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). Только у представителей группы E (*R. fascians*) *alkB1*-гены в составе оперонов располагались в разных локусах хромосом. При этом в геномах этих патогенных для растений бактерий выявлялись гены *alkB7* и *alkB8*, которые, в отличие от генов *alkB1*, имели более консервативную локализацию. В геномах разных штаммов *R. fascians* гены *alkB8* окружены детерминантами, определяющими белки с одинаковой функциональной активностью. Гомологичные гены присутствовали и перед детерминантами *alkB7* (рис. 1).

Факт наличия генов *alkB* в геномах патогенных бактерий является весьма примечательным.

Известно, что в хромосомах представителей рода *Mycobacterium*, в том числе патогенных (например, *M. tuberculosis*), присутствуют только гены *alkB2*-типа (в составе оперонов отсутствует ген, кодирующий рубредоксинредуктазу). Подобным образом организованы гены *alkB2* в геномах бактерий *Rhodococcus* группы А, представленной патогенами животных *R. hoagii/R. equi*, а также бактерий деструкторов группы В2 и D. В то же время патогенные для растений бактерии *R. fascians* содержали помимо генов *alkB1*-типа, расположенных в разных участках хромосом, генетические детерминанты типов *alkB7* и *alkB8* с достаточно консервативной локализацией. Поскольку алканы широко распространены в естественной среде, наличие в геноме генов *alkB* у патогенных бактерий может обеспечивать защитную функцию, либо являться ключевой детерминантой, определяющей окисление алканов, с последующим образованием липидов и углеводов, которые включаются в поверхностные структуры бактериальной клетки в виде поверхностно-активных соединений, обладающих широким спектром функциональной активности.

Таким образом, на основании проведенного анализа можно заключить, что наибольшее число *alkB*-генов локализовано в хромосомах бактерий группы D (4 и 5 генов в хромосомах *R. erythropolis* и *R. qingshengii* соответственно). В то же время бактерии *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*, способные окислять алканы, содержат один ген *alkB1*-типа. Поскольку все исследованные филогенетические группы содержали определенные типы генов *alkB*, можно предположить, что становление данных детерминант происходило до процесса видообразования за счет дубликаций и горизонтального переноса генов (Nie et al., 2014). В настоящее время в силу возрастающей антропогенной нагрузки на экосистемы горизонтальный перенос *alkB*-генов может играть важную роль в изменчивости геномов бактерий рода *Rhodococcus*. В качестве переносчиков генов *alkB* могут выступать внехромосомные генетические элементы. Анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных плазмид позволил выявить в их составе гены *alkB*. Например, в крупной плазмиде pROB01 размером 558 192 п.н. бактерий *R. opacus* В4 локализован оперон, характерный для генов *alkB1*-типа (координаты 414120–417617), в непосредственной близости от которого (ниже по течению) располагался ген, кодирующий транспозазу семейства IS6 (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована в ГенБанк NCBI под номером NC_012520.1). В составе плазмиды pdjl-6-1 размером 108815 п.н. бактерий *R. qingshengii* JCM 15477 присутствовал одиночный ген *alkB*, перед которым локализовались детерминанты, определяющие синтез транспозазы семейства IS21 (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована

на в ГенБанк NCBI под номером CP096564). В плазмиде I размером 179 109 п.н. бактерий *R. ruber* R1 выявлен одиночный *alkB*-ген (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована в ГенБанк NCBI под номером NZ_CP038031). Безусловно, по мере увеличения числа секвенированных геномов бактерий рода *Rhodococcus*, не исключается возможность обнаружения разных по организации генов *alkB* в составе внехромосомных генетических элементов. Следует отметить, что присутствие определенных комбинаций генов *alkB* плазмидного и хромосомного происхождения может обеспечить расширение спектра или увеличение эффективности утилизируемых углеводородных субстратов.

Филогенетический анализ алкан-1-монооксигеназ.

Анализ белков, кодируемых генами *alkB*, показал, что их условно можно разбить на три филогенетические группы. Первая группа являлась достаточно разнородной и представлена белками AlkB1-типа бактерий *R. aetherivorans*, *R. ruber* (группа В1) и *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis* (группа С), а также белками AlkB2-типа бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* (группа D) и *R. hoagii/equi* (группа А). Вторая филогенетическая группа включала только белки AlkB2-типа бактерий *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous* (группа В2). Третью группу составляли наиболее отдаленные от остальных в филогенетическом отношении белки AlkB1-типа бактерий *R. triatomae* (группа G) и *R. erythropolis*, *R. qingshengii* (группа D) (рис. 2).

Следует отметить, что ферменты типа AlkB1 характерны для непатогенных бактерий-деструкторов филогенетических групп В1, С и G и патогенных для растений бактерий группы Е. Ферменты второго типа AlkB2 синтезируются в клетках бактерий-деструкторов группы В2 и патогенных для животных бактерий группы А. Особое положение занимает группа D, представленная бактериями-деструкторами и наиболее изученными продуцентами биоПАВ (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), которые синтезируют два типа филогенетически отдаленных алкан-1-монооксигеназ. При этом тип AlkB1 наиболее близок к таковому бактерий G (*R. triatomae*), а тип AlkB2 проявляет наибольшее сходство с таковым патогенных для животных бактерий группы А (*R. hoagii/R. equi*).

Анализ алкан-1-монооксигеназ, кодируемых генами *alkB3–alkB8*, расположенными отдельно в достаточно определенных локусах хромосом, показал, что они образуют отдельные филогенетические группы. В первую группу входили белки AlkB3–AlkB5. При этом белки AlkB5 синтезировались только бактериями *R. qingshengii*. Алкан-1-монооксигеназы AlkB6 отличались по аминокислотной последовательности у бактерий группы В1 и В2. Наибольшим отличием характеризовались

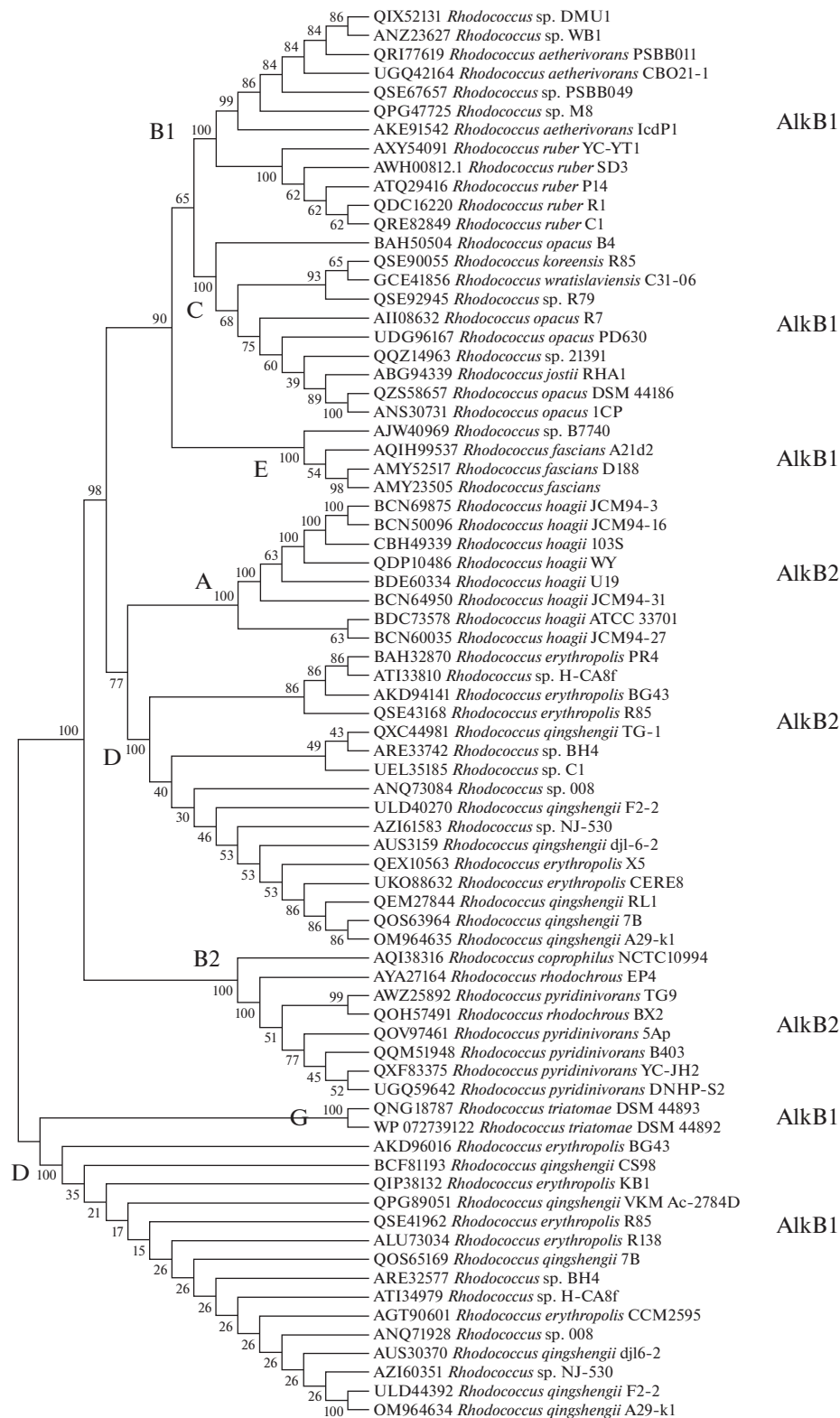


Рис. 2. Филогенетическое дерево алкан-1-монооксигеназ, детерминированных генами *alkB1* и *alkB2* бактерий рода *Rhodococcus*.

белки AlkB7 и AlkB8, синтез которых обеспечивался фитопатогенами *R. fascians* (рис. 3).

Выявленные закономерности представляются важными для изучения функциональной роли отдельных алкан-1-монооксигеназ в жизнедеятельности бактерий рода *Rhodococcus* и открывают новые возможности для установления/уточнения их таксономического статуса. Как указывалось ранее, систематике родококков уделяется большое внимание, поскольку большинство видов этого обширного рода являются эффективными деструкторами органических и неорганических соединений, а два вида вызывают заболевания животных (*R. hoagi*) и растений (*R. fascians*). Знание видовой принадлежности практически значимых микроорганизмов является неотъемлемой частью их детального генетического анализа и абсолютно необходимо для дальнейшего практического использования. Выявленные в ходе данного исследования закономерности дополняют имеющиеся данные и могут учитываться при анализе полногеномного секвенирования, а также при диагностике близкородственных видов. Например, с использованием праймеров, обеспечивающих амплификацию генов *alkB5*, достаточно быстро можно отличить *R. qingshengii* от близкородственного вида *R. erythropolis* (Ратникова, Титок, 2020). Весьма показательным может быть пример бактерий с неустановленным видовым статусом. Например, в хромосомах охарактеризованных штаммов *Rhodococcus* sp. Q15 и *R. erythropolis* NRRL B-16531 выявлено 4 гена, кодирующих алкан-1-монооксигеназы (Whyte et al., 2002). Проведенный анализ генов *alkB* этих бактерий показал, что они содержат ген *alkB5* и, следовательно, могут быть отнесены к виду *R. qingshengii*. Наличие детерминанты *alkB5* в геноме штаммов с неустановленной видовой принадлежностью позволяет уточнить их таксономический статус (Ратникова, Титок, 2020). При этом, необходимо учитывать, что природные бактерии даже одного вида, несмотря на присутствие в их геномах систем, обеспечивающих генетическую стабильность, могут достаточно быстро изменяться за счет мутационного процесса и горизонтального переноса генов, что вызывает сложности не только в систематике, но и при проведении генетического анализа. Тем не менее, наличие особенностей в организации генов *alkB* в зависимости от таксономического статуса может лежать в основе понимания становления геномов этой практически значимой группы микроорганизмов, а наличие сходства белков, кодируемых данными генетическими детерминантами, позволит целенаправленно изучать их роль в метаболизме бактерий.

Гены, кодирующие алкан-1-монооксигеназы у природных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap. Анализ генома исследуемых бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap показал, что в хромосоме этих микроорганизмов

локализовано два *alkB*-гена, один из которых имел организацию, сходную с детерминантами *alkB2*-типа бактерий филогенетических групп группы А, представленной патогенами животных *R. hoagii*/*R. equi*, бактерий деструкторов группы В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) и D (*R. erythropolis* и *R. qingshengii*). Данные гены кодировали белки с одинаковыми аминокислотными последовательностями в области функциональных доменов. Однако N- и C-концевые участки данных белков содержали разные по составу и количеству аминокислотные последовательности. Достаточно большое количество несинонимических отличий, приводящих к консервативным заменам, приходилось на участки, расположенные между функционально значимыми доменами (обозначены на рис. 4 двумя точками) (рис. 4).

Вторая отдельно локализованная детерминанта *alkB6* определяла синтез белка, который отличался не только от удаленных в филогенетическом отношении белков AlkB3, AlkB4, AlkB5, AlkB7 и AlkB8, но и от филогенетически близкого белка, кодируемого геном *alkB6* бактерий группы В1. Кроме консервативных несинонимических замен в N-, C-концевых и междоменных участках данных белков, одиночные аминокислотные замены выявлялись в белке AlkB8 бактерий *R. fascians* в области всех функциональных доменов кроме Hist3 (рис. 5). Приведенные данные согласуются с результатами филогенетического анализа (рис. 2, 3).

Роль генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназы, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Перед проведением функционального анализа генов *alkB* был осуществлен поиск генетических детерминант, способных определять синтез биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. В результате в хромосоме данных микроорганизмов выявлены детерминанты, способные определять синтез трегалозы (наиболее часто входит в состав гликолипидов). Данный дисахарид образуется в результате превращения молекул глюкозы во фруктозу с последующим расщеплением на триозы, которые в ходе основного (определяется продуктами генов *ostA* и *ostB*) и альтернативного (определяется продуктами генов *treY* и *treZ*) путей превращаются в трегалозу. При этом глюкоза, являющаяся исходным субстратом для образования трегалозы, образуется в ходе глюконеогенеза. В ходе двух первых необратимых реакций глюконеогенеза (всего включает 10 реакций, 3 из которых необратимы) пируват превращается оксалоацетат, который под действием фосфоенолпируват киназы (фосфоенолпируват синтазы) превращается фосфоенолпируват. Данные реакции являются ключевыми в глюконеогенезе. Фосфоенолпируват киназа кодируется геном *ppsA*. В геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap ген *ppsA* представлен тремя копиями (*ppsA1*, *ppsA2* и *ppsA3* с координатами 1629179–1631701, 2838142–2840427 и 3924850–

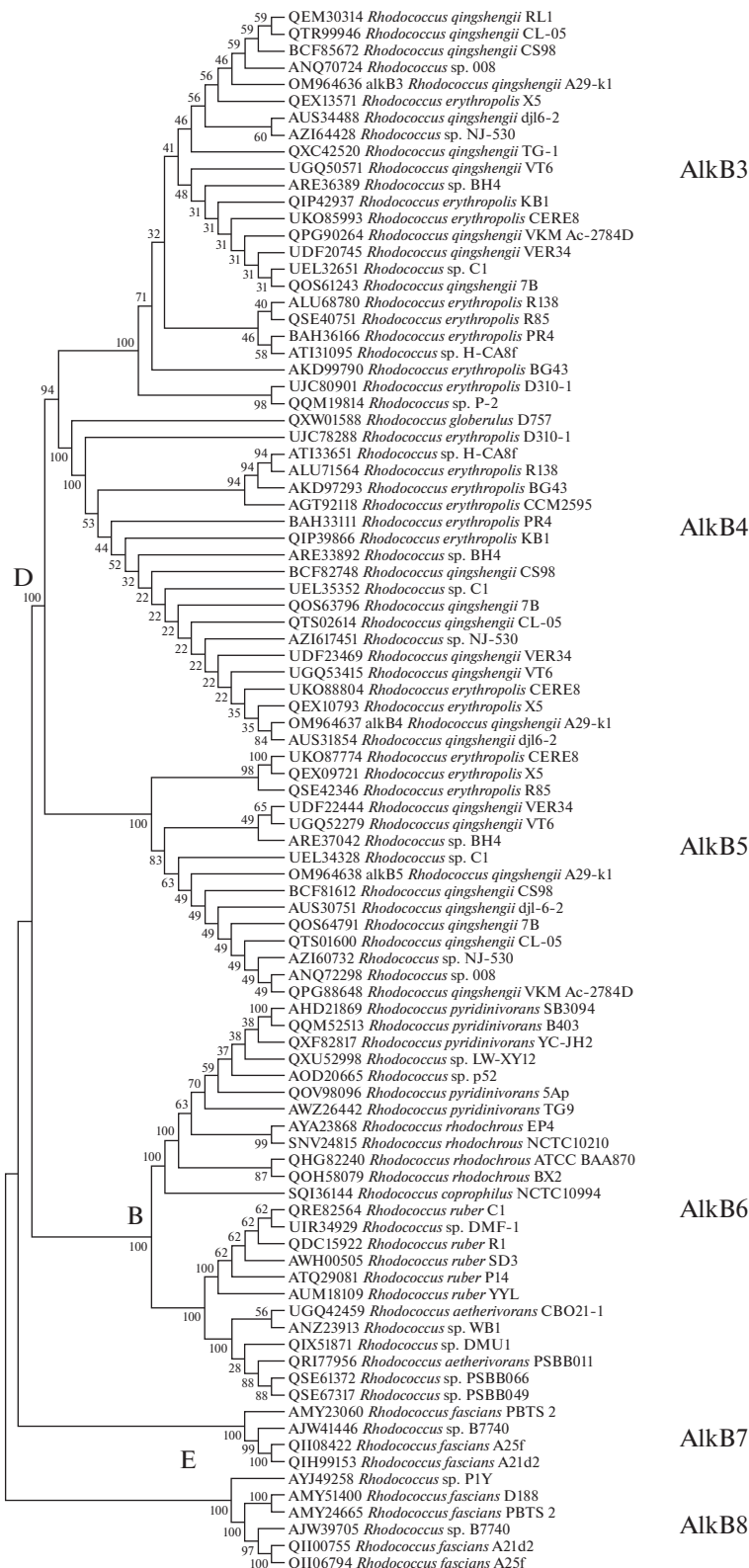


Рис. 3. Филогенетическое дерево алкан-1-монооксигеназ, детерминированных генами *alkB3*–*alkB8* бактерий рода *Rhodococcus*.

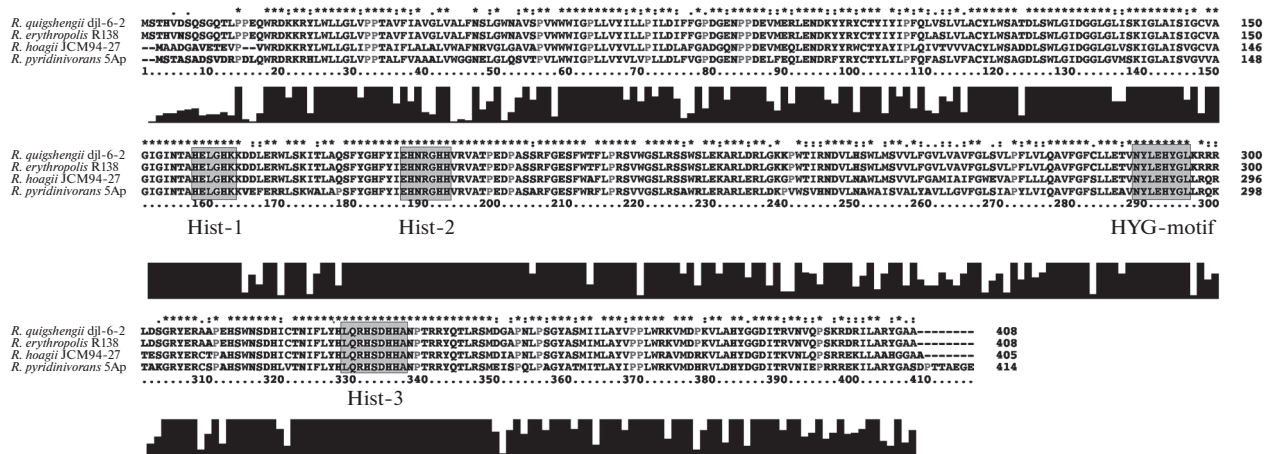


Рис. 4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ, детерминруемых генами *alkB2* бактерий филогенетических групп А, В2 и D.

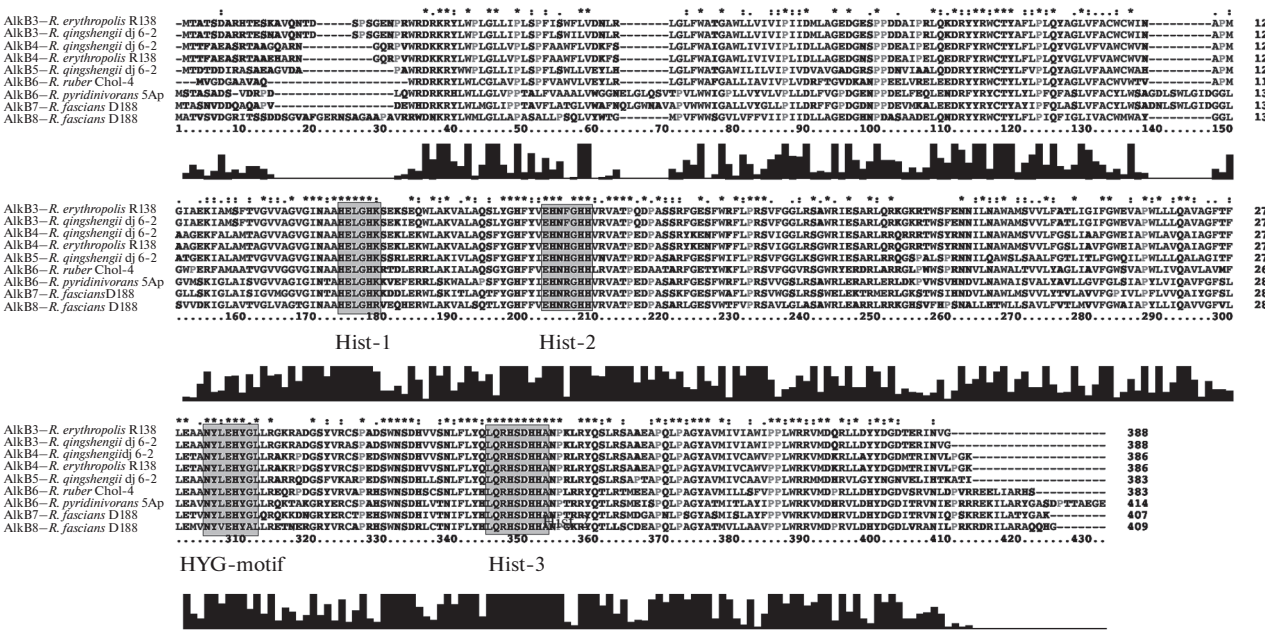


Рис. 5. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ бактерий *R. qingshengii* и *R. erythropolis*, кодируемых генами *alkB3–alkB5*; бактерий *R. pyridinivorans* и *R. ruber*, кодируемых генами *alkB6*; бактерий *R. fascians*, кодируемых генами *alkB7–alkB8*.

3925956 соответственно). Присутствие трех копий детерминант *ppsA* может свидетельствовать о важности процесса глюконеогенеза для данных микроорганизмов, поскольку образующаяся *de novo* глюкоза используется, в частности, для синтеза трегалозы, играющей важную роль в клеточном метаболизме, в том числе, для синтеза гликолипидов (Inaba et al., 2013).

Как указывалось ранее, ключевой путь синтеза трегалозы *de novo* происходит с участием трегалозо-6-фосфат синтазы (продукт гена *otsA*) и трегалозо-6-фосфат фосфатазы (продукт гена *ostB*). В

хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap локализовано две копии гена *otsA* (с координатами 637 208–638 719 и 3936 036–3937 479 соответственно) и две копии *ostB* (с координатами 509 155–511 689 и 2588 284–2589 099 соответственно). В то же время гены *treY* (координаты 2929 869–2932 262) и *treZ* (координаты гена 2935 639–2937 414), определяющие альтернативный путь синтеза трегалозы, являются уникальными.

Отличительной особенностью всех актинобактерий является присутствие в составе клеточной стенки миколовых кислот (квалификацион-

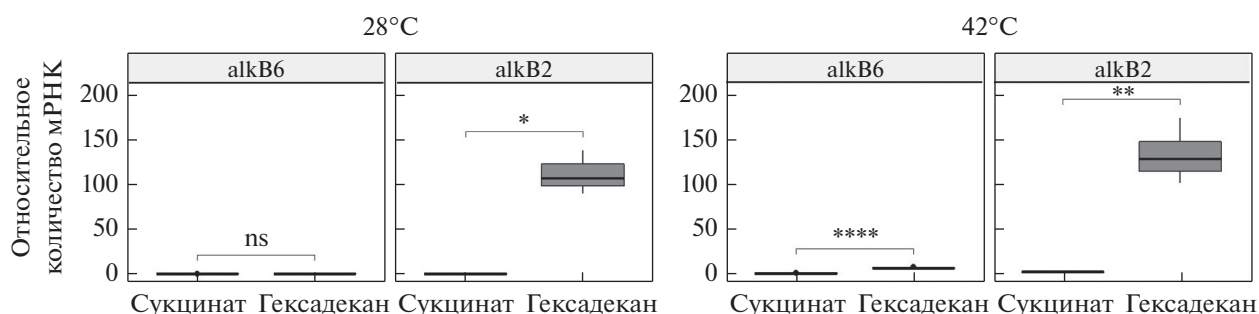


Рис. 6. Относительное количество мРНК, кодируемой генами *alkB2* и *alkB6* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода сукцинат натрия или гексадекан. Обозначения: ns – $P > 0.05$; * – $P \leq 0.1$; ** – $P \leq 0.01$; **** – $P \leq 0.0001$.

ный признак). Для синтеза этих соединений ключевую роль играют гены *fadD32*, *pks13* и *accD4*, входящие у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в состав одного оперона.

Следует отметить, что всем вышеуказанным генетическим детерминантам (*ppsA*, *ostA*, *ostB*, *treY*, *treZ*, *fadD32*, *pks13* и *accD4*) отводится важная роль в способности бактерий *R. erythropolis* синтезировать гликолипиды (Retamal-Morales et al., 2018). Присутствие гомологичных генов в хромосоме *R. pyridinivorans* 5Ap может свидетельствовать об их способности синтезировать биоПАВ данного химического состава.

Установлено, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, растущие с одинаковой эффективностью при 28 и 42°C, синтезировали биоПАВ с высокой эмульгирующей активностью вне зависимости от температуры культивирования (индекс эмульгирования составлял более 50%). При этом содержание трегалозы в составе биоПАВ не превышало 300 мг/л, что более чем в 100 раз меньше известных продуцентов трегалолипидов (до 40 г/л) (Uchida et al., 1989). Полученные данные свидетельствовали в пользу того, что эмульгирующая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap определялась не только продукцией гликолипидов (Uzoigwe et al., 2015).

Предварительно проведенный анализ экспрессии генов *alkB2* и *alkB6* бактерий дикого типа при выращивании в минимальной солевой среде показал, что транскрипция гена *alkB2* индуцировалась в присутствии гексадекана. При этом эффективность транскрипции данного гена не менялась при разных температурных режимах (28 и 42°C). В то же время ген *alkB6* с низкой эффективностью экспрессировался при температуре 28°C, но его транскрипция достоверно возрастала в присутствии гексадекана при температуре 42°C (рис. 6). Полученные данные обосновали определение эффективности синтеза биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap при разных температурных режимах.

Для установления роли алкан-1-монооксигеназ в синтезе биоПАВ были получены мутанты бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap с нарушенными генами *alkB2* и *alkB6*. Для этого фрагменты данных генов были клонированы в состав суицидального вектора pK18mob, который вносили в клетки исследуемых бактерий путем конъюгации. В качестве селективного маркера использовали канамицин, устойчивость к которому обеспечивалась плазмидой pK18mob, в качестве контрселективного – рифампицин, устойчивость к которому была получена для штамма *R. pyridinivorans* 5Ap. Встраивание плазмиды в состав исследуемых генов, обеспечивающее их инактивацию, подтверждали полимеразной цепной реакцией (использовали праймеры, отжигающиеся на плазмиде и на хромосоме вне области инсерции). Для отобранных мутантов определяли эмульгирующую активность и количество продуцируемых гликолипидов (количество трегалозы в сыром сурфактанте). Следует отметить, что в минимальной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода гексадекан, у мутанта с нарушенным геном *alkB2* количество жизнеспособных клеток не увеличивалось, но не становилось меньше (через 96 ч культивирования число жизнеспособных клеток соответствовало количеству внесенных бактерий в среду культивирования). Это свидетельствовало о том, что данная детерминанта является ключевой, но не единственной, обеспечивающей способность утилизировать гексадекан. В то же время в минимальной среде с гексадеканом рост мутанта с инактивированным геном *alkB6* практически не отличался от исходного штамма. В связи с неспособностью мутанта с нарушенным геном *alkB2* расти в минимальной среде с гексадеканом, для последующего анализа бактерии культивировали в полноценной среде с добавлением гексадекана в качестве индуктора. В этих условиях все исследуемые бактерии росли с одинаковой эффективностью. В результате было установлено, что относительно исходного штамма у мутанта с нарушенным геном *alkB2* эмульгирующая активность снижа-

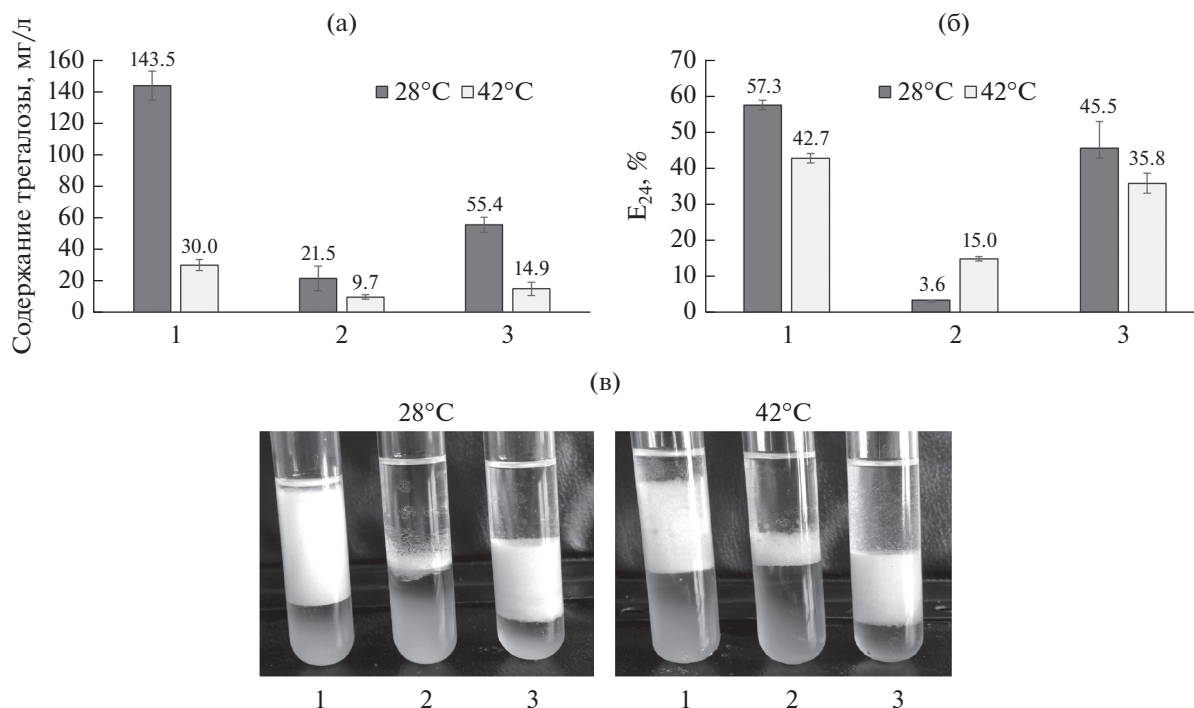


Рис. 7. Эффективность синтеза биоПАВ при разных температурах через 72 ч культивирования в полноценной среде с гексадеканом бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap: 1 – исходный рифампицинрезистентный штамм; 2 – мутант с инактивированным геном *alkB2*; 3 – мутант с инактивированным геном *alkB6*. (а) – Содержание трегалозы в сыром сурфактанте; (б) – индекс эмульгирования; (в) – эмульгирующая активность. Конечная концентрация жизнеспособных клеток для исходного штамма составила 1.5×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 2.8×10^6 КОЕ/мл; мутанта с инактивированным геном *alkB2* – 1.8×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 1.7×10^6 КОЕ/мл; мутанта с инактивированным геном *alkB6* – 2.2×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 2.1×10^6 КОЕ/мл.

лась в 16 и 3 раза соответственно после культивирования при 28 и 42°C. Такую же закономерность регистрировали и для биоПАВ, содержащих трегалозу (количество уменьшалось соответственно в 7 и 3 раза после культивирования при 28 и 42°C). Для мутанта с нарушенным геном *alkB6* регистрировали снижение эмульгирующей активности и синтеза трегалолипидов (трегалозы) соответственно в 1.2 и более чем в 2 раза вне зависимости от температуры культивирования (рис. 7). Полученные результаты свидетельствовали о роли обоих исследованных детерминант в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. При этом ген *alkB2* играл ключевую роль, но его инактивация не являлась летальной, и отсутствие его активности в большей степени компенсировалось при повышенной температуре увеличенной экспрессией гена *alkB6*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований

(НИР № 3.6.2), грантов Министерства образования (НИР № 752/57 и НИР № 757/57).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ратникова М.С., Титок М.А. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации бактерий *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus qingshengii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 444–452.

Ratnikova M.S., Titok M.A. Molecular genetic markers for identification of *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus qingshengii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 435–442.

- Beilen J.B. van, Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 13–21.
- Beilen J.B. van, Neuenschwander M., Smits T.H.M., Roth C., Balada S.B., Witholt B. Rubredoxins involved in alkane oxidation // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1722–1732.
- Ceniceros A., Dijkhuizen L., Petrusma M., Medema M.H. Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus* // *BMC Genomics.* 2017. V. 18. P. 593.
- Chénier M.R., Beaumier D., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R., Greer C.W. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 5170–5177.
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. P. 224–229.
- DuBois Michel, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. P. 350–356.
- Eras-Muñoz E., Farré A., Sánchez A., Font X., Gea T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications // *Bioengineered.* 2022. V. 13. P. 12365–12391.
- Geize R. van der, Hessels G.I., Gerwen R. van, Meijden P. van der, Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kdD*, encoding 3-ketosteroid Delta1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 205. P. 197–202.
- Gürtler V., Mayall B.C., Seviour R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. V. 28. P. 377–403.
- Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 7082–7090.
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // *Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 28. P. 1037–1051.
- Kügler J.H., Le Roes-Hill M., Syltatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 212.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 291–313.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Baeva T.A., Kochina O.A., Gein S.V., Chereshnev V.A. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities // *Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 559–568.
- 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 // *J. Microbiol. Methods.* 2001. V. 46. P. 149–156.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. P. 282–290.
- 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. V. 9. P. e105506.
- Luong T.M., Ponamareva O.N., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Delean Ya.A., Surin A.K., Linklater D., Filonov A.E. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. P. 20.
- Majidzadeh M., Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018. V. 37. P. 2045–2062.
- Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // *Environ. Int.* 2009. V. 35. P. 162–177.
- Metcalfe W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // *Gene.* 1994. V. 138. P. 1–7.
- Mutalik S.R., Vaidya B.K., Joshi R.M., Desai K.M., Nene S.N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574 // *Bioreour. Technol.* 2008. V. 99. P. 7875–7880.
- Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4968.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. e45.
- Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko I.A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 651–658.
- Retamal-Morales G., Heine T., Tischler J.S., Erler B., Gröning J.A.D., Kaschabek S.R., Schlömann M., Levicán G., Tischler D. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* B7g, a biosurfactant producing actinobacterium // *J. Biotechnol.* 2018. V. 280. P. 38–41.
- Riele H. te, Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2477–2490.
- Rosa C.F.C. da, Freire D.M.G., Ferraz H.C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil // *J. Environ. Chem. Engineer.* 2015. V. 3. P. 89–94.
- 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 // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 38392.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // *Gene.* 1994. V. 145. P. 69–73.
- Schirmer A., Rude M.A., Li X., Popova E., Cardayre S.B. del Microbial biosynthesis of alkanes // *Science.* 2010. V. 329. P. 559–562.

Shanklin J., Whittle E., Fox B.G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 12787–12794.

Smits T.H., Röthlisberger M., Witholt B., Beilen J.B. van Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains // *Environ. Microbiol.* 1999. V. 1. P. 307–317.

Táncsics A., Benedek T., Szoboszlai S., Veres P.G., Farkas M., Máthé I., Márialigeti K., Kukolya J., Lányi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. P. 1–7.

Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes // *Agric. Biol. Chem.* 1989. V. 53. P. 757–763.

Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J., Rahman P.K.S.M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 245.

Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5933–5942.

Williams S.C., Austin R.N. An overview of the electron transfer proteins that activate alkane monooxygenase (AlkB) // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 845551.

Wood E.J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Eds. Fritsch E.F., Sambrook J. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p. ISBN 0-87969-136-0 // *Biochemical Education*. 1983. V. 11. № 2. P. 82–82.

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Genes Encoding Alkane 1-Monooxygenase Synthesis in Members of the Genus *Rhodococcus*

A. A. Bulyarevich¹, A. S. Gurinovich¹, A. E. Filonov², and M. A. Titok^{1, *}

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Received October 17, 2022; revised November 22, 2022; accepted November 23, 2022

Abstract—Organization and localization of the *alkB* genes and of alkane 1-monooxygenases they encode in members of the genus *Rhodococcus* was investigated. All members of a phylogenetic group were found to possess specific types of the *alkB* genes (*alkB1*-type in the operons containing rubredoxin-coding genes, rubredoxin reductase, and a regulatory protein and/or *alkB2*-type in the operons lacking the rubredoxin-reductase-coding gene, and supplementary, separately located determinants of the *alkB3–alkB8* type). The *alkB1*-type genes were present in the chromosomes of bacteria of groups B1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), C (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*), D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), G (*R. triatomae*), and E (*R. fascians*). The *alkB2*-type genes occurred in strictly specified loci of the chromosomes of members of the phylogenetic groups A (*R. hoagii/R. equi*), B2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*), and D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). The separately located *alkB3–alkB5* were revealed in the chromosomes of members of the D group D (*alkB5* was found only in *R. qingshengii*), the *alkB6* genes occurred in members of the groups B1 and B2, and *alkB7–alkB8* were present in members of group E. The proteins coded by the genes *alkB1* and *alkB2* belonged to three phylogenetic groups. The first one comprised AlkB1-type proteins of members of groups B1 and C and the AlkB2-type proteins of members of groups D and A. The second one was represented by AlkB2-type proteins of bacteria of group B2. The third group comprised AlkB1-type proteins of members of groups G and D. Alkane 1-monooxygenases encoded by separately localized genes *alkB3–alkB8* were represented by three phylogenetic lineages: AlkB3–AlkB5, AlkB6, and AlkB7 and AlkB8. In the genome of *R. pyridinivorans* 5Ap, the genes *alkB2* and *alkB6* characteristic of group B1 were revealed. This determinants were shown to be required for biosurfactant synthesis. Emulsifying activity of the mutant with impaired *alkB2* gene at 28 and 42°C was 16 and 3 times lower, respectively, while the amount of trehalose-containing surfactants decreased 7 and 3 times, respectively. Independent on the cultivation temperature, the mutant with impaired *alkB6* gene exhibited 1.2 times lower emulsifying activity and more than two-fold lower decrease of the synthesis of trehalose-containing surfactants. These results indicated the key role of *alkB2* in biosurfactant synthesis at different cultivation temperatures. The role of *alkB6* increased at 42°C, probably due to its elevated transcriptional activity.

Keywords: *alkB* genes, alkane 1-monooxygenases, biosurfactants