

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА
ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА *GORDONIACEAE***

Камалов Айнур Мирзаевич

*магистр 1 курса кафедры генетики Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы, 450000, РФ, г. Уфа, ул. Октябрьской революции, 3а
E-mail: arbaitenmail@yandex.ru*

Маркушева Татьяна Вячеславовна

*д-р биол. наук, профессор, преподаватель, руководитель группы генетики микроорганизмов Уфимского института биологии Российской академии наук, 450054, РФ, г. Уфа, проспект Октября, 69
E-mail: tmarkusheva@gmail.com*

**THE PHYLOGENETIC POSITION OF CHLOROPHENOXYAROMATIC
COMPOUNDS STRAIN-DESTRUCTOR OF THE *GORDONIACEAE* FAMILY**

Ainur Kamalov

A 1st year graduate student, Department of genetic, M. Akmullah Bashkir state pedagogical university, 450000, Russia, Ufa, October Revolution Street, 3a

Tatyana Markusheva

Doctor of biological sciences, professor, lecturer, head of the Genetics of microorganisms group of Ufa Institute of Biology of Russian Academy of Sciences, 450054, Russia, Ufa, Prospect of October, 69

АННОТАЦИЯ

Проведено определение филогенетического положения вновь выделенного штамма бактерий семейства *Gordoniaceae*. Объектом исследования являлся штамм, выделенный из почвенной биоты промышленной зоны г. Уфы. Штамм

был способен к утилизации хлорароматических соединений. В исследовании использован метод сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Секвенирование амплификатов гена 16SpРНК осуществляли по методу Ф. Сэнгера. Для интерпретации филогенетических отношений между предположительно родственными последовательностями применяли метод ближайших соседей (Neighbor-Joining). Согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам штамм был предварительно отнесен к актинобактериям. Систематика таксона *Actinobacteria* в настоящее время активно пересматривается с точки зрения филогении. По результатам анализа филогенетического дерева, построенного с использованием практически полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, штамм был идентифицирован как представитель рода *Gordonia* семейства *Gordoniaceae* порядка *Corynebacteriales* класса *Actinobacteria*. Полученные данные дополняют сведения о представителях рода *Gordonia*, выделенного в отдельный таксон из рода *Rhodococcus* на основании биохимических и филогенетических характеристик [11, с. 341]. В настоящее время, благодаря активным филогенетическим исследованиям, описано более 20 видов бактерий рода *Gordonia*, среди которых штаммы, способные к производству каротиноидов, разложению алифатических и ароматических углеводов, галогенированных ароматических соединений, бензотиофена, нитрила, полиизопрена, ксилола, биодесульфатации угля и сырой нефти. Классифицированный в настоящей работе штамм *Gordonia* sp. может быть применен в области разработки методов биоремедиации окружающей среды.

ABSTRACT

The phylogenetic position of the newly isolated bacterial strain of the *Gordoniaceae* family had been determined. The object of the research was a strain isolated from soil biota the Ufa industrial zone. The strain was able to utilize chlorophenoxyaromatic compounds. The investigation was done by the comparative analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequences. Sequencing of the amplified 16S rRNA gene was performed by F. Sanger. The interpretation of the phylogenetic

relationships between sequences was carried out by the neighbor-joining method. The strain was previously attributed to the *Actinobacteria* assigned to the established cultural, morphological, physiological and biochemical characteristics. The *Actinobacteria* systematics is actively reviewed from the point of phylogeny. According to the phylogenetic tree constructed on the nearly complete 16S rRNA gene nucleotide sequence the strain have been identified as a member of the genus *Gordonia* belongs to the family *Gordoniaceae* order *Corynebacteriales* phylum *Actinobacteria*. The results of the study supplement data of the genus *Gordonia* representatives. The genus *Gordonia* separated into its own taxon from the genus *Rhodococcus* based on biochemical and phylogenetic characteristics [11, с. 341]. Today due to the active phylogenetic studies more than 20 species of bacterial genus *Gordonia* have been found. The genus *Gordonia* includes strains capable of producing carotenoids, degradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons, halogenated aromatic compounds, benzothiophene, nitrile, polyisoprene, xylene and coal and crude oil biodesulfatation. The classified in this study strain *Gordonia* sp. can be applied for environmental bioremediation methods development.

Ключевые слова: бактерия, ген 16S рРНК, филогенетическое дерево, *Gordonia*.

Keywords: bacteria, 16S rRNA gene, phylogenetic tree, *Gordonia*.

Введение

В настоящее время систематика микроорганизмов неразрывно связана с развитием молекулярной генетики. Предложенные К. Везе филогенетические критерии классификации организмов по структуре генов рРНК значительно упрощают и ускоряют определение таксономического положения исследуемого объекта. Важным преимуществом генетического подхода является то, что филогения, создавая естественную систему классификации, позволяет идентифицировать организмы на основе их естественных родственных связей.

Высокая степень изученности нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК прокариот открывает перспективы эффективного выявления микроорганизмов, в том числе тех, культивирование которых в лаборатории в настоящий момент затруднено или невозможно. Кроме этого, становится доступным определение видовой структуры целого сообщества микроорганизмов за короткий срок.

Следует отметить, что молекулярно-генетический анализ не вытесняет традиционные характеристики, раскрывающие морфологические, морфометрические, биохимические и физиологические особенности прокариот, а существенно дополняет их.

Целью настоящей работы являлось определение филогенетического положения вновь выделенного из почвенной биоты техногенной системы зоны штамма-деструктора хлорароматических соединений.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась бактериальная культура 5D, выделенная из образца почвенной биоты, подвергавшейся воздействию факторов нефтехимического производства.

Для выращивания культуры применяли как твердые, так и жидкие агаризованные среды на основе мясопептонного бульона (МПБ) и среды Лурия –Бертани (LB). При получении чистой культуры бактерии засеивали в 3 мл богатой питательной среды, культивировали при температуре 28 °С в течение 12–16 часов [2, с. 169]. Выросшую клеточную суспензию последовательно разводили до концентрации 10^{-7} клеток на 1 мл среды. Три аликвоты по 40 мкл в концентрации (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) высевали на чашки Петри методом Дригальского и инкубировали при температуре 28 °С в течение 3 суток. Далее чистую культуру использовали для получения биомассы и выделения геномной ДНК модифицированным методом щелочного лизиса ДНК Бирнбойма-Доли и Wizard-технологии фирмы Promega (США). Хранение образцов ДНК проводили при температуре -18 °С.

При амплификации гена 16S рРНК пользовались реакционной смесью следующего состава: 1х буфер ДНК – полимеразы BioTaq – 20 мкл, 10мМ dNTP – 20 мкл, 20пМ 8-27F – 20 мкл, 20пМ 1492R – 20 мкл, ДНК – полимеразы BioTaq – 2 мкл, H₂O(MQ) – 35,8 мкл, ДНК (матр.) – 3 мкл. Полимеразную цепную реакцию с универсальными праймерами осуществляли в амплификаторе Bio-Rad MJMini с помощью следующей программы: 1) 94 °С– 1:0, 2) 94 °С– 0:30, 3) 55 °С– 0:30, 4) 72 °С– 0:45, 5) повтор 2 – 3 – 4 5 циклов, 6) 94 °С– 0:30, 7) 55 °С– 0:30, 8) 72 °С– 1:00, 9) повтор 6 – 7 – 8 30 циклов, 10) 72 °С– 2:00, 11) конец программы [5, с. 47]. В ходе анализа продуктов амплификации применяли 2 %-ый агарозный гель, который по окончании электрофореза окрашивали в течение 5 мин в растворе бромистого этидиума (в концентрации 0,5 мкг/мл), а затем просматривали в проходящем УФ-свете и фотографировали.

Секвенирование амплификатов гена 16S рРНК осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) по инструкциям производителя.

Первичный анализ нуклеотидной последовательности осуществляли в пакете интернет-ресурса BLAST. Обнаруженные в GenBank последовательности гена 16S рРНК, близкие к исследуемой, конвертировали в пакет программ MEGA6 для множественного выравнивания, после чего полученные данные обрабатывали методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) с поддержкой Bootstrap – теста для интерпретации филогенетических отношений между предположительно родственными последовательностями.

Результаты и обсуждения

Поиск и изучение микроорганизмов, способных конвертировать загрязнители промышленного ряда, в настоящее время привлекает все большее внимание в связи с острой необходимостью развития биологических технологий защиты и очистки окружающей среды [1, с. 121; 3, с. 172; 4, с. 194].

Из почвенной биоты промышленной зоны г. Уфы был выделен штамм 5D-деструктор хлорароматических соединений. Грамвариабельные аэробные клетки штамма имели вид палочек и кокков, на твердых средах формировали шероховатые окрашенные колонии. Согласно культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам бактерии были отнесены к актиномицетам.

Принимая во внимание то, что систематика таксона *Actinobacteria* в настоящее время активно пересматривается с позиции филогенетики, в ходе изучения вновь выделенного деструктора хлорароматических соединений было проведено его генетическое типирование. Результаты фракционирования ПЦР-амплификатов гена, кодирующего 16S рРНК штамма 5D, представлены на рисунке 1.

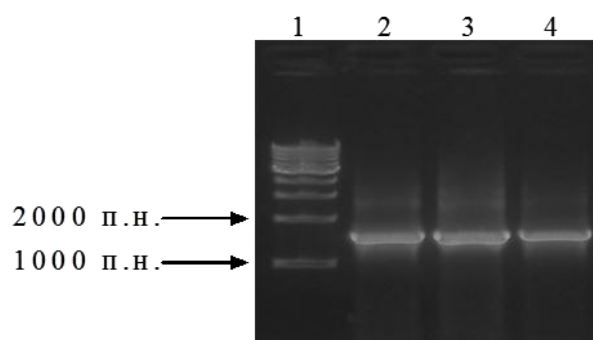


Рисунок 1. Электрофореграмма амплификатов гена 16S рРНК штамма 5D. Условные обозначения: стрелками показаны фрагменты маркера с шагом в 1000 п.н. 1 – маркер; 2, 3 – продукт амплификации гена 16S рРНК штамма 5D; 4 – положительный контроль (матрица – ДНК *E. coli* z85).

После секвенирования полученного ПЦР-амплификата практически полная (1420 нуклеотидов) последовательность гена 16S рРНК штамма 5D была использована для построения филогенетического дерева изучаемого бактериального изолята (рис. 2).

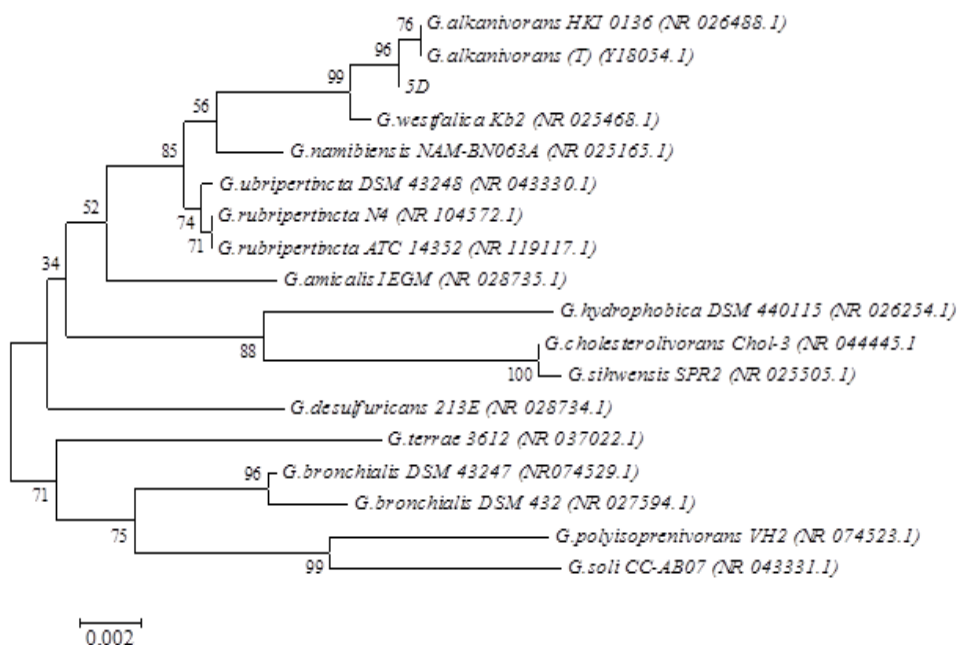


Рисунок 2. Филогенетическое дерево штамма 5D, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК

Из рисунка 2 видно, что наиболее близкими представителями к исследованному образцу 5D являются бактерии рода *Gordonia*. Обнаруженный уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК позволяет отнести изучаемую культуру к роду *Gordonia* семейства *Gordoniaceae* порядка *Corynebacteriales* класса *Actinobacteria* домена *Bacteria*.

История рода *Gordonia* показывает, что представители гордоний были выделены в отдельный таксон из рода *Rhodococcus*. Первые доказательства необходимости обособления рода *Gordonia* были опубликованы М. Tsukamura в 1971 году. Однако всеобщее признание нового таксона *Gordonia* на основании биохимических и филогенетических характеристик относится к 1988 году [11, с. 341]. К настоящему моменту, благодаря активным филогенетическим исследованиям, описано более 20 видов бактерий рода *Gordonia* [10, с. 485].

Обнаружено, что представители рода *Gordonia*, способные производить каротиноиды, имеют практическое значение для промышленности и с их помощью создаются пищевые добавки [7, с. 3197; 8, с. 3759]. Полезные

свойства гордоний нашли применение в очистке окружающей среды. Ряд авторов приводят данные о способности некоторых бактерий рода *Gordonia* к биодесульфатации угля и сырой нефти, что приводит к уменьшению выбросов оксидов серы в атмосферу при сжигании данных ископаемых [6, с. 505; 9, с. 1848]. Гордонии способны разлагать алифатические и ароматические углеводороды, галогенированные ароматические соединения, бензотиофен, нитрил, полиизопрен, ксилол [7, с. 3197].

В результате настоящего исследования было определено филогенетическое положение вновь выделенного представителя рода *Gordonia*, утилизирующего хлорароматические соединения.

Список литературы:

1. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. и др. Биоразнообразие бактерий-деструкторов хлорированных феноксикилот // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 121–123.
2. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. и др. Выделение и анализ биодеградационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикилот рода *Rhodococcus* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5(2). – С. 169–171.
3. Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Жарикова Н.В. и др. Особенности структуры микробиоты техногенной экосистемы Северного промузла РБ: бактерии-деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5(2). – С. 172–174.
4. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В. и др. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикилот гамма – подкласса протеобактерий // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5(2). – С. 194–195.
5. Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю. и др. Новый штамм-деструктор хлорфеноксиалкановых гербицидов *Serratia marcescens* МТ9 // Естественные и технические науки. – 2014. – № 1 (69). – С. 46–49.

6. Abbad-Andaloussi S., Warzywoda M., Monot F. Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains // *Oil Gas Sci. Technol.* – 2003. – Vol. 58. – P. 505–513.
7. Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – Vol. 70. – № 6. – P. 3195–3204.
8. Kim J.H. et al. Carotenoid production from n-alkanes with a broad range of chain lengths by the novel species *Gordonia ajoucoccus* A2T // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2014. – Vol. 98. – № 8. – P. 3759–3768.
9. Kim S.B., R. Brown, C. Oldfield, S.C. Gilbert, and M. Goodfellow. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene-desulfurizing actinomycete // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 49. – P. 1845–1851.
10. Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov. // *International journal of systematic bacteriology.* – 1997. – Vol. 47. – № 2. – P. 479–491.
11. Stackebrandt E., Smida J.A.N., Collins m. D. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: Revival of the genus *Gordonia* (Tsukamura) // *The Journal of General and Applied Microbiology.* – 1988. – Vol. 34. – № 4. – P. 341–348.

References:

1. Zharikova N.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Markusheva T.V. Biological variety of bacteria-decomposers of chlorinated phenoxyacids. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. [Vestnik of the Orenburg State University]. 2009, no. 6, pp. 121–123. (In Russian)
2. Zharikova N.V., Zhurenko E.Y., Korobov V.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Markushcva T.V., Abramov S.N. Isolation and biodegradation potential analysis of the new natural bacteria-destroyer of chlorophenoxyacetic acids of *Rhodococcus* genus. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nuk*. [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. 2011, Vol. 13, no. 5(2), pp. 169–171. (In Russian).

3. Zhurenko E.Y., Korobov V.V., Zharikova N.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G., Markushcva T.V. Structure of microbial communities of RB industrial ecosystem: phenol and 2,4-dichlorophenol bacteria-destructors. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nuk.* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. 2011, Vol. 13, no. 5(2), pp. 172–174. (In Russian).
4. Markushcva T.V., Zhurenko E.Y., Zharikova N.V., Korobov V.V., Yasakov T.R., Anisimova L.G. Chlorophenoxyacetic acids bacteria-destructors of proteobacteria gamma – subclass. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nuk.* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. 2011, Vol.13, no.5(2), pp. 194–195. (In Russian).
5. Yasakov T.R., Zharikova N.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Sagitova A.I., Markusheva T.V. *Serratia marcescens* MT9 – a new chlorophenoxyalcanoic herbicides degrader. *Estestvennye i tehniczeskie nauki.*[Natural and technical sciences]. 2014, no. 1(69), pp. 46–49. (In Russian).
6. Abbad-Andaloussi S., M. Warzywoda, and F. Monot. 2003. Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains. *Oil Gas Sci. Technol.* Vol. 58. P. 505–513.
7. Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2004. Vol. 70. no. 6. P. 3195–3204.
8. Kim J.H. et al. Carotenoid production from n-alkanes with a broad range of chain lengths by the novel species *Gordonia ajoucoccus* A2T. *Applied microbiology and biotechnology.* 2014. Vol. 98. no. 8. P. 3759–3768.
9. Kim S.B., R. Brown, C. Oldfield, S.C. Gilbert, and M. Goodfellow. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene-desulfurizing actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. Vol. 49. P. 1845–1851.

10. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov. International journal of systematic bacteriology. 1997. Vol. 47. no. 2. P. 479–491.
11. Stackebrandt E., Smida J.A.N., Collins m. D. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: Revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). The Journal of General and Applied Microbiology. 1988. Vol. 34. no. 4. P. 341–348.