

## ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ДЕГРАДАЦИЮ УГЛЕВОДОРОДОВ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5Ar

© 2019 г. А. А. Букляревич<sup>а</sup>, \*, М. И. Чернявская<sup>а</sup>,  
А. Э. Охремчук<sup>б</sup>, Л. Н. Валентович<sup>б</sup>, М. А. Титок<sup>а</sup>

<sup>а</sup>НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии, биологический факультет,  
Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Республика Беларусь

<sup>б</sup>Лаборатория “Центр аналитических и генно-инженерных исследований”,  
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

\*e-mail: bukliarevich@bsu.by

Поступила в редакцию 25.01.2019 г.

После доработки 17.04.2019 г.

Принята к публикации 29.04.2019 г.

Изучали роль белков теплового шока в реализации способности бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar деградировать углеводороды при разных температурных режимах. В результате проведенных исследований установлено, что для деградации бактериями гексадекана при температуре 42°C необходимо присутствие шаперонов *Cpn60.1–Cpn10* и регуляторного белка *Hgc*. В отсутствие функциональной активности генетических детерминант, определяющих синтез этих белков, эффективность деградации гексадекана снижалась в 1.7 и 2.7 раза соответственно. Мутации в генах *cpn* и *hrcA* не влияли на жизнеспособность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar: исходный штамм и мутанты росли с одинаковой скоростью при всех температурных режимах в минимальной среде с сульфатом натрия и в полноценной среде. В отсутствие белков теплового шока *Cpn60.1–Cpn10* фиксировали снижение скорости роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar при 42°C на минимальных агаризованных средах, содержащих в качестве источников углерода керосин, дизельное топливо, ацетон, нафталин, 2-метилнафталин и фенантрен.

**Ключевые слова:** бактерии-деструкторы, *Rhodococcus*, гены *cpn* и *hrc*, *Hgc*-репрессор, гексадекан

DOI: 10.1134/S0026365619050021

Способность бактерий существовать в стрессовых условиях обеспечивается целым рядом генетически детерминированных процессов. Ключевыми из них являются деградация органических и неорганических соединений, активный транспорт токсических веществ из клетки, стабилизация мембраны и клеточной стенки, восстановление нарушенной конформации внутриклеточных белков молекулярными шаперонами, активация отдельных процессов метаболизма специфическими сигма-факторами (Nicolaou et al., 2010). Для реализации стрессового ответа определенным интерес представляют белки теплового шока GroELS. Гены, детерминирующие их синтез, присутствуют в геномах всех живых организмов и активно экспрессируются в клетке в ответ на изменения, вызванные неоптимальными температурами, концентрацией ионов водорода и солей, облучением, ксенобиотиками, а также другими факторами, влияющими на ее физиологический статус (Lin et al., 2008). Кроме того, в норме шапероны обес-

печивают конформационные изменения полипептидов, необходимые для их функциональной активности (Fuguu et al., 2013).

Следует отметить, что практически все актинобактерии, к которым относятся родококки, содержат две копии генов теплового шока *groEL* (общепринятое обозначение – *cpn60.1* и *cpn60.2*) и одну копию *groES* (общепринятое обозначение – *cpn10*). Эти детерминанты характеризуются определенной генетической организацией и локализацией в геноме. Гены *cpn60.1* и *cpn10* образуют оперон, а вторая детерминанта *cpn60.2* представлена отдельной транскрипционной единицей, которая всегда находится в другом участке хромосомы (Goyal et al., 2006). Регуляция экспрессии белков теплового шока *cpn* изучена только для отдельных представителей актинобактерий родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Streptomyces*. Установлено, что транскрипция оперона, включающего гены *cpn60.1* и *cpn10*, и отдельно локализованного гена *cpn60.2*, негативно регулируется белком *HgcA* за счет связы-

вания с инвертированными повторами CIRCE (TTGGCACTC-9N-GAGTGGCCCAG) в области “-10” и “-35”, а также старта транскрипции *срп*-оперона и гена *срп60.2* (Grandvalet et al., 1998; Stewart et al., 2002; Barreiro et al., 2004). Этот белок-репрессор подавляет транскрипцию *срп*-генов при оптимальной температуре и не обладает этим свойством при накоплении в клетке денатурированных белков, появляющихся в результате стрессового воздействия. Показано, что этот процесс зависит от концентрации и конформации белков-шаперонов *Срп60.1* и *Срп10*, которые активируют репрессор *НгсА* при оптимальных физиологических условиях (Roncarati, Scarlato, 2017).

Наибольший интерес представляет наличие в клетках актинобактерий двух *Срп*-белков, отличающихся аминокислотным составом, что может свидетельствовать об их разной функциональной активности и, следовательно, той роли, которую они выполняют в клетке (Lund, 2009). В настоящее время имеются лишь отдельные данные, свидетельствующие о функциональной значимости этих полипептидов. В частности, для бактерии *M. tuberculosis* установлено, что инактивация гена *срп60.1* приводит к потере патогенности: у мышей и морских свинок, зараженных мутантными бактериями, легкие остаются неповрежденными (Hu et al., 2008). При мутации этого гена у *M. smegmatis* не образуются миколовые кислоты и, как следствие, не формируются биопленки (Ojha et al., 2005). Еще меньше известно о функциональной значимости белка, синтез которого определяется отдельно локализованной детерминантой *срп60.2*. Имеются лишь косвенные доказательства жизненно важной функции этого полипептида для актинобактерий. Так, некоторые актинобактерии содержат только одну копию гена *срп60*, которая представлена детерминантой *срп60.2*, отличительной особенностью которой является обособленная локализация в хромосоме (отдельно от гена *срп10*), тогда как у других бактерий единственная копия *срп60* образует единую транскрипционную единицу с геном *срп10* (Lund, 2009). Для представителей актинобактерий не удалось получить мутантов по гену *срп60.2*, тогда как спонтанные и индуцированные мутации в гене *срп60.1* были выявлены для всех изученных в этом отношении бактерий (Barreiro et al., 2004; Ojha et al., 2005; Hu et al., 2008).

Переходя к объектам настоящего исследования, отметим, что бактерии рода *Rhodococcus* в природной среде обитания обнаруживаются в загрязненных экосистемах, мало пригодных для жизнедеятельности других живых организмов (высокая концентрация ксенобиотиков, экстремальные температура и влажность, кислая или щелочная среда, высокие радиация и осмолярность и др.). Такие неограниченные адаптивные возможности, безусловно, определяются особенно-

стями генетической организации этих микроорганизмов, которые обеспечивают им толерантность к воздействию стрессовых факторов внешней среды. Для бактерий рода *Rhodococcus* достаточно подробно охарактеризованы отдельные генетические системы биодegradации загрязнителей, тогда как другие детерминанты толерантности практически не исследованы (Crombie et al., 2015; Orro et al., 2015; Khosravinia et al., 2018).

Ранее из образца загрязненной нефтепродуктами почвы были изолированы бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, растущие в диапазоне температур от 18 до 45°C, в среде со значением pH от 6 до 11, в присутствии NaCl в концентрации до 7%. Эти бактерии способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии широкий спектр органических соединений (Чернявская и соавт., 2018) и достаточно эффективно утилизировать нефть в песчаной почве с низкой влажностью (порядка 10%) в присутствии 3% NaCl при температуре 45°C (Патент РФ № 2617941, 2017). Перечисленные свойства свидетельствуют о высокой адаптивной способности этих микроорганизмов и возможности их использования для биоремедиации загрязненной среды от опасных органических соединений. Наличие полной нуклеотидной последовательности генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap (Чернявская и соавт., 2016) позволяет в полной мере оценить их метаболический потенциал, изучить организацию отдельных генетических детерминант и определить их функциональную значимость.

Целью данного исследования было изучить роль белков теплового шока бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap для реализации ее способности деградировать углеводороды при разных температурных режимах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектом исследования** являлся штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г), также штамм *E. coli* BW19851 (Metcalf et al., 1994), *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) и плазмиды pK18mob (Schäfer et al., 1994).

Бактерии культивировали при температуре 28 и 42°C в полноценной пептонно-дрожжевой среде, минимальной среде M9 (Миллер, 1976) и среде К (Каталог штаммов..., 1994) с добавлением раствора микроэлементов по Постгейту (Романенко, Кузнецов, 1974). В качестве источников углерода использовали сукцинат натрия (0.2%), ацетон, гексан, нонан, бензол, этилбензол, толуол, *o*-ксилол, гексадекан, нафталин, метилнафталин (в парах), фенантрен, пирен, флюорен, бифе-

нил (0.02% растворы в трихлорметане), фенол и 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан (0.1%).

В работе использовали коммерческие препараты канамицина в концентрации от 50 до 2000 мкг/мл, рифампицина в концентрации 100 мкг/мл, IPTG – 0.5 ммоль/л, X-Gal – 50 мкг/мл.

**Выделение ДНК.** Тотальную ДНК выделяли саркозиловым методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (“Thermo Scientific”, ЕС).

**Аmplификация.** Для амплификации использовали HF-Taq ДНК-полимеразу (“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, 1.25 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагмента оперона *cpn60.1–cpn10* размером 1000 п.н. использовали праймеры groF (5'-AGG AAG CCC TTG TCG AAC TG-3') и groR (5'-AAA GTG GAG GGC TCA TCG TG-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 54°C – 40 с, 68°C – 1 мин (5 циклов); 95°C – 30 с, 54°C – 40 с, 68°C – 1 мин (25 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации гена *cpn60.2* размером 1625 п.н. использовали праймеры groEL2F (5'-GAA TTC AAG GAG GAC ATT ATG GCC AAG ATC ATC GCG TTC G-3') и groEL2R (5'-GTC GAC TCA GAA GTC CAT GCC GCC CAT G-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 58°C – 45 с, 68°C – 1 мин 40 с (25 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *hrcA* размером 733 п.н. использовали праймеры hrcF (5'-TTA CGT GTC CAC CAA GGA GC-3') и hrcR (5'-TTC GAG GAC CGT ACG CAA C-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 58°C – 45 с, 68°C – 1 мин (25 циклов); 68°C – 20 мин (1 цикл).

Полученные фрагменты очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit (“Jena Bioscience”, Германия). Очищенные продукты амплификации фрагмента оперона *cpn60.1–cpn10* и фрагмента гена *hrcA* лигировали с суицидальным вектором рK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *SmaI*. Продукты амплификации гена *cpn60.2* обрабатывали рестриктазой *PstI*, полученный фрагмент размером 415 п.н. очищали из агарозного геля и лигировали с вектором рK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *PstI*.

Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методу, приведенному в работе (Маиатис, 1984).

Плазмиды рK18mob с клонированными фрагментами генов *cpn60.1–cpn10*, *cpn60.2* и *hrcA* в клетки *R. pyridinivorans* 5Ap вводили методом конъюгации, описанным в работе (van der Geize et al., 2001). Интеграцию гибридных плазмид в хромосому бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. Для этого использовали праймеры, комплементарные последовательностям, прилегающим к полилинкеру плазмиды рK18mob (M13F и M13R), а также последовательностям инактивируемых генов (*hrcF*, *hrcR* и *groELSR*). Встраивание плазмиды рK18mob:*hrcA* в хромосомный ген *hrcA* определяли с использованием праймеров *hrcF* (5'-TTA CGT GTC CAC CAA GGA GC-3') и M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), M13F (5'-ACT GGC CGT CGT TTT ACA-3') и *hrcR* (5'-TTC GAG GAC CGT ACG CAA C-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 48°C – 30 с, 68°C – 45 с (25 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл). В результате реакции ПЦР получены продукты амплификации искомого размера (778 п.н.). Доказательство инактивации оперона *cpn60.1–cpn10* за счет встраивания плазмиды рK18mob, содержащей фрагмент данных детерминант, получено с использованием праймеров M13F (5'-ACT GGC CGT CGT TTT ACA-3') и *groELSR* (5'-CCG GAA TTC TCA GTG CGC GTG ACC GTG-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 48°C – 45 с, 72°C – 2 мин (25 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл). В результате реакции ПЦР получен продукт амплификации искомого размера (2076 п.н.). Мутантные бактерии, содержащие в хромосоме плазмиду рK18mob, были устойчивы к канамицину в концентрации 8000 мкг/мл (исходные бактерии не росли в присутствии канамицина в концентрации 5 мкг/мл). В аналогичных экспериментах при введении исходной плазмиды рK18mob и рK18mob, содержащей фрагмент гена *cpn60.2*, в клетки бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap трансконъюганты получены не были (эксперименты повторяли три раза).

**Удельную скорость роста бактерий ( $\mu$ )** в минимальной среде К, содержащей в качестве источника углерода сукцинат, и в полноценной питательной среде оценивали, используя значения количества жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), которые определяли методом посева на агаризованную среду аликвот культур на начальной стадии инкубации и, затем, через определенные промежутки времени (Герхардт, 1983).

**Эффективность деградации гексадекана** определяли с помощью газовой хроматографии на аппарате “Agilent 7890B” (США) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Agilent HP-5 (30 м × 0.32 мм, внутренний диаметр 0.25 мкм, газ-носитель – гелий, скорость потока – 1.2 мл/мин). Температура испарителя – 250°C, объем инъекции – 1 мкл. Начальная температура

колонки — 130°C, конечная температура колонки — 220°C, температурный градиент — 3.5°C/мин. В качестве внешнего стандарта использовали гексадекан. Полученные результаты анализировали с использованием программного обеспечения Agilent ChemStation B.04.03. Экстракцию гексадекана из культуральной жидкости осуществляли эквивалентным объемом гексана.

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Нуклеотидные последовательности генов *cpn60.1*–*cpn10*, *cpn60.2* и *hcrA* в составе генома *R. pyridinivorans* 5Ap (последовательности генома размещены на сайте [www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus\\_genome.html](http://www.bio.bsu.by/microbio/rhodococcus_genome.html)) анализировали с помощью программы BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности генов *cpn60.1*, *cpn10*, *cpn60.2* *R. pyridinivorans* 5Ap депонированы в базе данных GenBank под номерами MG264513–MG264515.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие полной нуклеотидной последовательности хромосомы бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap позволила сравнить гены *cpn60* и *cpn10* с известными. В результате проведенного анализа было установлено, что полные нуклеотидные последовательности генов *cpn60.1* и *cpn10*, входящие в состав одного оперона (координаты оперона 3555670–3557670 п.н.), идентичны на 99% с такими бактериями *R. pyridinivorans*, одного штамма *R. rhodochrous* NCNC10210 и одного штамма *R. biphenylivorans* TG9. При этом у бактерий *R. pyridinivorans* белки, детерминированные геном *cpn60.1*, сходны между собой и с белками бактерий *R. biphenylivorans* на 100%, а также имеют высокую степень гомологии (99%) с белками бактерий *R. rhodochrous* NCNC10210 (с белками остальных представителей рода *Rhodococcus* сходство не превышало 91%). Из двух генов оперона более консервативной являлась детерминанта *cpn10* (сходна на 99–95% с гомологичными генами бактерий *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*, *R. coprophilus*, *R. aetherivorans*, *R. equi*, *R. ruber*, *R. hoagii*, *R. biphenylivorans*), а детерминированный ею белок по аминокислотной последовательности идентичен на 95% не только с белками бактерий рода *Rhodococcus*, но и представителей родов *Mycobacterium* и *Nocardia*. Следует отметить, что на основании сиквенс-анализа этих детерминант и гена *alkB* исследуемый штамм был идентифицирован до вида (Чернявская и соавт., 2018).

Детерминанта *cpn60.2*, также как у других актиномицетов, в геноме исследуемых бактерий локализована отдельно (координаты 3987457–3989082 п.н.), и ее нуклеотидная последовательность идентична на 99% гомологичным генам бактерий *R. pyridinivorans*, штамма *R. biphenylivorans* TG9 и штамма *R. rhodochrous* NCNC10210 (для других близкородственных видов сходство не превышало 96%).

При этом аминокислотная последовательность белка *Cpn60.2* была идентична на 98–100% различным видам бактерий *Rhodococcus* (*R. pyridinivorans*, *R. biphenylivorans*, *R. rhodochrous*, *R. gordoniae*, *R. zophii*, *R. phenolicus*, *R. coprophilus*).

Сравнительный сиквенс-анализ последовательностей, окружающих *cpn*-оперон в хромосоме бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, позволил установить, что выше по течению локализован геном бактериофага размером около 42 kb. Причем перед генами фагового происхождения находятся детерминанты, кодирующие сайт-специфическую рекомбиназу *XerD* (координаты 3557883–3558916 п.н.) и тирозиновую рекомбиназу *XerC* (координаты 3560261–3561190 п.н.). В геномах других *R. pyridinivorans* в этом локусе профаг отсутствует, а гомологичные гены *xerD* и *xerC* находятся далеко друг от друга и от *cpn*-оперона (в частности, в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 ген, кодирующий *XerD*, локализован между 384229–385140 п.н., координаты гена, кодирующего тирозиновую рекомбиназу *XerC*, соответствуют 233173–234111 п.н.). При этом наличие горячих точек рекомбинации непосредственно перед *cpn*-опероном и мобильным генетическим элементом (профагом) свидетельствуют об особенностях генетической организации исследуемых бактерий. Выявленные функциональные единицы могут обеспечивать рекомбинационную нестабильность локуса, прилегающего к *cpn*-оперону и влиять на его функциональную активность.

Как указывалось ранее, бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap утилизируют нефть в стрессовых условиях среды (в песчаной почве с влажностью 10% в присутствии 3% NaCl при температуре 45°C (Патент РФ № 2617941, 2017). Деградация такого многокомпонентного субстрата при таких экстремальных условиях, безусловно, должна обеспечиваться не только системами деградации, но и способностью бактериальных клеток противостоять стрессовым факторам среды. В частности, она обеспечивается устойчивостью к определенным углеводородам нефти, поскольку клетки одного штамма не способны деградировать все компоненты, входящие в ее состав (около 1000 соединений входят в состав нефти), а также наличием белков-шаперонов, синтез которых увеличивается при стрессе, помогая клеткам адаптироваться к условиям, не соответствующим физиологической норме (высоким температуре и осмолярности, низкой влажности). Одна из систем толерантности, характерная для клеток всех живых организмов, представлена шаперонами *Cpn* (Nicolaou et al., 2010). Для установления роли этих белков в деградации углеводородов, были получены мутации кодирующих их детерминант. Для этого фрагменты оперона *cpn60.1* и *cpn10*, а также гена *cpn60.2* были встроены в состав суицидального вектора pK18mob, который вводили в клетки *R. pyridini-*

*vorans* 5Ap. Неспособность вектора наследоваться клетками исследуемых бактерий обусловила его встраивание в состав хромосомы за счет гомологичной рекомбинации по идентичным нуклеотидным последовательностям оперона *cpn*. В результате были отобраны мутанты с инактивированными генами *cpn60.1* и *cpn10* (обозначены Gго<sup>-</sup>), и не были получены мутанты с дефектным геном *cpn60.2*. Отсутствие рекомбинантов при введении плазмиды pK18mob, содержащей фрагмент гена *cpn60.2*, может свидетельствовать о жизненно важной функции этой детерминанты. Данное предположение подтверждается литературными данными о невозможности инактивации гена *cpn60.2* у бактерий *M. smegmatis* (Kim et al., 2003; Ojha et al., 2005), *M. tuberculosis* (Hu et al., 2008), *Corynebacterium glutamicum* (Barreiro et al., 2004) и *Streptomyces albus* (Servant et al., 1994).

Для определения влияния белков, кодируемых генами *cpn60.1* и *cpn10*, на способность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать керосин, дизельное топливо и отдельные углеводороды в качестве единственных источников энергии, исходный и мутантный штамм выращивали при температурах 28 и 42°C на агаризованной минимальной среде с добавлением этих соединений. В результате было установлено, что все использованные углеводороды как источники энергии можно условно разделить на три группы. Первую группу составили соединения, при добавлении которых в среду исходные и мутантные бактерии не росли. Это гексан, гептаметилнонан, бензол, этилбензол, *o*-ксилол, толуол и пирен. В то же время исходные и мутантные бактерии вне зависимости от температурного фактора одинаково были способны к росту на среде, содержащей в качестве источника углерода октан, фенол, бифенил и флюорен (вторая группа). Достоверная разница между исходными и мутантными бактериями в способности формировать изолированные колонии при разных температурных режимах наблюдалась при добавлении в среду ацетона, гексадекана, нафталина, 2-метилнафталина, фенантрена, керосина и дизельного топлива (табл. 1). Полученные данные свидетельствовали о разном влиянии температуры на способность бактерий утилизировать углеводороды нефти. Определенный интерес представляла третья группа соединений, включающая ацетон, гексадекан, нафталин, 2-метилнафталин, фенантрен, керосин и дизельное топливо. Их утилизация мутантными бактериями достоверно отличалась от утилизации бактериями дикого типа и зависела от температуры культивирования. Отличия в росте мутантных бактерий при повышенной температуре могло свидетельствовать о влиянии белков теплового шока на процессы деградации этих соединений. В пользу этого предположения можно привести экспериментальные данные об участии белков теплового шока в кле-

точном метаболизме грамположительных и грамотрицательных бактерий. В частности, было показано, что у бактерий *Clostridium acetobutylicum*, продуцирующих во внешнюю среду бутанол, ацетон и этанол, при наличии в клетках дополнительных копий генов *cpn60.1* и *cpn10* на 45% возросла выживаемость в среде, содержащей летальную концентрацию *n*-бутанола, и на 29% увеличилась его продукция (Tomas et al., 2003). Повышенная экспрессия гена *cpn60.2* в клетках бактерий *R. erythropolis* PR4 увеличивала их выживаемость и эмульгирующую активность по отношению к *n*-додекану (C<sub>12</sub>) и пристану (C<sub>19</sub>) (Takahara et al., 2014). Растворимость и, как следствие, функциональная активность железосодержащих алкан-монооксигеназ микобактерий (*M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. chubuense*), определяющих деградацию алканов с короткой цепью (C<sub>2</sub>–C<sub>4</sub>), обеспечивалась в клетках гетерологичных хозяев только в присутствии белков теплового шока (Fuguaya et al., 2013; McCarl et al., 2018). При использовании бактерий *E. coli* в качестве продуцентов целого ряда чужеродных белков показано, что синтез и функциональная активность синтезируемых полипептидов бактериального, грибного и животного происхождения возрастала в присутствии дополнительных копий генов *cpn* (Kolaj et al., 2009). Существует мнение, что присутствие дополнительных копий генов, кодирующих белки теплового шока, позволит усовершенствовать генно-инженерные подходы для получения практически важных полипептидов в гетерологичных системах экспрессии (Kolaj et al., 2009).

В ходе выполнения настоящей работы методом газовой хроматографии определена эффективность утилизации гексадекана бактериями дикого типа и мутантами с нарушенными детерминантами *cpn60.1*–*cpn10* (обозначены Gго<sup>-</sup>) и *hrcA* (обозначены Hгс<sup>-</sup>). Дополнительное использование штамма с инактивированным геном *hrcA*, детерминирующим негативный регулятор транскрипции *cpn*-генов (Grandvalet et al., 1998; Stewart et al., 2002; Barreiro et al., 2004), обосновано возможностью влияния данного белка-репрессора на синтез Срп-белков и, следовательно, на эффективность деградации гексадекана.

Предварительно было установлено, что в минимальной среде К, содержащей в качестве источника углерода сукцинат, и в полноценной питательной среде все исследуемые бактерии (дикого типа и мутанты с нарушенными генами *cpn60.1*–*cpn10* и *hrcA*) вне зависимости от температуры культивирования (28 и 42°C) характеризовались одинаковой удельной скоростью роста, составляющей 0.17, 0.11, 0.04, 0.013 ч<sup>-1</sup> через 4, 7, 24 и 72 ч соответственно. Полученные данные свидетельствовали об отсутствии влияния структурных и регуляторных белков теплового шока на жизнеспособность

**Таблица 1.** Рост исходных и мутантных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap на агаризованной минимальной минеральной среде с разными источниками углерода

Источник углерода	Температура			
	28°C		42°C	
	Gro <sup>+</sup>	Gro <sup>-</sup>	Gro <sup>+</sup>	Gro <sup>-</sup>
Гексан	+	+	+/-	+/-
Гептаметилнонан	+	+	-	-
Бензол	+	+	-	-
Этилбензол	+	+	-	-
<i>o</i> -Ксилол	+	+	-	-
Толуол	+	+	-	-
Пирен	+	+	-	-
Октан	+	+	+	+
Фенол	+	+	+	+
Бифенил	+	+	+	+
Флюорен	+	+	+	+
Ацетон	+	+	+	+/-
Гексадекан	+	+	+	+/-
Нафталин	+	+	+	+/-
2-Метилнафталин	+	+/-	+	+/-
Фенантрен	+	+	+	+/-
Керосин	+	+	+	+/-
Дизель	+	+	+	+/-
Сукцинат натрия	+	+	+	+

Примечание. “+” – Рост по всему штриху с образованием изолированных колоний; “+/-” – рост по первому штриху без образования изолированных колоний; “-” – отсутствие роста.

клеток бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap. В то же время анализируемые штаммы отличались между собой эффективностью утилизации гексадекана (табл. 2). Штамм дикого типа, временно подвергавшийся температурному воздействию (42°C), и мутант Hrc<sup>-</sup> незначительно, но более эффективно утилизировали гексадекан при 28°C. Такой эффект мог обеспечиваться временным (у штамма дикого типа), либо постоянным (у мутантных вариантов Hrc<sup>-</sup>) увеличением экспрессии генов *cpn* при данном температурном режиме. Подобный эффект наблюдали при анализе мутантов по гену *hrcA* у бактерий *S. albus* (Grandvalet et al., 1998). При этом удельная скорость роста при температуре 28°C была одинаковой для всех исследованных вариантов.

Мутант с нарушенными генами *cpn60.1-cpn10* хуже утилизировал гексадекан при 42°C и, как следствие, характеризовался более низкой удель-

ной скоростью роста. Следует подчеркнуть, что снижение удельной скорости роста связано с источником углерода, а не температурным фактором, поскольку исходный штамм и мутантный вариант одинаково росли при 42°C в полноценной и минимальной среде с сукцинатом и не различались удельной скоростью роста при росте в среде с гексадеканом при 28°C. При 42°C в отсутствие Hrc-репрессора (необходимо подчеркнуть, что при действии стрессовых факторов и в присутствии Hrc-репрессора экспрессия *cpn*-генов не подавляется) присутствие в клетке повышенного количества Cpn-белков не обеспечивало увеличение эффективности деградации гексадекана. Следовательно, для утилизации этого соединения требуются дополнительные белки, синтез которых нарушен при встраивании плазмиды pK18mob в ген *hrc* (ген *hrc* расположен в хромосоме клеток бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap перед геном *dnaJ*, кодирующим шаперон). Для бактерии *Streptomyces albus* показано, что гены *hrc* и *dnaJ* входят в один оперон (Grandvalet et al., 1998), что не исключает влияние белка DnaJ на процессы клеточного метаболизма. Кроме того, в результате транскрипционного анализа установлено, что у бактерии *Listeria monocytogenes* белок Hrc опосредованно позитивно регулирует 35 генов, среди которых, безусловно, наибольший интерес представляют детерминанты, определяющие синтез белков, необходимых для выживания клетки в условиях стресса (Chaturon-gakul et al., 2011).

Таким образом, биodeградация органических соединений в стрессовых условиях среды является сложным процессом и зависит не только от функциональной активности ферментов, определяющих этапы их окисления, но и от функциональной активности других генетических систем. В частности, в результате проведенного исследования было установлено, что белки Cpn60.1 и Cpn10 и их негативный регулятор Hrc играли роль в процессах биodeградации гексадекана бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. При этом мутации генов *cpn60.1-cpn10* и *hrc* не влияли на жизнеспособность исследованных бактерий, поскольку мутанты не отличались от штамма дикого типа скоростью роста в полноценной и минимальной среде с сукцинатом при температурах 28 и 42°C и в среде с гексадеканом при 28°C. В то же время при 42°C относительно штамма дикого типа мутантные варианты в 1.7 и 2.7 раза соответственно, хуже деградировали гексадекан и, как следствие, росли медленнее. При температуре культивирования 28°C штамм дикого типа, подвергнутый кратковременному температурному стрессу, и мутант с нарушенным геном *hrc* лучше деградировали гексадекан (табл. 2). Уменьшение эффективности утилизации гексадекана при 42°C в отсутствие регуляторного белка Hrc могло свидетельствовать о его влиянии на экспрессию не

**Таблица 2.** Удельная скорость роста и эффективность деградации гексадекана исходными и мутантными бактериями при разных температурах

Штамм	Температура			
	28°C		42°C	
	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	эффективность деградации, %	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	эффективность деградации, %
Gro <sup>+</sup>	0.011 ± 0.01	74.3 ± 0.08	0.012 ± 0.01	74.5 ± 0.1
Gro <sup>-</sup>	0.012 ± 0.01	74.3 ± 0.04	0.003 ± 0.01	44.1 ± 0.02
Hrc <sup>-</sup>	0.012 ± 0.01	75.7 ± 0.08	0.005 ± 0.01	27.6 ± 0.5
Gro <sup>+t*</sup>	0.011 ± 0.01	75.7 ± 0.06	—	—

Примечание. Бактерии выращивали 72 ч в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода 1% гексадекана;  $\mu$  – удельная скорость роста, которую определяли по количеству жизнеспособных клеток (КОЕ); эффективность деградации гексадекана определяли на основании результатов газовой хроматографии; \* – бактерии дикого типа в течение 3 ч культивировали при температуре 42°C, после чего выращивали при 28°C. Все приведенные значения являются средними трех независимых экспериментов.

только генов *srp*, но и других детерминант, значимых для протекания процессов деградации. Особый интерес представлял белок *Srp60.2*, поскольку для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, как и для других представителей актиномицетов, он являлся жизненно необходимым. Выявление механизма действия данного белка, а также белков *Srp60.1*, *Srp10* и *HrcA* в деградации гексадекана и других углеводов требует проведения дополнительных исследований. Понимание функциональной роли отдельных механизмов адаптации позволит моделировать процессы биодеградации ксенобиотиков в стрессовых условиях среды (например, на территориях с жарким, холодным или резко континентальным климатом), откроет возможности направленной активации ферментов, определяющих утилизацию органических соединений, а также обеспечит направленное использование шаперонов для оптимизации синтеза биологически активных соединений в клетках геотермофильных хозяев.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б18-070).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Герхардт Ф.* Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. 536 с.
- Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. Ившиной И.Б. М.: Наука, 1994. 163 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Патент РФ № 2617941. 2017.
- Романенко В.И., Кузнецов С.И.* Экология микроорганизмов пресных вод: Лабораторное руководство. М.: Наука, 1974. 194 с.
- Чернявская М.И., Букляревич А.А., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Титок М.А.* Первичный анализ генома бактерий – деструкторов нефти *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Труды Белорусского гос. ун-та. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. 2016. Т. 11. Ч. 1. С. 219–223.
- Чернявская М.И., Букляревич А.А., Делеган Я.А., Охремчук А.Э., Филонов А.Е., Титок М.А.* Биоразнообразие почвенных углеводородоокисляющих бактерий из разных климатических зон // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 581–594.
- Charniauskaya M.I., Bukliarevich A.A., Delegan Ya.A., Akhremchuk A.E., Filonov A.E., Titok M.A.* Biodiversity of hydrocarbon-oxidizing soil bacteria from various climatic zones // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 699–711.
- Barreiro C., González-Lavado E., Pátek M., Martín J.F.* Transcriptional analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: characterization of heat shock-induced promoters // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 4813–4817.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.* XL1-Blue – a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli*

- strain with  $\beta$ -galactosidase selection // *Biotechniques*. 1987. V. 5. P. 376–379.
- 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 sigmaB, sigmaC, sigmaH, and sigmaL in *Listeria monocytogenes* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. № 77. P. 187–200.
- Crombie A.T., Khawand M.E., Rhodius V.A., Fengler K.A., Miller M.C., Whited G.M., McGenity T.J., Murrell J.C. Regulation of plasmid-encoded isoprene metabolism in *Rhodococcus*, a representative of an important link in the global isoprene cycle // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 3314–3329.
- Furuya T., Hayashi M., Semba H., Kino K. The mycobacterial binuclear iron monooxygenases require a specific chaperonin-like protein for functional expression in a heterologous host // *FEBS J.* 2013. V. 280. P. 817–826.
- Goyal K., Qamra R., Mande S.C. Multiple gene duplication and rapid evolution in the *groEL* gene: functional implications // *J. Mol. Evol.* 2006. V. 63. P. 781–787.
- Grandvalet C., Rapoport G., Mazodier P. *hrcA*, encoding the repressor of the *groEL* genes in *Streptomyces albus* G, is associated with a second *dnaJ* gene // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 5129–5134.
- Hu Y., Henderson B., Lund P.A., Tormay P., Ahmed M.T., Gurcha S.S., Besra G.S., Coates A.R. A *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the *groEL* homologue *cpn60.1* is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. P. 1535–1546.
- Khosravinia S., Mahdavi M.A., Gheshlaghi R., Dehghani H. Characterization of truncated *dsz* operon responsible for dibenzothiophene biodesulfurization in *Rhodococcus* sp. FUM94 // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2018. V. 184. P. 885–896.
- Kim A.I., Ghosh P., Aaron M.A., Bibb L.A., Jain S., Hatfull G.F. Mycobacteriophage Bxb1 integrates into the *Mycobacterium smegmatis* *groEL1* gene // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 50. P. 463–473.
- Kolaj O., Spada S., Robin S., Wall J.G. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* [Electronic resource] // *Microbial Cell Factories*. 2009. V. 8. № 9. Mode of access: doi. Date of access: 14.10.2018. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-9>
- Lin Z., Madan D., Rye H.S. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. P. 303–311.
- Lund P.A. Multiple chaperonins in bacteria – why so many? // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 334. P. 785–800.
- Metcalf W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers // *Gene*. 1994. V. 138. P. 1–7.
- McCarl V., Somerville M.V., Ly M.A., Henry R., Liew E.F., Wilson N.L., Holmes A.J., Coleman N.V. Heterologous expression of *Mycobacterium* alkene monooxygenases in gram-positive and gram-negative bacterial hosts [Electronic resource] // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. № 15. Mode of access: doi. Date of access: 14.10.2018. <https://doi.org/10.1128/AEM.00397-18>
- Nicolaou S.A., Gaida S.M., Papoutsakis E.T. A comparative view of metabolic and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation // *Metabolic Engineering*. 2010. V. 12. P. 307–331.
- Ojha A., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W.R., Jr., Hatfull G.F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria // *Cell*. 2005. V. 123. P. 861–873.
- Orro A., Cappelletti M., D’Ursi P., Milanese L., Di Canito A., Zampolli J., Collina E., Decorosi F., Viti C., Fedi S., Presentato A., Zannoni D., Di Gennaro P. Genome and phenotype microarray analyses of *Rhodococcus* sp. BCP1 and *Rhodococcus opacus* R7: genetic determinants and metabolic abilities with environmental relevance [Electronic resource] // *PloS One*. 2015. V. 10. № 10. Mode of access: doi. Date of access: 14.10.2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139467>
- Roncarati D., Scarlato V. Regulation of heat shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. P. 549–574.
- 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.
- Servant P., Thompson C.J., Mazodier P. Post-transcriptional regulation of the *groEL1* gene of *Streptomyces albus* // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 12. P. 423–432.
- Stewart G.R., Wernisch L., Stabler R., Mangan J.A., Hinds J., Laing K.G., Young D.B., Butcher P.D. Dissection of the heatshock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays // *Microbiology (SGM)*. 2002. V. 148. P. 3129–3138.
- Takahara H., Ogihara J., Yoshida T., Okuda S., Nakajima M., Iwabuchi N., Sunairi M. Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression // *Microbes Environ.* 2014. V. 29. P. 346–352.
- te Riele H., 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.
- Tomas C.A., Welker N.E., Papoutsakis E.T. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell’s transcriptional program // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 4951–4965.
- van der Geize R., Hessels G.I., van Gerwen R., van der Meijden P., Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-ketosteroid Delta1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 205. P. 197–202.

## Effect of the Structural and Regulatory Heat Shock Proteins on Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

A. A. Bukliarevich<sup>1</sup>, \*, M. I. Charniauskaya<sup>1</sup>, A. E. Okhremchuk<sup>2</sup>,  
L. N. Valentovich<sup>2</sup>, and M. A. Titok<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnology Research Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus*

<sup>2</sup>*Center of Analytical and Genetic Engineering Research, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, 220141 Belarus*

\*e-mail: bukliarevich@bsu.by

Received January 25, 2019; revised April 17, 2019; accepted April 29, 2019

**Abstract**—The role of heat shock proteins in ability of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap to degrade hydrocarbons at different temperatures was studied. The presence of the Cpn60.1–Cpn10 chaperons and of the Hrc regulatory protein was found to be required for hexadecane degradation at 42°C. When genetic determinants responsible for synthesis of these proteins were inactivated, the efficiency of hexadecane degradation decreased 1.7 and 2.7 times, respectively. Mutations in the *cpn* and *hrcA* genes did not affect the viability of *R. pyridinivorans* 5Ap: the original strain and the mutants exhibited the same growth rates at all temperatures in the minimal medium with succinate and in full-strength medium. In the absence of the Cpn60.1–Cpn10 heat shock proteins, the growth rate at 42°C decreased in the case of minimal agar media with kerosene, diesel fuel, acetone, naphthalene, 2-methylnaphthalene, or phenanthrene.

**Keywords:** bacterial degraders, *Rhodococcus*, the *cpn* and *hrc* genes, Hrc repressor, hexadecane