

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

---

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*  
И *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII*

© 2020 г. М. С. Ратникова<sup>a</sup>, М. А. Титок<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Кафедра микробиологии, биологический факультет,  
Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Республика Беларусь

\*e-mail: titok@bsu.by

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

Для видовой идентификации бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* установлена возможность использования рестрикционного анализа продуктов амплификации генов, кодирующих синтез β'-субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (*rpoC*) и алкан-1-монооксигеназы (*alkB*). Показано, что рестрикция ферментами *AatII* и *SacI* ампликонов гена *rpoC* размером 1236 п.н. обеспечивает образование фрагментов, отличающих близкородственные виды *R. erythropolis* и *R. qingshengii* от других представителей рода *Rhodococcus*. В то же время, бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii* отличаются между собой количеством и нуклеотидными последовательностями генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ (*alkB*-генов). В отличие от бактерий *R. erythropolis*, в геноме которых присутствует 4 копии *alkB*-генов, в хромосомах бактерий *R. qingshengii* дополнительно выявлена пятая копия данной детерминанты, амплификация которой позволяет идентифицировать эти микроорганизмы на основании результатов полимеразной цепной реакции. Дополнительно показано, что бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii* в наибольшей степени отличаются нуклеотидными последовательностями гена *alkB3* (идентичность составила около 95%). Наличие уникального сайта для рестриктазы *MfeI* в пределах продукта амплификации гена *alkB3* у бактерий *R. qingshengii* может использоваться для установления их таксономического статуса. Полимеразная цепная реакция, позволяющая выявить уникальные для бактерий *R. qingshengii* гены *alkB5*, и рестрикционный анализ генетических детерминант *rpoC* и *alkB3* являются быстрыми методами диагностики, не требующими дополнительных затрат на проведение сиквенс-анализа.

**Ключевые слова:** *R. erythropolis*, *R. qingshengii*, β'-субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы, алкан-1-монооксигеназа, видовая идентификация, рестрикционный анализ

**DOI:** 10.31857/S0026365620040138

Бактерии рода *Rhodococcus*, деградирующие широкий спектр опасных химических соединений природного и антропогенного происхождения, а также синтезирующие ряд биологически активных соединений (каротиноиды, биофлокулянты, биосурфактанты акриламида и др.), широко используются в различных областях биотехнологии (Kim, 2018). Среди бактерий этой таксономической группы большой научный и практический интерес представляют бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii*, способные деградировать углеводороды и микотоксины (Kim et al., 2018; Risa et al., 2018), обеспечивать десульфуризацию нефти и нефтепродуктов (Wang et al., 2017), продуцировать биосурфактанты (биоПАВ) (Peng et al., 2007; Wang et al., 2019). Следует отметить, что биодеградативные свойства данных микроорганизмов во многом определяются эффективностью синтеза

ими биоПАВ, которые повышают сродство к ксенобиотикам и способствуют их транспорту через мембрану бактериальной клетки (Rosa et al., 2015; Sarubbo et al., 2015). Кроме того, генетические системы метаболизма углеводов связаны с генетическими системами синтеза биосурфактантов (Inaba et al., 2013). Особый интерес данные микроорганизмы представляют в качестве продуцентов поверхностно-активных соединений, которые, в силу высокой активности, специфичности, низкой токсичности и биоразлагаемости, находят применение в различных сферах практической деятельности человека. В частности, в нефтедобывающей промышленности — для повышения нефтеотдачи, очистки емкостей от нефти, облегчения транспортировки тяжелой сырой нефти по трубопроводам (Silva et al., 2014). В пищевой промышленности — для улучшения качества жиросодержащих продуктов

(Campos et al., 2013). В косметической отрасли — в качестве основы для кремов, косметических масок, антимикробных агентов (Gupta et al., 2019). В медицине — для создания антимикробных, иммуностимулирующих, противораковых препаратов (Rodrigues et al., 2006).

Практически неограниченные метаболические способности бактерий рода *Rhodococcus* в целом и бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* в частности, обеспечивают их выделение из загрязненной природной среды, непригодной для жизни других организмов. При этом возникает необходимость либо направленного поиска бактерий этой таксономической группы, либо установления точного таксономического статуса изолированных природных изолятов, характеризующихся практически важными свойствами. Следует отметить, что бактерии рода *Rhodococcus* характеризуются генетическим полиморфизмом и для установления их видовой принадлежности используется целый арсенал морфологических, серологических и физиолого-биохимических методов (Lechevalier et al., 1970; Bell et al., 1998). В настоящее время наиболее широко используются молекулярно-генетические методы, позволяющие достаточно быстро идентифицировать природные микроорганизмы. Среди них, безусловно, одним из наиболее используемых является анализ генов, кодирующих синтез 16S рРНК. В работе K.S. Bell приведены нуклеотидные последовательности праймеров, обеспечивающих амплификацию этих детерминант и позволяющих выявить природные штаммы *R. erythropolis* на основании рестрикционного анализа полученных ампликонов с использованием фермента *KpnI*. Однако предложенные олигонуклеотиды способны комплементарно связываться с последовательностями гомологичных детерминант бактерий *R. qingshengii*, обеспечивая образование ампликонов идентичного размера и имеющих одинаково локализованный уникальный сайт для рестриктазы *KpnI* (Bell et al., 1999).

Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей генов *alkB* бактерий рода *Rhodococcus*, позволил установить возможность использования данной детерминанты для их видовой идентификации (Táncsics et al., 2015). Кроме сиквенс-анализа отдельных генов, для идентификации родококков применялся сравнительный анализ полных нуклеотидных последовательностей хромосом, жизненно важных генов, консервативных белков, а также ДНК–ДНК гибридизация (Gurtler et al., 2004; Sangal et al., 2016). Следует отметить, что данные методические подходы являются весьма трудоемкими и дорогостоящими. В связи с этим поиск новых генетических маркеров, пригодных для быстрого выявления и идентификации практически значимых бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii*, является весьма актуальным.

Целью настоящего исследования являлся поиск генов, пригодных для идентификации природных бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* с использованием метода ПЦР и рестрикционного анализа продуктов амплификации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы.** В работе использовали штаммы *R. qingshengii* НСТ-32, *R. erythropolis* A2-h2, *R. erythropolis* A29-k1, депонированные в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-823Д, БИМ В-875Г и БИМ В-986Г соответственно, а также природные изоляты A20-19 и A52-5 из коллекции кафедры микробиологии БГУ. Для рестрикционного анализа использовали секвенированные нуклеотидные последовательности генов *rpoC* штаммов бактерий из базы данных ГенБанка NCBI: *R. hoagie (equi)* — UGVJ01000001.1, FN563149.1, UGVG01000003.1, CM001149.1, ADNW02000013.1; *R. coprophilus* — KF410528.1, LS483468.1; *R. aetherivorans* — KF410544.1, KF410531.1, CP011341.1; *R. ruber* — KF410523.1, CP023714.1, CP024315.1, NZ\_LN482607.1, LN482607.1, CCSD01000056.1; *R. pyridinivorans* — KF410545.1, CP006996.1, CP022915.1, CP040719.1; *R. biphenylivorans* — CP022208.1; *R. rhodochrous* — KF410546.1, LT906450.1, UGVK01000001.1, AZHI00000000; *R. opacus* — KF410529.1, KX025128.1, AP011115.1, NWMZ01000001.1, CP009111.1, CP008947.1; *R. imtechensis* — KF410542.1, AJJH01000000; *R. jostii* — KF410550.1, CP000431.1; *R. percolates* — KF410540.1, *R. wratislaviensis* — KF410526.1, BAWF01000029.1; *R. koreensis* — KF410538.1, *R. erythropolis* — AP008957.1, BHXB01000001.1, UGVH01000001.1, LYPG01000032.1, MRCL01000006.1, ACNO01000029.1; *R. qingshengii* — CP029297.1, CP042917.1, CP025959.1, NZ\_SMZU01000018.1; *R. fascians* — CP015235.1, NOZO01000013.1, NOZN01000016.1, NPFU01000011.1, NPFT01000011.1, NPFO01000010.1; *R. corynebacterioides* — BCWV00000000.1; *R. kroppenstedtii* — KF410520.1; *R. triatoma* — KF410551.1.

Для поиска и анализа генов *alkB1-alkB5* использовали полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов *R. erythropolis* BG43 (CP011295.1), *R. erythropolis* CCM2595 (CP003761.1), *R. erythropolis* X5 (CP044284.1), *R. erythropolis* R138 (CP007255.1), *R. erythropolis* PR4 (AP008957.1), *R. qingshengii* IGTS8 (CP029297.1), *R. qingshengii* RL1 (CP042917.1), *R. qingshengii* djl-6-2 (CP025959.1), *Rhodococcus* sp. NJ-530 (CP034152.1), *Rhodococcus* sp. H-CA8f (CP023720.1), *Rhodococcus* sp. BH4 (CP014941.1), *Rhodococcus* sp. 008 (CP012749.1), *Rhodococcus* sp. YL-1 (CP017299.1), а также нуклеотидные последовательности отдельных генов *alkB1*, *alkB2*, *alkB3*, *alkB4* или *alkB5* бактерий *R. erythropolis* MK1 (KJ465093.1, KJ465094.1, KJ465095.1, KJ465096.1), *R. erythropolis* NRRL B-16531

(AJ009586.2, AJ297269.1, AJ301877.1, AJ301876.1), *Rhodococcus* sp. Q15 (AF388181.1, AF388182.1, AF388180.1, AF388179.1),

**Среды и условия культивирования.** Бактерии выращивали на полноценной среде LB (Miller, 1976). Агаризованные среды содержали 1.5% агар-агара.

**Физиолого-биохимические методы.** Согласно общепринятым методикам, изложенным в руководстве Lanуi (1987), определяли грампринадлежность бактерий и способности: образовывать эндоспores; продуцировать каталазу, оксидазу (в тесте с тетраметил-пара-фенилендиамин), нитрат- и нитритредуктазы,  $H_2S$ ; гидролизовать казеин, желатину, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу и твин-80. Рост при различных температурах изучали на агаризованных средах в диапазоне 4–55°C. Способность расти при различных концентрациях NaCl (0–14%) и при различных значениях pH (4.0–12.0; значение pH регулировали добавлением в среду 1 N HCl или 10 M NaOH) оценивали в жидкой среде LB. Интенсивность роста оценивали спектрофотометрически (“Metertech SP-8001”, Тайвань).

**Молекулярно-биологические методы.** Тотальную ДНК выделяли методом, приведенным в работе te Reile et al. (1986).

Для амплификации использовали *Taq* ДНК-полимеразу (“Thermo Scientific”, ЕС) и специфические для каждой детерминанты праймеры (ОДО “Праймтех”, Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала 100–300 нг ДНК, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.25 ммоль/л каждого праймера, 1.5 ммоль/л  $MgCl_2$ , 3% глицерина, 1.25 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер. Для проведения реакции использовали амплификатор SureCycler 8800 (“Agilent Technologies”, США). Полученные продукты разгоняли в 0.7% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в концентрации 0.5 мкг/мл (Маниатис и соавт., 1984) с использованием источника постоянного тока NANOPAC-300 (“Cleaver Scientific”, Великобритания) и визуализировали с помощью гель- и хемидокументирующей системы Fusion-FX6.Edge (“Vilber”, Франция).

Фингерпринт-анализ осуществляли с использованием праймеров ERIC-1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') и ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 52°C – 1 мин, 72°C – 2 мин (30 циклов); 72°C – 2 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *rpoC* размером 1236 п.н. использовали праймеры *rpoF* (5'-AGT GCT ACT GCG GCA AGT ACA AG-3') и *rpoR* (5'-ACT TGA TGT TCT GCG CGT GG-3') при режиме: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *alkB3* размером 609 п.н. использовали праймеры *alkB3-F* (5'-ACG AAG CGA TCC CTG AAT TGC-3') и *alkB3-R* (5'-GTA GCA AGC CGT AGT GCT CG-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 54°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Для амплификации фрагмента гена *alkB5* размером 533 п.н. использовали праймеры *alkB5-F* (5'-ATG ACA GAC ACC GAC ATT C-3') и *alkB5-R* (5'-TGA CCG TGA TTG TGC TCG ATG-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 40 с (30 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Рестрикционный анализ проводили с использованием рестриктаз (“Thermo Scientific”, ЕС) согласно рекомендациям производителя. Визуализацию фрагментов осуществляли с помощью электрофореза в 0.7% агарозном геле.

Для конструирования праймеров и анализа нуклеотидных последовательностей генов *rpoC* и *alk* использовали программы BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и MEGA4 (Tamura et al., 2007). Рестрикционный анализ генов *rpoC* и *alk*, последовательности которых депонированы в ГенБанке NCBI, осуществляли с использованием программы SnapGene Viewer 4.1.9.

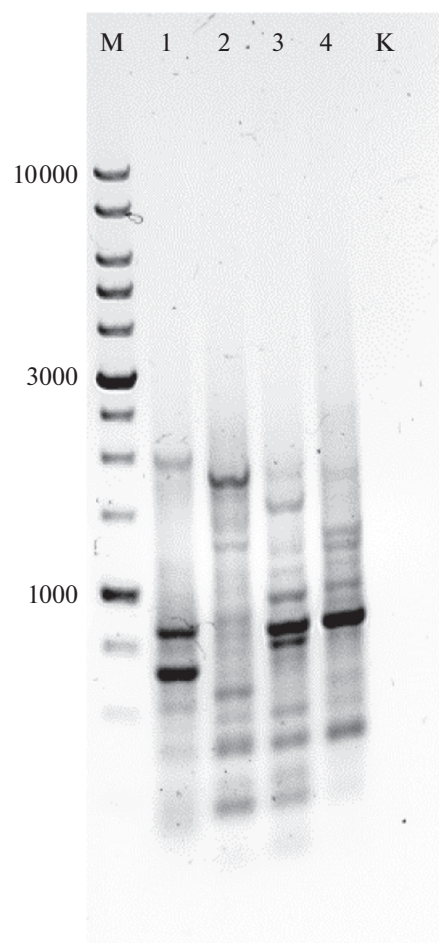
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для поиска генетических детерминант, пригодных для идентификации бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii*, использовали два подхода. Один из них основывался на анализе генов *rpoC*, детерминирующих синтез жизненно важной для всех микроорганизмов  $\beta$ '-субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Основанием этому служили ранее полученные результаты, благодаря которым природные изоляты A29-k1 и A2-h2, выделенные из различных образцов антарктического грунта, были отнесены к виду *R. erythropolis* (Charniauskaya et al., 2018). Второй подход предполагал анализ генов, присутствие которых обнаруживалось только в геномах *R. erythropolis* и близкородственных бактерий *R. qingshengii*. Основанием этому служили данные о присутствии в хромосоме представителей вида *R. erythropolis* четырех генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ (Whyte et al., 2002).

С использованием биоинформатического анализа была изучена возможность использования фрагмента гена *rpoC* для идентификации бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii*. Для этого известные последовательности этих детерминант из базы данных ГенБанка NCBI, ограниченные праймерами для амплификации, подвергались рестрикции ферментами *AatII* и *SacI*. Полученные рестрикционные профили анализировали

для представителей разных филогенетических групп бактерий рода *Rhodococcus*, выделенных на основании сходства нуклеотидных последовательностей геномов, жизненно важных генов и консервативных белков (всего 7 филогенетических – А, В, С, D, E, F и G) (Sangal et al., 2016). Следует отметить, что виды, входящие в состав одной филогенетической линии, характеризуются высоким сходством генов 16S рРНК (до 99%), затрудняющим их видовую идентификацию на основании анализа данной детерминанты (Sangal et al., 2016). В результате проведенного анализа было установлено, что рестрикционные фрагменты одинакового размера выявляются для бактерий, образующих филогенетические группы, в состав которых входит небольшое число видов. Например, группы А, D, E, F и G, представленные двумя либо одним видом, при рестрикции фрагментов генов *rpoC* образуют фрагменты одинакового размера. При этом рестрикционные профили отличаются от таковых других филогенетических групп либо по одной, либо по обоим исследованным рестриктазам (табл. 1). В то же время, близкородственные бактерии *R. erythropolis* и *R. qingshengii*, а также *R. corynebacterioides* и *R. kroppenstedtii* не различимы между собой. Нуклеотидные последовательности генов *rpoC* бактерий группы В и С, включающие микроорганизмы разных видов, характеризуются идентичными сайтами для рестриктазы *AatII* (исключение составляют *R. coprophilus*), но по-разному режутся рестриктазой *SacI*. Внутри группы В рестрикция фрагмента *rpoC* ферментом *SacI* позволяет идентифицировать бактерии *R. coprophilus* и *R. rhodochrous*. Однако использование данной рестриктазы не позволяет различить между собой виды *R. aetherivorans* и *R. ruber*, *R. pyridinivorans* и *R. biphenylivorans*. Несколько иная картина наблюдается для представителей гетерогенной группы С. Неотличимые друг от друга виды *R. wratislaviensis* и *R. koreensis* (у представителей обоих видов последовательность гена *rpoC* не содержит сайтов рестрикции *SacI*) отличаются от остальных видов (*R. opacus*, *R. imtechensis*, *R. jostii* и *R. percolates*), имеющих идентичные сайты рестрикции для *SacI* с образованием фрагментов размером 685 и 551 п.н. (табл. 1).

Таким образом, на основании проведенного анализа можно заключить, что последовательность гена *rpoC* может быть использована в качестве генетического маркера для первичной идентификации бактерий рода *Rhodococcus* (позволяет различить между собой представителей групп А, В, С, D, E, F и G). Кроме того, рестрикционный анализ этой детерминанты позволяет определить патогенные виды (патогенов животных *R. hoagie* и растений *R. fascians*), а также выявить представителей видов *R. triatomae*, *R. coprophilus* и *R. rhodochrous*.



**Рис. 1.** Электрофореграмма результатов фингер-принт-анализа с использованием праймеров ERIC-1R и ERIC-2 штаммов *Rhodococcus*: 1 – *R. erythropolis* A20-19; 2 – *R. qingshengii* A52-5; 3 – *R. erythropolis* A2-h2; 4 – *R. qingshengii* A29-k1; К – отрицательный контроль. М – маркер 1 kb DNA Ladder (“Thermo Scientific”, EC).

Для проверки полученных данных был осуществлен рестрикционный анализ фрагментов генов *rpoC* ранее идентифицированных бактерий *R. erythropolis* (штаммы A2-h2 и A29-k1) и бактерий с неопределенным таксономическим статусом (штаммы A20-19 и A52-5) с целью установления их принадлежности к одной филогенетической группе (группе D). Следует отметить, что все исследуемые бактерии не отличались между собой физиолого-биохимическими свойствами (Charniauskaya et al., 2018), однако характеризовались генетическим полиморфизмом, что не позволяло однозначно судить об их видовой принадлежности (рис. 1).

В результате проведенного анализа было установлено, что после обработки продуктов амплификации генов *rpoC* всех исследуемых бактерий рестриктазами *SacI* (дорожки 1–4) и *AatII* (до-

Таблица 1. Рестрикционный анализ гена *rpoC* бактерий рода *Rhodococcus*

| Группа | Представители                | Размер фрагментов (п.н.), образующихся при обработке генов <i>rpoC</i> рестриктазами |                               |
|--------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
|        |                              | <i>AatII</i>                                                                         | <i>SacI</i>                   |
| A      | <i>R. hoagie, equi</i>       | 434; 404; 398                                                                        | 865; 153; 110; 108            |
| B      | <i>R. coprophilus</i>        | 434; 404; 398                                                                        | 865; 371                      |
|        | <i>R. aetherivorans</i>      | 838; 398                                                                             | 865; 153; 110; 108            |
|        | <i>R. ruber</i>              | 838; 398                                                                             | 865; 153; 110; 108            |
|        | <i>R. pyridinivorans</i>     | 838; 398                                                                             | 685; 204; 153; 110; 84        |
|        | <i>R. biphenylivorans</i>    | 838; 398                                                                             | 685; 204; 153; 110; 84        |
|        | <i>R. rhodochrous</i>        | 838; 398                                                                             | 769; 204; 153; 110            |
| C      | <i>R. opacus</i>             | 838; 398                                                                             | 685; 551                      |
|        | <i>R. imtechensis</i>        | 838; 398                                                                             | 685; 551                      |
|        | <i>R. jostii</i>             | 838; 398                                                                             | 685; 551                      |
|        | <i>R. percolates</i>         | 838; 398                                                                             | 685; 551                      |
|        | <i>R. wratislaviensis</i>    | 838; 398                                                                             | Нет сайта                     |
|        | <i>R. koreensis</i>          | 838; 398                                                                             | Нет сайта                     |
| D      | <i>R. erythropolis</i>       | 832; 249; 155                                                                        | 700; 248; 165; 123            |
|        | <i>R. qingshengii</i>        | 832; 249; 155                                                                        | 700; 248; 165; 123            |
| E      | <i>R. fascians</i>           | 832; 249; 155                                                                        | 685; 248; 108; 96; 69; 15; 15 |
| F      | <i>R. corynebacterioides</i> | Нет сайта                                                                            | 865; 248; 108; 15             |
|        | <i>R. kroppenstedtii</i>     | Нет сайта                                                                            | 865; 248; 108; 15             |
| G      | <i>R. triatomaе</i>          | 838; 398                                                                             | 685; 263; 180; 108            |

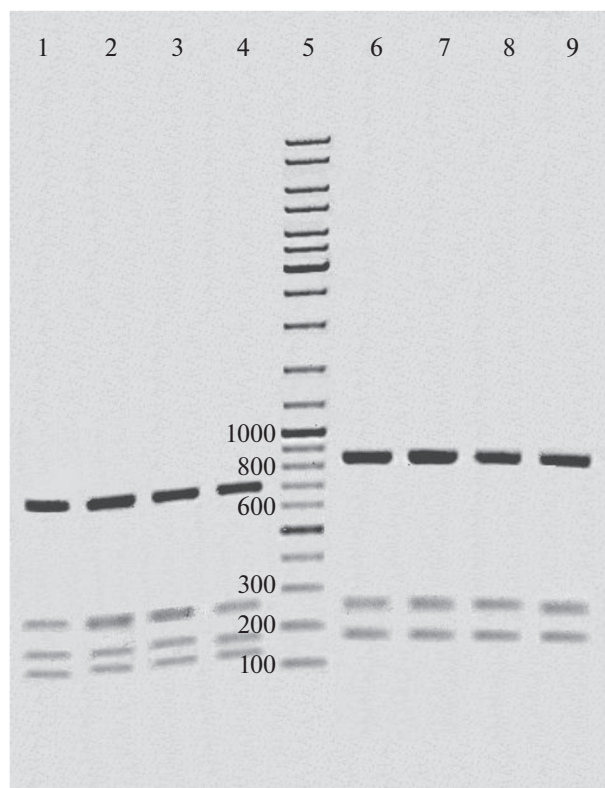
Примечание. Бактерии рода *Rhodococcus* разделены на филогенетические группы на основании молекулярного анализа, представленного в работе (Sangal et al., 2016).

рожки 6–9) образуются фрагменты, характерные для представителей филогенетической группы D (700, 248, 165, 123 и 832, 249, 155 п.н. соответственно) (рис. 2). Однако, как указывалось выше, рестрикционный анализ ампликонов гена *rpoC* не позволил различить между собой близкородственные виды *R. erythropolis* и *R. qingshengii*.

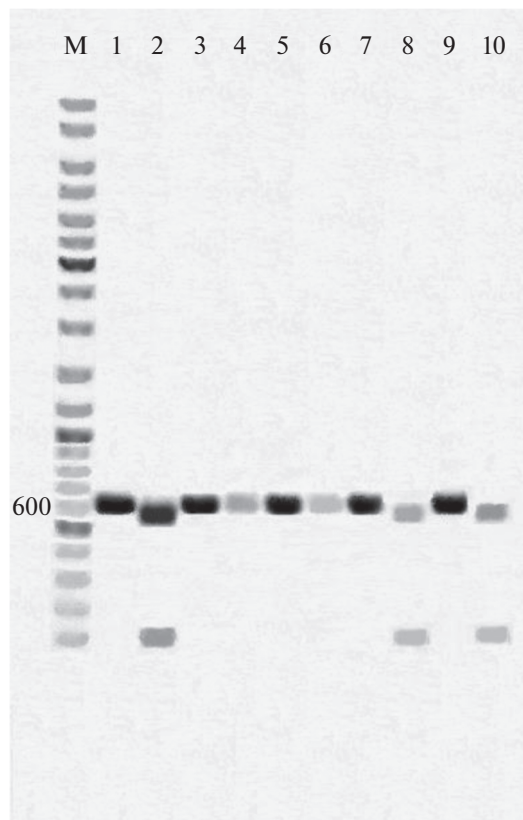
С целью поиска генетических маркеров, позволяющих различить данные близкородственные виды, был проведен анализ геномов представителей этих таксономических групп, нуклеотидные последовательности которых депонированы в базе данных ГенБанк NCBI. Сравнительный секвенс-анализ позволил выявить отличия в генах, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ (*alkB*). Во-первых, было установлено, что бактерии этих видов различаются между собой количеством копий *alkB*-генов. В геномах *R. erythropolis* и *R. qingshengii*

и ряда *Rhodococcus* sp. выявлялись 4 *alkB*-гена, имеющих одинаковые размеры и одинаковое генетическое окружение. Во-вторых, наибольшие отличия обнаруживаются в пределах нуклеотидных последовательностей гена *alkB3*, присутствующего в геномах обоих видов (сходство не превышало 95.2%). В-третьих, в хромосоме бактерии *R. qingshengii* и некоторых бактерий с неустановленным таксономическим статусом выявлялся дополнительный уникальный ген *alkB5* (идентичность данных генов составила 99.6–100%) (табл. 2). Следует отметить, что все обнаруженные *alkB*-детерминанты определяли синтез белков с характерными функциональными доменами (Whyte et al., 2002; van Beilen, 2003).

Детальный анализ нуклеотидных последовательностей гена *alkB3* позволил установить, что данные детерминанты у бактерий *R. erythropolis* и



**Рис. 2.** Результаты рестрикционного анализа продуктов амплификации генов *proC* ферментами *SacI* (дорожки 1–4) и *AatII* (дорожки 6–9) штаммов *Rhodococcus*: 1, 6 – *R. erythropolis* A20-19; 2, 7 – *R. qingshengii* A52-5; 3, 8 – *R. erythropolis* A2-h2; 4, 9 – *R. qingshengii* A29-k1; 5 – маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix.



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов амплификации генов *alkB3* до (дорожки 1, 3, 5, 7, 9) и после рестрикции ферментом *MfeI* (дорожки 2, 4, 6, 8, 10) штаммов *Rhodococcus*: 1, 2 – *R. qingshengii* A29-k1; 3, 4 – *R. erythropolis* A2-h2; 5, 6 – *R. erythropolis* A20-19; 7, 8 – *R. qingshengii* A52-5; 9, 10 – *R. qingshengii* НСТ-32; М – маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix.

*R. qingshengii* отличаются сайтами рестрикции для ряда ферментов. В частности, при обработке продуктов амплификации данных детерминант размером 609 п.н. бактерий *R. qingshengii* рестриктазами *MfeI*, *CfrI*, *AleI* и *BsaI* образуются фрагменты: 549 и 60 п.н.; 288, 259 и 62 п.н.; 409 и 200 п.н.; 42 и 567 п.н. соответственно. В то же время, гомологичные ампликоны бактерий *R. erythropolis* имеют другие сайты рестрикции для вышеуказанных рестриктаз: сайт для *MfeI* отсутствует, под действием *CfrI*, *AleI* и *BsaI* образуются фрагменты: 259, 216, 72 и 62 п.н.; 316 и 293 п.н.; 84, 42 и 483 п.н. соответственно. Для проверки выявленных отличий с использованием праймеров *alkB3*-F (5'-ACG AAG CGA TCC CTG AAT TGC-3') и *alkB3*-R (5'-GTA GCA AGC CGT AGT GCT CG-3') в реакции ПЦР при добавлении в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из штаммов *R. qingshengii* НСТ-32, *R. erythropolis* A2-h2, *R. erythropolis* A29-k1 и изолятов A20-19 и A52-5, были получены продукты амплификации размером 609 п.н., которые подвергались рестрикции ферментом *MfeI*. В результате этих экспериментов было установлено, что ампликоны гена *alkB3* штаммов *R. qing-*

*shengii* НСТ-32, *R. erythropolis* A29-k1 и A52-5 имеют уникальный сайт для рестриктазы *MfeI*, тогда как ампликоны штаммов *R. erythropolis* A2-h2 и A20-19 его не содержат (рис. 3). Полученные данные позволили реидентифицировать штамм *R. erythropolis* A29-k1 и идентифицировать штамм A52-5 как *R. qingshengii*.

Для подтверждения полученных результатов были сконструированы праймеры, обеспечивающие амплификацию гена *alkB5*, присутствующего только в хромосоме бактерий *R. qingshengii*. Анализ нуклеотидной последовательности, ограниченный использованными праймерами, показал, что образующийся ампликон размером 533 п.н. разрезается на определенные фрагменты рестриктазами *BamHI* (358 и 175 п.н.), *AatII* (329 и 204 п.н.), *PvuI* (337 и 196 п.н.), *XhoI* (456 и 77 п.н.), *HpaII* (198, 169 и 166 п.н.), *RsaI* (286 и 247 п.н.) и *SalI* (332, 159 и 42 п.н.). В результате проведенной полимеразной цепной реакции ампликоны искомого размера были получены только при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК, выделенной из

**Таблица 2.** Сходство нуклеотидных последовательностей *alkB*-генов бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii*

| Штамм                               | Сходство нуклеотидных последовательностей<br><i>alkB</i> -генов бактерий <i>R. erythropolis</i> и <i>R. qingshengii</i> , % |                              |                              |                              |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                     | <i>alkB1</i><br>(1176 п.н.)*                                                                                                | <i>alkB2</i><br>(1227 п.н.)* | <i>alkB3</i><br>(1161 п.н.)* | <i>alkB4</i><br>(1167 п.н.)* | <i>alkB5</i><br>(1152 п.н.)* |
| <i>R. erythropolis</i> PR4          | 100.0                                                                                                                       | 100.0                        | 100.0                        | 100.0                        | Н.в.                         |
| <i>R. erythropolis</i> МК1          | 100.0                                                                                                                       | 100.0                        | 100.0                        | 100.0                        | Н.в.                         |
| <i>R. erythropolis</i> R138         | 98.7                                                                                                                        | 98.8                         | 98.0                         | 99.4                         | Н.в.                         |
| <i>R. erythropolis</i> BG43         | 98.7                                                                                                                        | 98.9                         | 98.5                         | 99.4                         | Н.в.                         |
| <i>R. erythropolis</i> CCM2595      | 96.9                                                                                                                        | 99.5                         | 97.2                         | 99.2                         | Н.в.                         |
| <i>Rhodococcus</i> sp. H-CA8f       | 96.9                                                                                                                        | 99.0                         | 98.4                         | 99.3                         | Н.в.                         |
| <i>R. qingshengii</i> IGTS8         | 96.7                                                                                                                        | 95.8                         | 95.0                         | 98.2                         | 100.0                        |
| <i>R. qingshengii</i> djl-6-2       | 96.6                                                                                                                        | 95.9                         | 94.8                         | 97.5                         | 100.0                        |
| <i>R. qingshengii</i> RL1           | 96.6                                                                                                                        | 95.9                         | 94.8                         | 97.3                         | 100.0                        |
| <i>Rhodococcus</i> sp. NJ-530       | 96.6                                                                                                                        | 95.8                         | 95.1                         | 98.1                         | 100.0                        |
| <i>Rhodococcus</i> sp. Q15          | 97.1                                                                                                                        | 95.7                         | 95.1                         | Н.д.                         | 99.9                         |
| <i>Rhodococcus</i> sp. 008          | 97.0                                                                                                                        | 96.3                         | 95.2                         | 97.3                         | 99.8                         |
| <i>Rhodococcus</i> sp. YL-1         | 96.9                                                                                                                        | 95.8                         | 95.1                         | 98.3                         | 99.6                         |
| <i>Rhodococcus</i> sp. BH4          | 96.7                                                                                                                        | 95.8                         | 95.1                         | 98.3                         | 99.6                         |
| <i>R. erythropolis</i> X5           | 98.0                                                                                                                        | 95.9                         | 95.1                         | 98.1                         | 98.1                         |
| <i>R. erythropolis</i> NRRL B-16531 | 98.04                                                                                                                       | 95.93                        | 95.1                         | Н.д.                         | 98.1                         |

Примечание. “\*” — указаны размер генов в п.н.; “Н.в.” — гены не выявлены; “Н.д.” — отсутствуют последовательности генов в ГенБанке NCBI; для генов *alkB1–alkB4* указано сходство с таковыми штамма *R. erythropolis* PR4; для гена *alkB5* указано сходство с таковыми штамма *R. qingshengii* IGTS8.

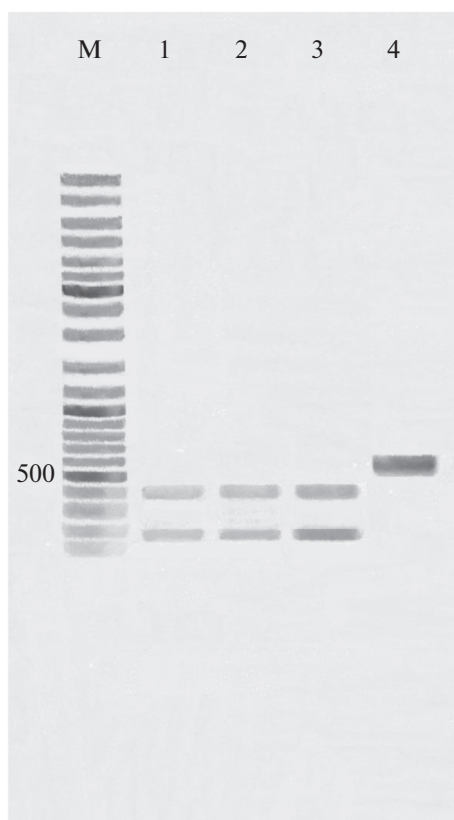
штаммов *R. qingshengii* НСТ-32, *R. erythropolis* A29-k1 и изолята A52-5, которые разрезались рестриктазой *Bam*HI на фрагменты размером 358 и 175 п.н. (рис. 4). Полученные данные подтвердили принадлежность штамма A52-5 и ранее определенного штамма *R. erythropolis* A29-k1 к виду *R. qingshengii*.

Таким образом, в ходе проведенного исследования были выявлены новые генетические маркеры (*rpoC*, *alkB3*, *alkB5*), пригодные для идентификации бактерий *R. erythropolis* и близкородственного вида *R. qingshengii*. Следует отметить, что предложенный метод с использованием полимеразной цепной реакции (позволяет выявить уникальные для бактерий *R. qingshengii* гены *alkB5*) и рестрикционного анализа отдельных генетических детерминант (*rpoC* и *alkB3*), является достаточно

быстрым и не требует дополнительных затрат на секвенс-анализ. Выявленные особенности в организации детерминант, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ, могут использоваться не только для видовой идентификации, но и являются основой для изучения роли отдельных *alkB*-генов в способности бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* деградировать углеводороды и синтезировать поверхностно-активные соединения.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

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



**Рис. 4.** Электрофореграмма продуктов амплификации генов *alkB5* (дорожка 4), обработанных рестриктазой *Bam*HI (дорожки 1–3) штаммов *Rhodococcus*: 1, 4 – *R. qingshengii* НСТ-32; 2 – *R. qingshengii* A29-k1; 3 – *R. qingshengii* A52-5; М – маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix.

## 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

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. Пер. с англ. под ред.: Баева А.А., Скрябина К.Г. М.: Мир, 1984. 479 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. Пер. с англ.: Ю.Н. Зографа [и др.]; под ред. и с предисл. Алиханяна С.И. М.: Мир, 1976. 436 с.
- 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. 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.
- Bell K.S., Kuyukina M.S., Heidbrink S., Philp J.C., Aw D.W.J., Ivshina I.B., Christofi N. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 87. P. 472–480.
- Bell K.S., Philp J.S., Christofi N., Aw D.W.J. The genus *Rhodococcus* // J. Appl. Microbiol. 1998. V. 85. P. 195–210.
- Campos J.M., Stamford T.L.M., Sarubbo L.A., de Luna J.M., Rufino R.D., Banat I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries // Biotechnol. Prog. 2013. V. 29. P. 1097–1108.
- Gupta P.L., Rajput M., Oza T., Trivedi U., Sanghvi G. Eminence of microbial products in cosmetic industry // Nat. Prod. Bioprospect. 2019. V. 9. P. 267–278.
- Gurtler 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 // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 28. P. 1037–1051.
- Lanyi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria // Methods Microbiol. 1988. V. 19. P. 1–67.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1970. V. 20. P. 435–443.
- Peng F., Lui Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. P. 1603–1611.
- Risa A., Krifaton C., Kukolya J., Kriszt B., Cserhádi M., Tancsics A. Aflatoxin B1 and zearalenone-detoxifying profile of *Rhodococcus* type strains // Curr. Microbiol. 2018. V. 75. P. 907–917.
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. P. 609–618.
- Rosa C.F.C., Freire D.M.G., Ferraz E.C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil // J. Environ. Chem. Eng. 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. Article 38392.
- Sarubbo L.A., Rocha R.B., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Banat I.M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants // Chem. Ecol. 2015. V. 31. P. 707–723.
- Silva R.C.F.S., Almeida D.G., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills // Int. J. Mol. Sci. 2014. V. 15. P. 12523–12542.

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Táncsics A., Benedek T., Szoboszlay S., Veres P.G., Farkas M., Máthéet 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.
- 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.
- van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment // Oil & Gas Sci. Technol. 2003. V. 58. P. 427–440.
- Wang J., Butler R.R., Wu F., Pombert J.F., Kilbane J.J., Stark B.C. Enhancement of microbial biodesulfurization via genetic engineering and adaptive evolution // PLoS One. 2017. V. 12. Article e0168833.
- Wang Y., Nie M., Diwu Z., Lei Y., Li H., Bai X. Characterization of trehalose lipids produced by a unique environmental isolate bacterium *Rhodococcus qingshengii* strain FF // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 127. P. 1442–1453.
- 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.

## Molecular Genetic Markers for Identification of *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus qingshengii*

M. S. Ratnikova<sup>1</sup> and M. A. Titok<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarussian State University, Minsk, 220030 Belarus

\*e-mail: titok@bsu.by

Received February 27, 2020; revised March 25, 2020; accepted March 27, 2020

**Abstract**—The application of restriction analysis of amplification products of the genes *rpoC* and *alkB*, encoding the synthesis of the DNA-dependent RNA polymerase  $\beta'$ -subunit and alkane-1-monooxygenase, respectively, for species identification of *R. erythropolis* and *R. qingshengii* was studied. Restriction of the *rpoC* amplicons (1236 bp) by the enzymes *AatII* and *SacI* resulted in formation of the fragments differentiating the closely related species *R. erythropolis* and *R. qingshengii* from other members of the genus *Rhodococcus*. At the same time, *R. erythropolis* and *R. qingshengii* differed in the number and nucleotide sequences of the genes encoding the synthesis of alkane-1-monooxygenases (*alkB* genes). Unlike *R. erythropolis*, which has four *alkB* copies in the genome, an additional fifth copy of this determinant was revealed in the chromosome of *R. qingshengii*. Its amplification may be used to identify these microorganisms by the results of polymerase chain reaction. It was also shown that the most pronounced difference between *R. erythropolis* and *R. qingshengii* occurred in the *alkB3* nucleotide sequences (~95% identity). The presence of the unique site for the *MfeI* restriction endonuclease in the product of *alkB3* amplification in *R. qingshengii* may be used to determine their taxonomic position. Polymerase chain reaction, which makes it possible to reveal the *alkB5* genes, a unique feature of *R. qingshengii*, and restriction analysis of the *rpoC* and *alkB3* genetic determinants are rapid diagnostic techniques not requiring additional expense for sequence analysis.

**Keywords:** *R. erythropolis*, *R. qingshengii*,  $\beta'$ -subunit of the DNA-dependent RNA polymerase, alkane-1-monooxygenase, species identification, restriction analysis