

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Активность гена алканмонооксигеназы *alkB* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов

Т.Н. Шапиро¹ ✉, Н.А. Манучарова², Е.С. Лобакова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, Россия

✉ floyd52@rambler.ru

Аннотация. Ферменты алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153* ответственны за аэробную деградацию *n*-алканов нефти и нефтепродуктов. Для доказательства использования штаммами углеводородокисляющих бактерий, выделенных из авиационного керосина ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95, *n*-алканов нефти и нефтепродуктов, проведена детекция ключевых генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153*, ответственных за окисление углеводородов с определенной длиной цепи. Установлено, что штаммы бактерий, изолированные из реактивного топлива ТС-1, за исключением *Deinococcus* sp. Bi7, имели как минимум один из исследованных генов деградации *n*-алканов. Штаммы *Sphingobacterium multivorum* Bi2, *Alcaligenes faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Rhodococcus erythropolis* Bi6 содержали ген *alkB*. У штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из бензина АИ-95, этот ген алканмонооксигеназы не был детектирован. С помощью метода ПЦР в реальном времени проанализирована активность гена *alkB* у всех полученных из нефтепродуктов штаммов бактерий и определено число его копий. Методом ПЦР в реальном времени с использованием праймера с другой последовательностью нуклеотидов для детекции гена *alkB* установлена его активность у всех штаммов бактерий, выделенных из бензина АИ-95, причем штамм *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 отнесен к группе с высоким уровнем его активности (1290 копий/мл). По оценке роста исследованных углеводородокисляющих бактерий на плотной минеральной среде Эванса с модельной смесью углеводородов штаммы были разделены на три группы. Отмечены совпадения результатов по распределению штаммов углеводородокисляющих бактерий в группах по активности гена *alkB* и группах, сформированных на основе способности роста и использования модельной смеси углеводородов и нефтепродуктов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости применения комплекса молекулярно-генетических и физиологических методов для всестороннего анализа распространения исследуемых генов у бактерий и оценки их активности в штаммах углеводородокисляющих бактерий, способных к биодegradации углеводородов нефтепродуктов.

Ключевые слова: биоповреждение; нефтепродукты; углеводородокисляющие бактерии; биодegradация; алканмонооксигеназы; ген *alkB*; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Шапиро Т.Н., Манучарова Н.А., Лобакова Е.С. Активность гена алканмонооксигеназы *alkB* у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):575-582. DOI 10.18699/VJGB-22-70

Activity of alkanmonoxygenase *alkB* gene in strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from petroleum products

T.N. Shapiro¹ ✉, N.A. Manucharova², E.S. Lobakova¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Soil Science, Moscow, Russia

✉ floyd52@rambler.ru

Abstract. Alkanmonoxygenase enzymes *AlkB* and *Cyp153* are responsible for the aerobic degradation of *n*-alkanes of petroleum and petroleum products. To prove the usage of *n*-alkanes from oil and petroleum products by hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from aviation kerosene TC-1 and automobile gasoline AI-95, the detection of the key genes *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* and *Cyp153* encoding alkanmonoxygenases *AlkB* and *Cyp153* (responsible for the oxidation of hydrocarbons with a certain chain length) was carried out. It was found that epy bacterial strains isolated from TS-1 jet fuel, except *Deinococcus* sp. Bi7, had at least one of the studied *n*-alkane degradation genes. The strains *Sphingobacterium multivorum* Bi2; *Alcaligenes faecalis* Bi3; *Rhodococcus* sp. Bi4; *Sphingobacterium* sp. Bi5; *Rhodococcus erythropolis* Bi6 contained the *alkB* gene. In the strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from

gasoline AI-95, this alkanmonoxygenase gene was not detected. Using the real-time PCR method, the activity of the *alkB* gene in all bacterial strains isolated from petroleum products was analyzed and the number of its copies was determined. By real-time PCR using a primer with a different sequence of nucleotides to detect the *alkB* gene, its activity was established in all bacterial strains isolated from gasoline AI-95; besides, the strain *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 was assigned to the group with a high level of its activity (1290 copies/ml). According to the assessment of the growth of isolated hydrocarbon-oxidizing bacteria on a solid Evans mineral medium with the addition of the model mixture of hydrocarbons, the strains were divided into three groups. The distributions of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria in the groups based on the activity of the *alkB* gene and groups formed based on the growth ability and use of the model mixture of hydrocarbons and petroleum products were found to be consistent. The results obtained indicate that we need to use a complex of molecular and physiological methods for a comprehensive analysis of the distribution of the studied genes in bacteria and to assess their activity in the strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria capable of biodegradation of petroleum hydrocarbons.

Key words: biodamage; petroleum products; hydrocarbon-oxidizing bacteria; biodegradation; alkanmonoxygenase; *alkB* gene; real-time PCR.

For citation: Shapiro T.N., Manucharova N.A., Lobakova E.S. Activity of alkanmonoxygenase *alkB* gene in strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from petroleum products. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):575-582. DOI 10.18699/VJGB-22-70

Введение

Нефтепродукты представляют собой основной источник энергии в хозяйственной деятельности и жизни человека. Данные о биологическом загрязнении нефтепродуктов и в первую очередь различных видов топлива, особенно авиационного керосина, в последнее время в открытой печати существенно расширились (Martin-Sanchez et al., 2018). Прямые и косвенные потери от микробиологической коррозии нефтепродуктов в промышленно развитых странах составляют от 2 до 5 % годового валового внутреннего продукта (Каримова, 2007). Исследование способности штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов, к использованию *n*-алканов, имеет важное значение как для защиты нефтепродуктов от повреждения, так и для применения при утилизации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в акваториях и на суше (Dedov et al., 2017). Кроме того, способность бактерий ассимилировать углеводороды нефтепродуктов может быть причиной потери их качества при транспортировке, хранении и в процессе эксплуатации техники (Martin-Sanchez et al., 2018).

Как правило, микроорганизмы способны к избирательному усвоению конкретных типов углеводов, что определяется количеством углеродных атомов в молекуле и особенностью структуры углеводорода. В природных условиях микроорганизмы образуют сообщества, в которых формируется единая цепь окисления углеводов нефти и нефтепродуктов по типу метабиоза. Каждый из микроорганизмов сообщества, обладая специфическими ферментными системами, направленными на использование определенного типа углеводов, применяет этот субстрат в своем метаболизме. Поэтому при совместном воздействии микроорганизмов сообщества происходит биодegradация не только большего количества, но и более широкого спектра углеводов нефти и нефтепродуктов (Тимергазина, Переходова, 2012).

Известно, что большинство бактериальных превращений углеводов представляют собой окислительные реакции, протекающие наиболее активно в аэробных условиях. Имеются данные о молекулярных механизмах и путях аэробной биодegradации углеводов, которые заключаются в следующем: 1) обнаружено множество много-

целевых оксигеназных систем, образующих активные комплексы с углеводородными субстратами и молекулярным кислородом; 2) охарактеризовано несколько ферментов, участвующих в начальной стадии аэробной биодegradации алканов (Coon, 2005; Funhoff et al., 2006; Van Beilen, Funhoff, 2007); 3) метагеномный подход позволил описать новые метаболические пути дегradации углеводов, отличные от тех, которые ранее были исследованы у культивируемых чистых штаммов бактерий (Sierra-García et al., 2014), и 4) обнаружены новые флотипы генов алканмонооксигеназы (*alkB*), кодирующие алканмонооксигеназы, встречающиеся в морских экосистемах (Wasmund et al., 2009; Smith et al., 2013).

Аэробная дегradация алканов может осуществляться двумя основными типами ферментов: алканмонооксигеназой AlkB (известной также как алкангидроксилаза) и некоторыми системами цитохрома P450 (Van Beilen et al., 2006), обнаруженными у бактерий родов *Pseudomonas* (Johnson, Hyman, 2006), *Rhodococcus* (Sameshima et al., 2008), *Acinetobacter* (Throne-Holst et al., 2007), *Alcanivorax* (Liu, Shao, 2005), *Burkholderia* (Mohanty, Mukherji, 2008), *Geobacillus* (Vomberg, Klinner, 2000) и *Gordonia* (Kato et al., 2009). Гены, кодирующие протеиновый комплекс алканмонооксигеназы CYP 153 P450, были исследованы несколькими учеными (Whyte et al., 1998; Smits et al., 1999; Kloos et al., 2006; Powell et al., 2006). Предложены молекулярные методы их идентификации не только в чистых культурах, но также на уровне микробного сообщества (Wang et al., 2010).

Однако регуляция экспрессии генов, кодирующих пути дегradации алканов, до настоящего времени имеет много нерешенных вопросов в связи с тем, что во многих случаях в этих процессах также участвуют гены центрального клеточного метаболизма (Paisse et al., 2011). Кроме того, так как эти гены и их продукты являются адаптационными, многие из них зачастую находятся в плазидах, что может способствовать их вариабельности и горизонтальному переносу (Коршунова и др., 2011).

Семейство цитохрома P450 Cyp153 – это тип алканмонооксигеназ, используемых для дегradации коротко- и среднепечочных *n*-алканов, обычно они встречаются у углеводородокисляющих бактерий, лишенных моноокси-

геназ *AlkB* (Van Beilen, Funhoff, 2007). Системы, активируемые кислородом, не имеющие этого цитохрома, характерны для прокариот и образованы другой интегральной мембраносвязанной монооксигеназой, кодируемой у большинства бактерий геном *alkB*, и электрон-транспортными белками, такими как рубредоксин и НАДН-зависимая редуктаза, кодируемыми генами *alkG* и *alkT* соответственно (Van Beilen et al., 2006; Carpelletti et al., 2011). Монооксигеназа *AlkB* выявлена у бактерий различных систематических групп и используется ими для реакций окисления *n*-алканов с длиной цепи до C₁₆ (Wasmund et al., 2009). Так, *Alk*-подобные гены исследованы у грамположительных бактерий родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Praserella* (Andreoni et al., 2000; Vomberg, Klinner, 2000; Van Beilen et al., 2002; Whyte et al., 2002).

Для подтверждения наличия конкретной системы окисления *n*-алканов и степени гомологии ее последовательности с ранее изученными последовательностями гена *alkB* в основном применялся метод амплификации фрагментов гена *alkB* с использованием специфичных праймеров к этому гену. Только для отдельных штаммов были проведены исследования на предмет генетической и структурной организации систем окисления *n*-алканов, регуляции их генов и спектра утилизируемых субстратов. Следует учитывать, что каждый микроорганизм имеет определенный набор индуцибельных оксигеназных систем, и способность деградировать некоторые углеводороды зависит от экспрессии соответствующих оксигеназ (Redmond et al., 2010).

Детекция и определение активности ключевых генов, ответственных за окисление определенных видов углеводородов в нефти и нефтепродуктах, являются прямым доказательством использования углеводородокисляющими бактериями углеводородов, а также могут служить мерой оценки метаболической активности конкретного микроорганизма.

Целью работы была детекция у штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из образцов реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95, генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы *AlkB* и *Cyp153*, и изучение активности гена *alkB* методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Объекты исследования. В работе использовали 13 штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 (Shapiro et al., 2021). Нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента гена 16S рРНК выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий депонированы в международной базе данных Genbank (табл. 1). Штаммы бактерий хранятся в коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Поддержание культур проводили на плотной органической среде Rich, содержащей пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и глюкозу (Лысак и др., 2003), проверку роста выделенных штаммов в присутствии нефтепродуктов выполняли на минеральной среде Эван-

Таблица 1. Штаммы углеводородокисляющих бактерий, выделенные из образцов нефтепродуктов

Вид нефте-продукта	Штамм бактерии	Genbank ID
ТС-1	<i>Sphingobacterium multivorum</i> Bi2	MG812313.1
	<i>Alcaligenes faecalis</i> Bi3	MG812316.1
	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi4	MK951703
	<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi5	MK968142
	<i>R. erythropolis</i> Bi6	MG871403.1
	<i>Deinococcus</i> sp. Bi7	MG812379.1
	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi10	MG871414.1
	<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi8	MK968144
	<i>S. mizutaii</i> Bi9	MK968143
	АИ-95	<i>Paenibacillus agaridevorans</i> Bi11
<i>Bacillus pumilus</i> Bi12		MK951709
<i>B. safensis</i> Bi13		MK951740
<i>Bacillus</i> sp. Bi14		MK951752

са (Evans et al., 1970) с добавлением углеводов в качестве единственного источника углерода.

Выделение бактериальной ДНК. Выделение ДНК проводили после 7 сут культивирования штаммов углеводородокисляющих бактерий на среде Rich. Для выделения бактериальной ДНК использовали набор Thermo Scientific™ MagJET™ Plant Genomic DNA Kit, как описано ранее (Shapiro et al., 2021).

Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на среде с модельными углеводородами. Сравнение роста выделенных культур углеводородокисляющих бактерий в присутствии углеводов проводили по методу М.В. Журиной с коллегами (2008). В агаризованную среду ЭМ, содержащую 1.96 % об. смеси углеводов № 1 (C₁₅H₃₂, C₁₆H₃₄, C₁₈H₃₈ и C₉H₁₂-псевдокумол), вносили 0.025 мкл суспензионной культуры штамма углеводородокисляющих бактерий с оптической плотностью (ОП) 0.2 и равномерно распределяли по поверхности чашки шпателем. Через 7 сут выросшие колонии микроорганизмов смывали раствором 1 % NaCl двумя порциями по 5 мл. В объединенной пробе измеряли оптическую плотность полученной суспензии клеток с помощью ФЭК КФК-2-УХЛ 4.2 при λ = 540 нм и толщине оптического слоя l = 10 мм.

Детекция генов алканмонооксигеназ *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*. Для получения целевых продуктов генов, кодирующих различные алканмонооксигеназы (Kohno et al., 2002; Иванова и др., 2014) (последовательности использованных праймеров указаны в табл. 2), с геномной ДНК выделенных штаммов проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со следующими температурно-временными параметрами: начальная инициация – 94 °С × 3 мин, последующие 35 циклов – 94 °С × 30 с, 55 °С (*Cyp153*) или 60 °С (*alkB*) × 40 с, 72 °С – 1 мин; конечная полимеризация – 72 °С × 7 мин (Иванова и др., 2014). Для генов *Alk 1-3* ПЦР выполняли в следующем режиме: начальная инициация – 94 °С × 3 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 60 с, 40 °С × 30 с, 72 °С – 30 с; конечная полимеризация – 72 °С × 7 мин (Kohno et al., 2002).

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient DNA amplifier (Eppendorf, Германия). Объем ам-

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для детекции генов *alkB*, *Alk1*, *Alk2*, *Alk3* и *Cyp153*, кодирующих алканмонооксигеназы

Детектируемый ген	Последовательность, 5'→3'	Длина ПЦР-фрагмента, п. н.	Литературный источник
<i>Cyp153</i>	F-GATCCGCTCGCGTGTC R-GGGAGTGAGGCGAACCA	870	Иванова и др., 2014
<i>alkB</i>	F-AGAACSCRCSSGAYGAGG R-ATRTCRCGTCRTAGTGC	960	
<i>Alk1</i>	F-CATAATAAAGGGCATCACCGT R-GATTCATCTCGAAACTCCAAAC	185	Kohno et al., 2002
<i>Alk2</i>	F-GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA R-TTGTATTATCCAACTATGCTC	271	
<i>Alk3</i>	F-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA R-CCGTAGTGCTGACGTAGTT	330	

плификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 10 мкл 1× Taq-полимеразного буфера («Евроген», Россия), по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 1 мкл ДНК соответствующего образца и 37 мкл воды. Результаты амплификации регистрировали с помощью электрофореза. Очистку ПЦР-продукта проводили единым способом и для бактериальной, и для микромицетной ДНК с помощью набора Cleanup Standard («Евроген»).

ПЦР в реальном времени. Для количественного анализа числа копий ДНК, содержащих функциональный ген *alkB*, отвечающий за деградацию *n*-алканов, применяли метод ПЦР в реальном времени. Измерение проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 («ДНК-Технология», Россия) после 7 сут культивирования штаммов углеводородокисляющих бактерий на среде Rich (Лысак и др., 2003) по методике, описанной в работе (Manucharova et al., 2021). Последовательности праймеров, используемых для выявления штаммов углеводородокисляющих бактерий, обладающих функциональным геном *alkB*, – F(TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATC TGG), R(CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG) (Whyte et al., 2002).

Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах, и определение матрицы ДНК проводили при наличии трех стандартов и отрицательного контроля (образца без матрицы ДНК).

Результаты и обсуждение

Ранее в загрязненных образцах нефтепродуктов (реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95) были выделены, идентифицированы и охарактеризованы штаммы углеводородокисляющих бактерий (Shapiro et al., 2021). В данном исследовании использовали 9 штаммов углеводородокисляющих бактерий, изолированных из топлива ТС-1, и 4 штамма – из бензина АИ-95.

Все указанные штаммы углеводородокисляющих бактерий были изучены на наличие генов, кодирующих алканмонооксигеназы: *alkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk2* и *Alk3* (табл. 3). Ген *Alk1* кодирует алканмонооксигеназу AlkВ, катализирующую реакции терминального окисления *n*-алканов с длиной цепи C₆–C₁₂ у бактерий, относящихся к роду *Pseudomonas*. Ген *Alk2* кодирует у представителей рода *Acinetobacter* алканмонооксигеназу AlkВ, катализирующую реакции терминального окисления *n*-алканов с дли-

ной цепи > C₁₂ с помощью монооксигеназ или диоксигеназ. Ген *Alk3* кодирует алканмонооксигеназу AlkВ, обладающую субстратной специфичностью по отношению к *n*-алканам и оксидазным системам (Kohno et al., 2002).

Установлено, что ген алканмонооксигеназы *Alk2*, характерный преимущественно для бактерий рода *Acinetobacter* (Kohno et al., 2002), отсутствует у всех исследованных штаммов бактерий. Среди штаммов, выделенных из реактивного топлива ТС-1, штамм *Deinococcus* sp. Bi7 не содержал исследованных генов алканмонооксигеназ деградации *n*-алканов. Все остальные штаммы, изолированные из топлива ТС-1, имели как минимум один из исследованных генов деградации *n*-алканов. Пять из девяти штаммов (*Sphingobacterium multivorum* Bi2, *Alcaligenes faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Rhodococcus erythropolis* Bi6) содержали ген *alkB*. У штаммов углеводородокисляющих бактерий, полученных из бензина АИ-95, данный ген алканмонооксигеназы не был детектирован (рис. 1, см. табл. 3).

У штаммов углеводородокисляющих бактерий *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4 и *R. erythropolis* Bi6 были установлены все изученные гены алканмонооксигеназ: *alkB*, *Cyp153*, *Alk1* и *Alk3*. Интересен факт наличия одновременно различных изоформ гена *alkB* и гена *Cyp153* у этих бактерий, а у штаммов *Sphingobacterium multivorum* Bi2 и *S. mizutaii* Bi9 – генов *alkB*, *Cyp153*. Согласно литературным данным, фермент *Cyp153* является типом алканмонооксигеназы, участвующей в деградации коротко- и среднецепочечных *n*-алканов у углеводородокисляющих бактерий, лишенных алканмонооксигеназ AlkВ (Van Beilen, Funhoff, 2007).

В природной нефти и нефтепродуктах *n*-алканы составляют до 88 % объема и могут служить источником энергии для микроорганизмов, способных их разлагать (Van Beilen et al., 2003; Dedov et al., 2017). Ранее была проведена детекция генов группы алканмонооксигеназ для бактериальных сообществ, выделенных из нефтепродуктов, и показана активность штаммов в отношении деградации различных углеводородов, включая *n*-алканы (Likhoshvay et al., 2014; Lomakina et al., 2014).

Гены семейства *alkB*, как правило, присутствуют в геномах как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий в нескольких вариантах (Van Beilen et al., 2003). Это согласуется с полученными нами данными о наличии

Таблица 3. Наличие исследованных генов алканмонооксигеназ окисления углеводов *alkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk2* и *Alk3* у штаммов углеводородоокисляющих бактерий, выделенных из нефтепродуктов

Штамм/ген	Bi2*	Bi3	Bi4	Bi5	Bi6	Bi7	Bi8	Bi9	Bi10	Bi11	Bi12	Bi13	Bi14
<i>alkB</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Cyp153</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Alk1</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alk3</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* Полное название штаммов приведено в табл. 1.

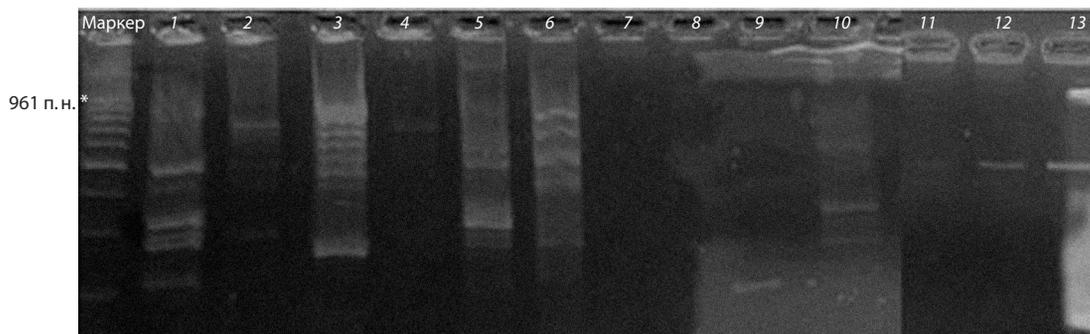


Рис. 1. Электрофорез в агарозном геле ПЦР-продукта гена *alkB*.

1 – *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2 – *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 – *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 – *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 – *Deinococcus* sp. Bi7; 7 – *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 – *Sphingobacterium mizutaii*; 9 – *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 – *Bacillus pumilus* Bi12; 11 – *Bacillus safensis* Bi13; 12 – *Bacillus* sp. Bi14; 13 – *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (100 + bp DNA Ladder). * Ожидаемая длина целого ПЦР-продукта.

нескольких генов семейства *alkB* у выделенных штаммов грамотрицательных бактерий рода *Sphingobacterium* и грамположительных – рода *Rhodococcus*.

Способность к эффективной деградации *n*-алканов у штаммов, для которых это не было описано в литературе ранее, может быть доказательством нахождения гена в плазмиде и его горизонтального переноса между членами сообщества, что показано в работе (Turova et al., 2008), где бактерии рода *Geobacillus* могли приобретать гены *alkB* от бактерий рода *Rhodococcus*.

Среди штаммов углеводородоокисляющих бактерий, выделенных из автомобильного бензина АИ-95, только у штамма *P. agaridevorans* Bi11 был детектирован ген *Cyp153*.

Данные о наличии у изученных штаммов бактерий генов семейства *alkB* только частично согласовались с данными по способности их к росту на жидких и твердых средах в присутствии 1 % *n*-алканов с разной длиной углеродной цепи (Shapiro et al., 2021). Так, штаммы *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, *Bacillus pumilus* Bi12, *Bacillus safensis* Bi13, *Bacillus* sp. Bi14, *Paenibacillus agaridevorans* Bi11 росли на модельной смеси углеводородов, содержащих в своем составе алканы с разной длиной цепи, топливе ТС-1 и нефти (рис. 2 и 3). Также были установлены способность к росту и высокая активность выделенных штаммов в отношении деградации *n*-алканов модельной смеси углеводородов при отсутствии данного гена (см. рис. 3).

Оценка роста чистых культур углеводородоокисляющих бактерий на плотной среде ЭМ с модельной смесью угле-



Рис. 2. Рост некоторых исследуемых культур на минеральной среде Эванса в присутствии реактивного топлива ТС-1 (а) и нефти (б).

Фрагмент а: 1 – *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2 – *Sphingobacterium* sp. Bi5; 3 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 – *Alcaligenes faecalis* Bi3. Фрагмент б: 1 – *Rhodococcus* sp. Bi4; 2 – *Sphingobacterium mizutaii* Bi9; 3 – *Sphingobacterium* sp. Bi8; 4 – *Deinococcus* sp. Bi7; 5 – *Rhodococcus erythropolis* Bi6.

водородов (см. рис. 3) позволила разделить штаммы по скорости роста на три группы. Такое деление предложено нами и основано на следующем: первая группа (активные культуры) – значение оптической плотности суспензии клеток после культивирования в течение 7 сут от 3 ед. и выше; вторая группа (средняя активность) – от 2 до 3 ед.; третья группа (низкая активность) – значение оптической плотности суспензии клеток менее 2 ед.

Установлено, что в наиболее активную группу штаммов, способных к использованию модельной смеси углеводородов, входили штаммы *R. erythropolis* Bi6, *Rhodo-*

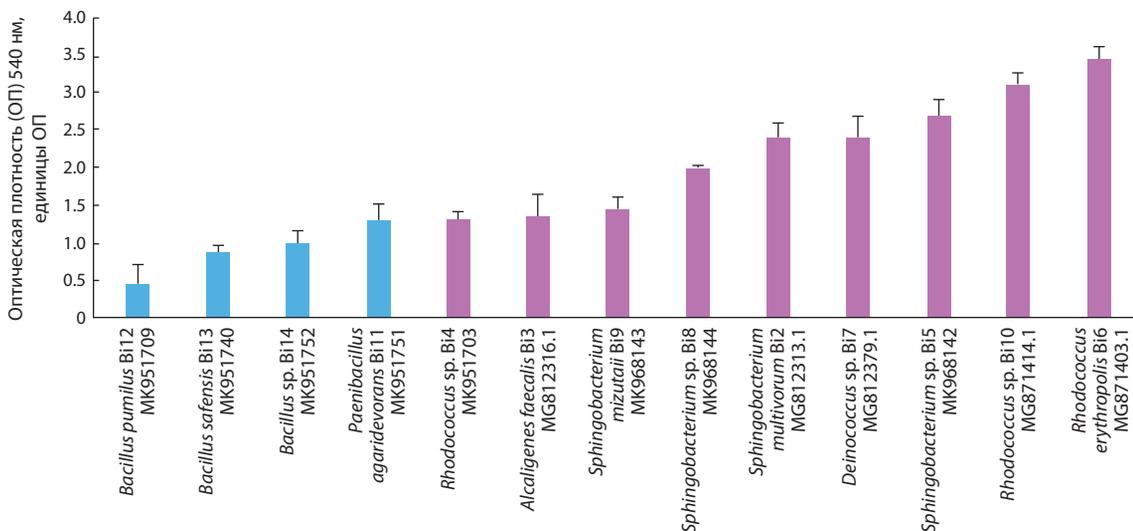


Рис. 3. Рост выделенных штаммов бактерий из автомобильного бензина АИ-95 (голубые столбцы) и реактивного топлива ТС-1 (розовые столбцы) на твердой среде со смесью углеводов № 1 в течение семи суток.

coccus sp. Bi10. Средняя скорость роста характерна для штаммов *Deinococcus* sp. Bi7, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8. При этом у штамма *Deinococcus* sp. Bi7 тестируемые гены алканмонооксигеназ не обнаружены. Медленнее всего в присутствии модельной смеси углеводов росли штаммы *Rhodococcus* sp. Bi4, *S. mizutaii* Bi9, *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *A. faecalis* Bi3 и все штаммы бактерий, выделенные из бензина АИ-95, – *Bacillus safensis* Bi13; *Bacillus* sp. Bi14, у которых ген *alkB* не был детектирован, больше чем на 80 % использовали пентадекан, октодекан и гексадекан модельной смеси углеводов (Shapiro et al., 2021). В связи с этим был проведен количественный анализ числа копий ДНК, содержащих функциональный ген алканмонооксигеназы у всех выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий. По результатам проведенного ПЦР в реальном времени установлено, что ген *alkB* присутствует и активен у всех выделенных из нефтепродуктов штаммов бактерий.

По числу копий гена все штаммы бактерий были разделены на две группы. Первая группа – с наибольшей активностью гена *alkB*, для которой значения концентрации достигали от 1290 до 8060 ДНК копий/мл, и вторая группа – значения концентрации были на порядок ниже и колебались в пределах от 10.4 до 786 ДНК копий/мл:

Первая группа	Вторая группа
<i>Alcaligenes faecalis</i> Bi3	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi4
<i>Sphingobacterium multivorum</i> Bi2	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Bi6
<i>Sphingobacterium mizutaii</i> Bi9	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi10
<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi5	<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi8
<i>Paenibacillus agaridevorans</i> Bi11	<i>Deinococcus</i> sp. Bi7
	<i>Bacillus pumilus</i> Bi12
	<i>Bacillus safensis</i> Bi13
	<i>Bacillus</i> sp. Bi14

Установлено, что все штаммы углеводородокисляющих бактерий, выделенные из бензина АИ-95, показали активность гена *alkB*, а штамм *Paenibacillus agaridevorans* Bi11

был отнесен к первой группе штаммов с высоким уровнем его активности (1290 ДНК копий/мл). Полученные результаты согласовались с данными по способности выделенных из нефтепродуктов штаммов расти (см. рис. 3) и использовать углеводороды модельной смеси углеводов (Shapiro et al., 2021). Отмечены также совпадения результатов по распределению штаммов углеводородокисляющих бактерий в группах по активности гена *alkB* (см. табл. 2) и группах, сформированных на основании их способности роста и использования модельной смеси углеводов и нефтепродуктов (Shapiro et al., 2021).

У бактерий, растущих на нефтепродуктах, включающих как коротко-, так и длинноцепочечные *n*-алканы, система их окисления включает несколько изоферментов ключевого белка алканмонооксигеназы. Выделенные из реактивного топлива ТС-1 и бензина АИ-95 штаммы бактерий-биодеструкторов способны использовать широкий спектр субстратов, что предполагает наличие у них сложной алканмонооксигеназной системы. Установлено, что у представителей разных групп микроорганизмов-деструкторов углеводов могут присутствовать несколько эволюционных вариантов ферментов алканмонооксигеназ, что требует подбора для разных углеводородокисляющих бактерий наборов праймеров, позволяющих выявление всех вариантов генов оксигеназ углеводов. В таких случаях предлагают применять несколько вариантов праймеров к различным группам изоферментов (Kohn et al., 2002; Heiss-Blanquet et al., 2005). В нашей работе задействовано два типа праймеров для детекции наличия и активности гена *alkB*. Детекция гена *alkB* с праймерами, предложенными в статье А.Е. Ивановой с коллегами (2014), показала присутствие данного гена у пяти штаммов бактерий, а с праймерами по (Whyte et al., 2002) – у всех изученных штаммов-деструкторов нефтепродуктов. Это может свидетельствовать о большей универсальности праймеров, предложенных L.G. Whyte с коллегами (2002), с одной стороны, или о присутствии специфической изоформы фермента, с другой.

Заклучение

Таким образом, методом ПЦР в реальном времени обнаружена активность гена *alkB* у всех штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95. Показано существенное количественное различие по активности этого гена у выделенных штаммов. Для штаммов, изолированных из автомобильного бензина, значения активности соответствуют физиолого-биохимическим данным о росте бактерий в присутствии модельной смеси углеводородов и эффективности их деградации (Shapiro et al., 2021). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования комплекса методов (полифазного подхода) для всесторонней оценки способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к биodeградации углеводородов нефтепродуктов, в том числе с применением молекулярных (в частности, ПЦР) и физиологических методов для анализа распространения и гомологии исследуемого гена у бактерий.

Список литературы / References

- Журина М.В., Стрелкова Е.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Влияние состава реконструированных биопленок на активность парафин-окисляющих бактерий. *Микробиология*. 2008;77(5):701-703. [Zhurina M.V., Strelkova E.A., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Effect of reconstituted biofilm composition on bacterial hydrocarbon-oxidizing activity. *Microbiology*. 2008;77(5):625-627.]
- Иванова А.Е., Сухачева М.В., Канатьева А.Ю., Кравченко И.К., Курганов А.А. Углеводородокисляющий потенциал и гены биodeградации *n*-алканов новой ацидофильной ассоциации микобактерий из серных карт. *Микробиология*. 2014;83(6):667-667. [Ivanova A.E., Kravchenko I.K., Sukhacheva M.V., Kanat'eva A.Y., Kurganov A.A. Hydrocarbon-oxidizing potential and genes for *n*-alkane biodegradation in a new acidophilic mycobacterial association from sulfur blocks. *Microbiology*. 2014;83(6):764-772.]
- Каримова С.А. Коррозия – главный враг авиации. *Наука и жизнь*. 2007;6:63-65. [Karimova S.A. Corrosion is the main enemy of aviation. *Nauka i Zhizn' = Science and Life*. 2007;6:63-65. (in Russian)]
- Коршунова А.В., Турова Т.П., Шестакова Н.М., Михайлова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция и транскрипция генов биodeградации *n*-алканов (*alkB*) в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* К. *Микробиология*. 2011;80(5):669-678. [Korshunova A.V., Tourova T.P., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Nazina T.N., Poltaraus A.B. Detection and transcription of *n*-alkane biodegradation genes (*alkB*) in the genome of a hydrocarbon-oxidizing bacterium *Geobacillus subterraneus* К. *Microbiology*. 2011;80(5):682-691.]
- Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. М.: МАКС пресс, 2003. [Lysak L.V., Dobrovolskaya T.G., Skvortsova I.N. Methods for Assessing the Bacterial Diversity of Soils and the Identification of Soil Bacteria. Moscow: MAX Press Publ., 2003. (in Russian)]
- Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами. *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. 2012;7(1):15. [Timergazina I.F., Perekhodova L.S. Biological oxidation of oil and petroleum products using hydrocarbon-oxidizing microorganisms. *Neftgazovaya Geologiya. Teoriya i Praktika = Petroleum Geology. Theoretical and Applied Studies*. 2012;7(1):15. (in Russian)]
- Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M., van Beilen J.B., Cavalca L. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN. *Environ. Microbiol.* 2000;2:572-577. DOI 10.1046/j.1462-2920.2000.00134.x.
- Cappelletti M., Fedi S., Frascari D., Ohtake H., Turner R.J., Zannoni D. Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(5):1619-1627. DOI 10.1128/AEM.01987-10.
- Coon M.J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:1-25.
- Dedov A.G., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Kashcheeva P.B., Buznik V.M., Lobakova E.S., Kirpichnikov M.P., Ishkov A.G. New materials and ecology: biocomposites for aquatic remediation. *Theor. Found. Chem. Eng.* 2017;51(4):617-630. DOI 0.1134/S0040579517040042.
- Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of micro-organisms: 2. Construction of a chemostat. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 2. London; New York: Academic Press, 1970: 277-327. DOI 10.1016/S0580-9517(08)70227-7.
- Funhoff E.G., Bauer U., Garcia-Rubio I., Witholt B., van Beilen J.B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J. Bacteriol.* 2006;188(14):5220-5227. DOI 10.1128/JB.00286-06.
- Heiss-Blanquet S., Benoit Y., Marechaux C., Monot F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99(6):1392-1403. DOI 10.1111/j.1365-2672.2005.02715.x.
- Johnson E.L., Hyman M.R. Propane and *n*-butane oxidation by *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):950-952. DOI 10.1128/AEM.72.1.950-952.2006.
- Kato T., Miyana A., Kanaya S., Morikawa M. Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):1-9. DOI 10.1186/1471-2180-9-60.
- Kloos K., Munch J.C., Schloter M. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J. Microbiol. Methods*. 2006;66(3):486-496. DOI 10.1016/j.mimet.2006.01.014.
- Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microbes Environ.* 2002;17:114-121. DOI 10.1264/jsme2.17.114.
- Likhoshvay A., Lomakina A., Grachev M. The complete *alk* sequences of *Rhodococcus erythropolis* from Lake Baikal. *Springerplus*. 2014;3(1):1-5. DOI 10.1186/2193-1801-3-621.
- Liu C., Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55(3):1181-1186. DOI 10.1099/ijso.63443-0.
- Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal. *Microbiology*. 2014;83(3):278-287. DOI 10.1134/S0026261714030126.
- Manucharova N.A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., Ksenofontova N.A., Kovalenko M.A., Stepanov A.L. Metabolically active prokaryotic complex in grassland and forests' sod-podzol under polycyclic aromatic hydrocarbon influence. *Forests*. 2021;12(8):1103. DOI 10.3390/f12081103.
- Martin-Sanchez P.M., Becker R., Gorbushina A.A., Toepel J. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2018;129:89-94. DOI 10.1016/j.ibiod.2018.01.009.
- Mohanty G., Mukherji S. Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2008;61(3):240-250. DOI 10.1016/j.ibiod.2007.06.011.
- Paisse S., Duran R., Coulon F., Goñi-Urriza M. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum bioremediation processes

- in chronically polluted coastal sediments? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;92(4):835-844. DOI 10.1016/j.ibt.2007.06.011.
- Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microb. Ecol.* 2006;52(3):523-532. DOI 10.1007/s00248-006-9131-z.
- Redmond M.C., Valentine D.L., Sessions A.L. Identification of novel methane-, ethane-, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010;76(19):6412-6422. DOI 10.1128/AEM.00271-10.
- Sameshima Y., Honda K., Kato J., Omasa T., Ohtake H. Expression of *Rhodococcus opacus alkB* genes in anhydrous organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* 2008;106(2):199-203. DOI 10.1263/jbb.106.199.
- Shapiro T.N., Lobakova E.S., Dolnikova G.A., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Burova A.A., Dedov A.G. Community of hydrocarbon-oxidizing bacteria in petroleum products on the example of TS-1 jet fuel and AI-95 gasoline. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021;57(9):949-961. DOI 10.1134/S0003683821090076.
- Sierra-García I.N., Alvarez J.C., de Vasconcellos S.P., de Souza A.P., dos Santos Neto E.V., de Oliveira V.M. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *Plos One.* 2014;9(2):E90087. DOI 10.1371/journal.pone.0090087.
- Smith C.B., Tolar B.B., Hollibaugh J.T., King G.M. Alkane hydroxylase gene (*alkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Front. Microbiol.* 2013;4:370. DOI 10.3389/fmicb.2013.00370.
- Smits T.H.M., Röthlisberger M., Witholt B., Van Beilen J.B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;1(4):307-317. DOI 10.1046/j.1462-2920.1999.00037.x.
- Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B. Identification of novel genes involved in long-chain *n*-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(10):3327-3332. DOI 10.1128/AEM.00064-07.
- Turova T.P., Nazina T.N., Mikhailova E.M., Rodionova T.A., Eki-mov A.N., Mashukova A.V., Poltarau A.B. *AlkB* homologues in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Mol. Biol. (Mosk.)* 2008;42(2):247-257.
- Van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;74(1):13-21. DOI 10.1007/s00253-006-0748-0.
- Van Beilen J.B., Funhoff E.G., van Loon A., Just A., Kaysser L., Bouza M., Witholt B. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):59-65. DOI 10.1128/AEM.72.1.59-65.2006.
- Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.* 2003;58(4):427-440. DOI 10.2516/ogst:2003026.
- Van Beilen J.B., Smits T.H., Whyte L.G., Schorch S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 2002;4(11):676-682. DOI 10.1046/j.1462-2920.2002.00355.x.
- Vomberg A., Klinner U. Distribution of *alkB* genes within *n*-alkane-degrading bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2000;89(2):339-348. DOI 10.1046/j.1365-2672.2000.01121.x.
- Wang L., Wang W., Lai Q., Shao Z. Gene diversity of CYP153A and *AlkB* alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 2010;12(5):1230-1242. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02165.x.
- Wasmund K., Burns K.A., Kurtböke D.I., Bourne D.G. Novel alkane hydroxylase gene (*alkB*) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(23):7391-7398. DOI 10.1128/AEM.01370-09.
- Whyte L.G., Hawari J., Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W.E., Greer C.W. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(7):2578-2584. DOI 10.1128/AEM.64.7.2578-2584.1998.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microb. Ecol.* 2002;41(2):141-150. DOI 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00975.x.

ORCID ID

T.N. Shapiro orcid.org/0000-0002-4005-8114
N.A. Manucharova orcid.org/0000-0002-7304-7753
E.S. Lobakova orcid.org/0000-0002-7054-0024

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта РНФ № 21-14-00076 «Разнообразие и биотехнологический потенциал почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок» и частично поддержано Междисциплинарной научно-образовательной школой Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.05.2022. После доработки 14.06.2022. Принята к публикации 07.07.2022.