

Коршунова Алена Викторовна

**РИБОСОМНЫЕ И КОДИРУЮЩИЕ БЕЛОК (*gyrB*, *alkB* и *parE*) ГЕНЫ
БАКТЕРИЙ РОДА *ГЕОВАСИЛЛУС* И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ В
ТАКСОНОМИИ И ЭКОЛОГИИ**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2014

Работа выполнена в отделе эволюционной биохимии НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители:

доктор биологических наук

Алешин Владимир Вениаминович

доктор биологических наук

Назина Тамара Николаевна

Официальные оппоненты:

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, Государственный научный центр РФ ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, заместитель директора.

Кузнецов Борис Борисович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, заместитель директора.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН)

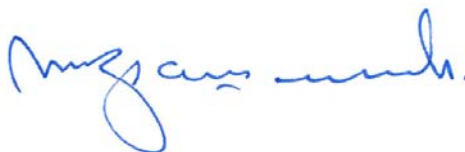
Защита состоится «17» октября 2014 г. в ____ часов __ минут на заседании Совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университета имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций) и на сайте www.bio.msu.ru.

Автореферат диссертации разослан “__”

2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Термофильные углеводородокисляющие бактерии рода *Geobacillus* являются обычными обитателями высокотемпературных нефтяных пластов (Назина, Беляев, 2004). В процессе окисления *n*-алканов нефти геобациллы образуют биосурфактанты, что обуславливает их большой биотехнологический потенциал для повышения нефтеизвлечения. Надежное обнаружение углеводородокисляющих геобацилл в микробном сообществе нефтяного пласта позволяет принимать решение о возможности применения биотехнологий повышения нефтеизвлечения, основанных на активации нефтеокисляющих бактерий. В период после первого описания рода *Geobacillus* (Nazina et al., 2001) были предложены 19 новых видов, размывающих границы существующих видов и рода. В 2010–2012 годах на основании анализа генов 16S рРНК была начата новая ревизия рода. Часть видов была перенесена в новые роды (*Aeribacillus*, *Caldibacillus*), а ряд видов объединен в подроды (Miñana-Galbis et al., 2010; Dinsdale et al., 2011; Coorevits et al., 2012). Последовательности генов 16S рРНК представителей рода *Geobacillus* очень близки, а у ряда видов эти гены не различаются. Таким образом, существует необходимость в поиске новых генетических маркеров или признаков, позволяющих осуществить внутривидовую и межвидовую дифференциацию геобацилл. Эти сведения необходимы также для обнаружения геобацилл в микробных сообществах и выявления их метаболической активности.

На настоящий момент показана возможность использования генов «домашнего хозяйства» бета-субъединиц гиразы (*gyrB*) и топоизомеразы IV (*parE*) для уточнения филогенетического положения представителей родов *Pseudomonas* (Izumi et al., 2007, Anuj et al., 2009), *Vibrio* (Luo and Hu, 2008), *Paenibacillus* (Wu et al., 2010) и др. на видовом уровне. Продукты генов *gyrB* и *parE* принимают непосредственное участие в процессе репликации ДНК и разделения дочерних клеток. Высказано предложение об использовании генов *gyrB* и *parE* для идентификации бактерий на внутри- и межвидовом уровне в качестве альтернативы метода ДНК-ДНК гибридизации (Suzuki et al., 2001, Wang et al., 2007).

Анализ генов 16S рРНК в сочетании с анализом генов дополнительных путей метаболизма является наиболее востребованным молекулярно-биологическим подходом при изучении микробных сообществ. Выбор генов в качестве дополнительного маркера во многом зависит от предполагаемого ключевого биогеохимического процесса, осуществляемого сообществом. В экосистеме заводняемых высокотемпературных нефтяных пластов особый интерес представляет процесс аэробного окисления нефти и ее компонентов. У мезофильных бактерий, деструкторов *n*-алканов, наиболее часто в качестве дополнительного гена-маркера используют ген алкан-монооксигеназы (*alkB*), ключевого фермента аэробной деградации *n*-алканов (van Beilen et al., 2005). К началу нашей работы появились первые сообщения об обнаружении у термофильных бактерий *Geobacillus thermoleovorans* 70 и *Geobacillus thermoglucosidasius* TR2 фрагментов последовательности *alkB*-гена (Sharkey et al., 2004; Marchant et al., 2006). Таким образом,

представлялся актуальным анализ генов 16S рРНК геобацилл в сочетании с генами *alkB*, кодирующими ключевые ферменты деградации *n*-алканов.

Отдельной проблемой является доказательство функциональной активности геобацилл в природном местообитании. В настоящее время метаболически активные компоненты сообщества выявляют путем применения анализа генов 16S рРНК, полученных на основе тотальной РНК сообщества (Mills et al., 2004, 2005). Обнаружена прямая корреляция между высоким количеством рРНК и метаболической активностью микроорганизма. Сравнение библиотек клонов генов 16S рРНК, созданных на основе ДНК и РНК, позволяет выявить метаболически активные группы прокариот (Mills et al., 2004, 2005; Михайлова, 2012).

В имеющихся публикациях идентификацию и детекцию геобацилл в природных образцах в основном осуществляли на основании анализа генов 16S рРНК, поскольку сведения о других рассматриваемых генах-маркерах (*gyrB*, *parE* и гены деградации углеводов) у геобацилл практически отсутствовали (Назина и соавт., 2000; 2006; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Dahle et al., 2008; Mnif et al., 2011). Таким образом, представляется актуальным исследование генов, перспективных как для идентификации и обнаружения бактерий рода *Geobacillus* в природных сообществах, так и для доказательства их метаболической активности.

Цель и задачи исследования. Целью работы является поиск и сравнительная характеристика белок-кодирующих генов бета-субъединицы гиразы, бета-субъединицы топоизомеразы IV и алкан-гидроксилазы у термофильных нефтеокисляющих бактерий рода *Geobacillus* и оценка возможности использования этих генов для определения таксономического положения геобацилл и их обнаружения в составе микробных сообществ высокотемпературных нефтяных пластов.

Для достижения цели было необходимо решить следующие задачи.

1. Определить первичную структуру генов *gyrB* и топоизомеразы IV у новых и известных штаммов бактерий рода *Geobacillus* и оценить возможность их использования для таксономии геобацилл.

2. Определить первичную структуру генов *alkB* у 11-ти штаммов, принадлежащих к роду *Geobacillus*.

3. Разработать праймеры для детекции разных алкан-гидроксилаз и исследовать разнообразие и локализацию генов *alkB* в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* штамм К, а также транскрипцию генов *alkB* в зависимости от стадии роста культуры и используемых углеводородных субстратов.

4. Определить филогенетическое разнообразие микроорганизмов в культурах термофильных углеводородокисляющих бактерий из высокотемпературных нефтяных пластов методом клонирования и секвенирования генов 16S рРНК и *alkB*, полученных на основе тотальных ДНК и РНК культур.

Научная новизна работы. Впервые определены последовательности генов бета-субъединицы гиразы и топоизомеразы IV у 18 штаммов геобацилл, и показана возможность использования этих генов для определения таксономического положения бактерий рода *Geobacillus*. В геномах 11 исследованных штаммов геобацилл выявлено от трех до семи генов алкан-гидроксилаз, из которых только два являются универсальными для всех штаммов. Показано высокое сходство нуклеотидных последовательностей генов *alkB* родов *Geobacillus* и *Rhodococcus*, что свидетельствует об отсутствии видовой специфичности генов *alkB* и не позволяет использовать их в качестве единственного маркера для определения таксономической принадлежности геобацилл в природных экосистемах. Впервые показана хромосомная локализация генов *alkB* в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* штамм К. С использованием разработанных праймеров к 8-и генам *alkB* исследована их транскрипция в зависимости от стадии роста культуры и используемых углеводородных субстратов. Выявлен высокий уровень транскрипции генов *alkB-geo5*, *alkB-geo6* и *alkB-geo4* при росте бактерии *G. subterraneus* К на *n*-алканах, что подтверждает участие белковых продуктов этих генов в деградации *n*-алканов. Определена функциональная роль трех из семи генов *alkB*. При росте на *n*-алканах с разной длиной углеродной цепи (*n*-C₁₆H₃₄ и *n*-C₂₂H₄₆) в экспоненциальной фазе обнаруживается мРНК *alkB-geo5* и *alkB-geo6*, имеющих высокий уровень сходства между собой, а в начале стационарной фазы обнаруживается мРНК *alkB-geo4*. Впервые созданы библиотеки 16S рДНК на основе ДНК и РНК культур углеводородокисляющих бактерий из нефтяных пластов. Анализ библиотеки, созданной на основе РНК, свидетельствует о доминировании геобацилл в культурах из высокотемпературных нефтяных пластов и дает более полное представление о метаболически активных группах микроорганизмов.

Практическая значимость работы. Оптимизированы условия выделения ДНК и РНК из биомассы геобацилл с последующей амплификацией генов 16S рРНК и *alkB*. Созданы праймеры для детекции разных алкан-гидроксилаз в накопительных культурах и природных образцах. Сравнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов бета-субъединицы гиразы и топоизомеразы IV рекомендован в качестве признака, альтернативного ДНК-ДНК гибридизации для внутри- и межвидовой идентификации бактерий рода *Geobacillus*.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на III-ой и V Международной молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2007, 2009), на международном симпозиуме по микробиологии подземных экосистем (ISSM 2008) (Шизуока, Япония, 2008); на Пятом Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2009); на 2-м международном симпозиуме по прикладной микробиологии и молекулярной биологии нефтяных систем (ISMOS2, Орхус, Дания, 2009), и на Международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2009» (Москва, 2009).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 обзор и 5 материалов отечественных и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты исследований и их обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Материалы диссертации изложены на 123 страницах и включают 21 рисунок и 7 таблиц. Список литературы включает 12 отечественных и 213 зарубежных наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. В работе использовали как чистые бактериальные культуры, так и пробы пластовой воды из нагнетательной скважины, переведенной на режим обратного самоизлива (проба 8 м³), и из добывающей скважины 1017-3 высокотемпературной залежи Кондиан нефтяного месторождения Даган. Пробы пластовой воды использовали в качестве посевного материала для получения накопительных культур аэробных термофильных углеводородокисляющих бактерий.

Гены бета-субъединиц гиразы и топоизомеразы IV исследовали у 18 штаммов рода *Geobacillus*. Штаммы [*G. uzenensis* U^T (DSM 13551^T = VKM B-2229^T) и X (VKM B-2228); *G. subterraneus* 34^T (DSM 13552^T = VKM B-2226^T), K и Sam; *G. gargensis* Ga^T (DSM 15378^T = VKM B-2300^T); *G. jurassicus* DS1^T (DSM 15726^T = VKM B-2301^T) и DS2; *Geobacillus* sp. vw3-1n; *Geobacillus* sp. 1024; *Geobacillus* sp. 46 и 49; *Geobacillus* sp. 3Feng] были выделены из высокотемпературных нефтяных пластов и из горячих источников сотрудниками ИНМИ РАН. Штаммы *G. stearothermophilus* DSM 22^T и *G. thermoleovorans* DSM 5366^T были получены из германской коллекции микроорганизмов, штамм *G. thermocatenulatus* VKM B-1259^T – из всероссийской коллекции. Штаммы *Geobacillus* sp. 1017; *Aeribacillus* sp. G8m выделены Д.Ш. Соколовой в ходе исследования микробного сообщества высокотемпературных нефтяных пластов:

Гены деградации *n*-алканов исследовали у бактерий *G. stearothermophilus* DSM 22^T; *G. uzenensis* U^T; *G. subterraneus* 34^T и K; *G. jurassicus* DS1^T; *G. thermocatenulatus* VKM B-1259^T; *G. gargensis* Ga^T; *G. thermoleovorans* DSM 5366^T; и у штаммов, определенных по результатам анализа генов 16S рРНК, *gyrB* и *parE* как *G. thermoglucosidarius* 3Feng; *G. toebii* B1024 и *G. toebii* vw3-1n.

В качестве хозяина для векторов, содержащих фрагменты генов-мишеней, использовали штамм *Escherichia coli* Z85 (Fermentas, Литва). Штамм поддерживали на среде LB (бакто-триптон – 10.0 г/л; дрожжевой экстракт – 5.0 г/л, NaCl – 10 г/л) с тетрациклином (12 мкг/мл). Для отбора

клонов, содержащих вектор, в среду LB дополнительно вносили ампициллин (100 мкг/мл), изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид и X-gal.

Состав сред и условия культивирования. Для выделения геномной ДНК, штаммы геобацилл выращивали на богатой среде (бакто-триптон, 5.0 г/л; дрожжевой экстракт, 2.5 г/л, pH 7.0). Для выделения РНК бактериальные культуры выращивали на минеральной среде (K_2HPO_4 – 2.0 г/л; NaH_2PO_4 – 0.5 г/л; $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 г/л; $MgSO_4 - 7H_2O$, 0.1 г/л; $CaCl_2 - 2H_2O$, 0.132 г/л; раствор микроэлементов 1 мл, pH 6.8–7.2). Субстратами служили индивидуальные *n*-алканы, ацетат калия или глюкоза (0.5–2 % об./об.). Бактерии растили в стационарном режиме при температуре 60°C.

Накопительные культуры углеводородокисляющих бактерий получали путем посева пластиковой воды на минеральную среду со смесью C_{10} – C_{22} *n*-алканов в качестве субстрата роста. Посевы инкубировали при 60°C. Третий пересев полученных накопительных культур углеводородокисляющих бактерий (обозначенных 8м3 и 1017-3) в среде с *n*-алканами использовали для выделения нуклеиновых кислот и молекулярно-биологического анализа сообщества.

Молекулярно-биологические методы. Выделение ДНК и РНК. Тотальную ДНК из культур выделяли, используя набор «DiatomtmDNAprep» (Биоком, Москва), согласно рекомендациям фирмы изготовителя с небольшими модификациями.

Тотальную РНК выделяли с использованием тризола («TRIzol Reagent», Invitrogen) согласно прилагаемой инструкции с небольшими модификациями. Полученные препараты РНК очищали от остаточной ДНК с помощью ДНКазы (Силекс, Россия), в количестве 0.5 единиц активности на реакцию. Обратную транскрипцию проводили с использованием праймеров «случайные гексамеры» и M-MLV обратной транскриптазы (Силекс, Россия).

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса с небольшими модификациями.

Полученные препараты плазмидной и геномной ДНК и тотальной РНК анализировали с помощью электрофореза в 0.8–1.0% агарозном геле. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли с помощью спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop, США) в соответствии с рекомендациями производителя

Подбор праймеров. Последовательности праймеров конструировали с использованием программ BioEdit, Lasergene v. 5.06 DNASTAR и Oligo v. 6.0. В ходе выполнения работы были сконструированы специфичные праймеры к восьми гомологам *alkB* и к последовательности гена *gyrB* штамма *G. subterraneus* К для проведения ПЦР-РВ, родоспецифические праймеры для амплификации фрагментов генов *gyrB* и *parE* бактерий рода *Geobacillus*.

Амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для амплификации фрагментов генов *alkB* использовали вырожденные олигонуклеотидные праймеры: прямой Alk-BFB (5'–GGT ACG GSC AYT TCT ACR TCG A-3') и обратный Alk-BRB (5'–CGG RTT CGC GTG

RTG RT-3'). ПЦР проводили в следующем режиме: активация полимеразы (5 мин при 94 °С); 35 циклов, включающих денатурацию ДНК (0.5 мин при 94°С), отжиг праймеров (0.5 мин при 60°С) и элонгацию (0.5 мин при 72°С); и финальную элонгацию (8 мин при 72°С).

Фрагменты генов 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 8-27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 519r (5'-G(T/A)ATTACCGCGGC(T/G)GCTG-3') (Edwards et al., 1989) при 30 циклах реакции (0.5 мин – 94°С, 0.5 мин – 50°С, 0.5 мин – 72°С).

Амплификацию гена *gyrB* проводили в 2 этапа. На первом этапе использовали вырожденные праймеры Up-1deA (5'- GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCNGGNGGNAARTTYG-3') и Up-2R(5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGTC-AT-3') (Yamamoto and Narayana, 1995) при 35 циклах реакции (0.5 мин – 94°С, 1 мин – 60°С, 1 мин – 72°С). На втором этапе проводили реамплификацию ПЦР продуктов либо с праймерами Up-1S (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3') и Up-2Sr (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3'), комплементарными 5' области вырожденных праймеров Up-1-deA и Up-2R (Yamamoto and Narayana, 1995), либо со специально сконструированными для геобацилл прямыми праймерами *gyrBs-G(gyr1-G)* (ACGGACGAACGGGTTGA(GACGGA-TGAACGGGTCTGA)) в сочетании с праймером Up-2Sr. Для избирательной амплификации гена *parE* использовали сконструированные родоспецифические праймеры top2F-geo (5'-GGNAARTTYGGNCAAGGC-3') и top1R-geo (5'-GCRTCKGTCATRATRATCACTTTGTC-3')/top3R-geo (5'-ТТТКCGGATTGCGCSMYTG-3'). ПЦР проводили по схеме: денатурация ДНК (95°С – 3 мин) и 35 циклов реакции, состоящей из денатурации (94°С – 1 мин), отжига праймеров (55°С – 1 мин) и элонгации (72°С – 1 мин). Полученные в ходе ПЦР фрагменты ДНК анализировали в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. ПЦР-продукты очищали путем переосаждения ДНК раствором этанола с 0.75 М ацетата аммония при комнатной температуре.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием «7500 Fast Real-time PCR System» (Applied Biosystems, США). Реакцию проводили в 25 мкл с использованием набора «Реалити ТМ» (ИМБ РАН, Москва), содержащего однократный ПЦР буфер и стабилизатор, 0.2 mM dNTP, 0.3 ед. Taq-полимеразы, ROX и SYBR Green в качестве красителей (ЗАО «Синтол», Россия). Амплификацию проводили в следующем режиме: денатурация ДНК (95°С – 10 мин) и 40 циклов реакции, состоящей из денатурации (95°С – 15 сек), отжига праймеров и элонгации (63°С – 1 мин). Базальный уровень порога числа циклов (Ct – threshold cycle) устанавливали по отрицательному контролю – реакции ПЦР в отсутствие матрицы.

Клонирование и секвенирование. Фрагменты генов 16S рРНК, *alkB*, *gyrB* и *parE* секвенировали напрямую с помощью соответствующих праймеров или клонировали в вектор pTZ57R/T (Fermentas, PCR Cloning Kit). Трансформацию проводили с помощью электропоратора

MicroPulser Electroporator (Bio-Rad Laboratories). Отбор трансформантов, проверка наличия вставки в векторе и ее сиквенс были проведены по стандартной методике. Секвенирование ДНК проводили на автоматическом секвенаторе «ABI 3730 DNA Analyzer», используя набор ABI PRISM BigDye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, США).

Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы Blast в базе данных NCBI GenBank, редактора BioEdit, пакета программ DNA Star и алгоритма CLUSTALW. Построение бескорневых филогенетических деревьев проводили по методу связывания ближайших соседей с помощью пакета программ TREECONW. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК, *gyrB* и *parE* геобацилл помещены в GenBank под номерами: *gyrB* – GU459227-GU459239; GU323951, GU323952; *parE* – GU459240-GU459250; GU323953, GU323954; 16S рРНК – GU459251, GU459252. Нуклеотидные последовательности генов *alkB* – под номерами EF534128-EF534180.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Определение первичной структуры генов гиразы (*gyrB*) и топоизомеразы IV (*parE*) у бактерий рода *Geobacillus*

Создание праймеров к генам *gyrB* и *parE* и их амплификация. Сравнение последовательностей генов *gyrB* из полных геномов *Geobacillus kaustophilus* HTA 426 и *G. thermodenitrificans* NG80-2 обнаружило необходимость доработки ранее предложенных праймеров Up-1 и Up2R к гену гиразы бактерий (Yamamoto and Narayama, 1995).

В результате в праймере Up-1 был удален 3'-концевой нуклеотид А. Амплификация с использованием модифицированного праймера Up1-deA дала положительный результат для 10 штаммов геобацилл. Прямое секвенирование полученных ампликонов удалось для *G. stearothermophilus* DSM 22T, *G. jurassicus* DS1^T, *Geobacillus* sp. 1017, 8m3, B1024 и vw3-1. Только для первых 4-х штаммов полученная последовательность соответствовала гену *gyrB*, а для штаммов B-1024 и vw3-1 она соответствовала гену бета-субъединицы топоизомеразы IV *parE*. Клонирование и последующий анализ ампликонов для оставшихся 4-х штаммов геобацилл обнаружили как последовательности гена *gyrB*, так и *parE* в каждой библиотеке.

Таким образом, используемые вырожденные праймеры были не всегда специфичны для гена *gyrB*, что отмечалось и ранее (Kasai et al., 1998; Watanabe et al., 2001). Для решения проблемы были разработаны и применены праймеры, избирательно специфичные к гену *gyrB* (праймер *gyrBs-G* в паре с вырожденным праймером Up-2) и гену *parE* (праймеры *top1F-geo* и *top3F-geo* в паре с *top2R-geo*) геобацилл (рис. 1). Для проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на матрице штамма *G. subterraneus* К были разработаны праймеры *gyr1-G* и *gyr2-G*, из которых прямой праймер *gyr1-G* подобран с учетом его отжига в паре с Up2R. Амплификация с

полученными праймерами дала положительный результат для всех исследуемых штаммов за исключением ПЦР с праймерами к гену *parE* на ДНК штамма 8m3.

Филогенетический анализ. Для проверки возможности использования генов *gyrB* и *parE* в качестве дополнительного инструмента в изучении видового состава геобацилл был проведен филогенетический анализ этих генов внутри рода *Geobacillus*. Филогенетические деревья, построенные по последовательностям генов *gyrB* и *parE*, сравнивали между собой и с филогенетическим деревом, основанном на последовательностях генов 16S рРНК. Были использованы как полученные в данном исследовании последовательности генов 16S рРНК, *gyrB* и *parE*, так и референтные последовательности из GenBank.

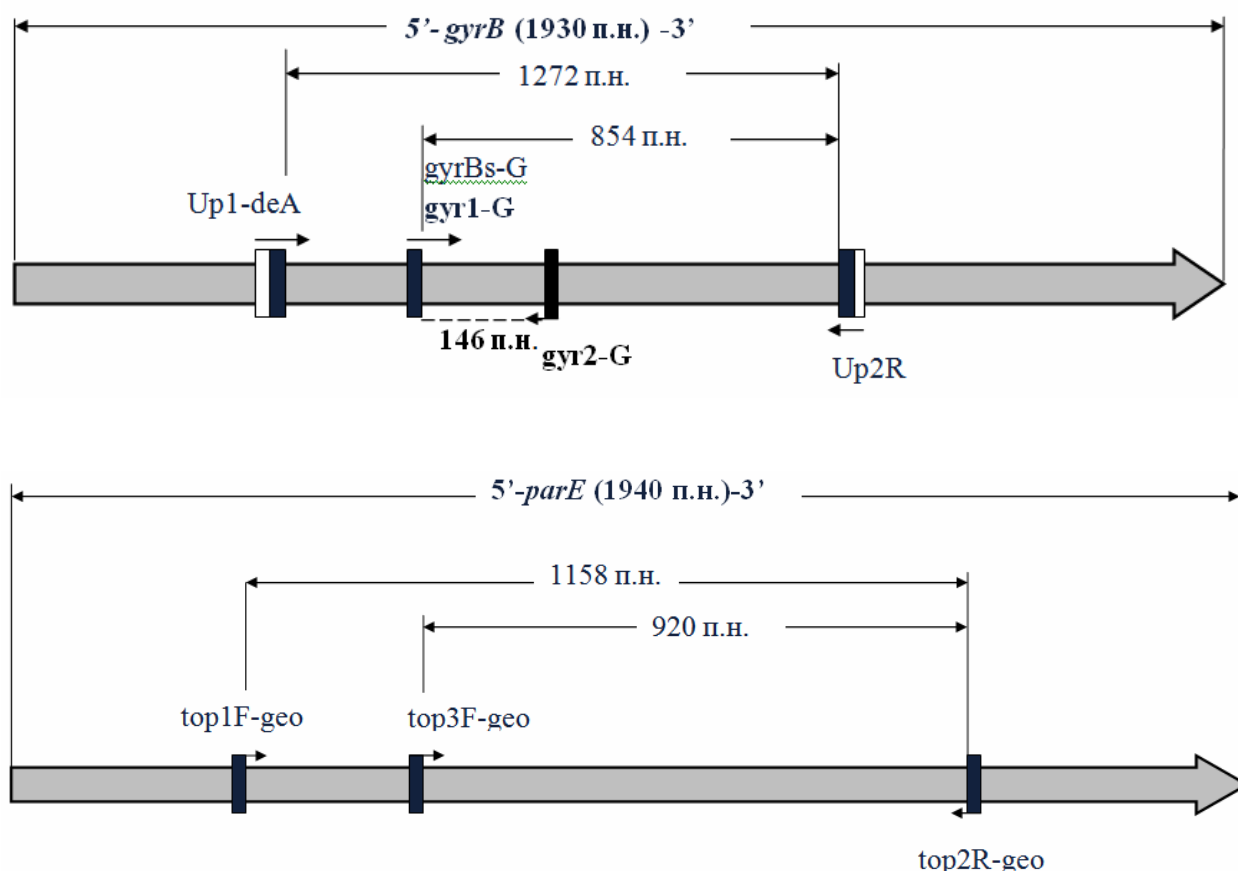


Рисунок 1. Места отжига вырожденных и специфичных праймеров для амплификации генов *gyrB* и *parE* геобацилл. Черными прямоугольниками обозначены места отжига праймеров на последовательности гена *gyrB*, белыми – 5'-концевая часть праймеров Up1-deA Up2R с искусственной последовательностью для прямого секвенирования ПЦР продукта.

Согласно филогенетическому анализу, большинство последовательностей генов 16S рРНК геобацилл попадает в I кластер, уровень межвидового сходства в котором находится в пределах 97.6–100% (рис. 2). Полученное значение сходства сравнимо с внутривидовым уровнем для геобацилл (99.8–100%), что затрудняет идентификацию видовой принадлежности внутри I кластера. При сравнении последовательностей *gyrB* разделение на кластеры соответствовало и дополняло топологию 16S рРНК-дерева. Так, I кластер достоверно (значение бутстреп-поддержки 100%) разделился на 5 подкластеров (IA-IE), внутри которых уровень сходства последовательностей (94.5–100%) был значительно выше, чем между ними (84.4–90.6%) (рис. 3а). На аналогичном *parE*-дереве структура кластера I полностью соответствовала полученной при анализе гена *gyrB* (уровень сходства последовательностей внутри подкластеров составлял 95.6–100%, между подкластерами – 86.3–93.3%) за единственным исключением: на этом дереве подкластер IA достоверно распался на два кластера – IA-1, объединивший типовые штаммы видов *G. gargensis* и *G. thermocatenulatus*, и IA-2, объединивший референтные штаммы Y412MC61, *G. kaustophilus* HTA426 и новый штамм 1017 (рис. 3б).

2.2. Идентификация представителей рода *Geobacillus* на основе сравнительного филогенетического анализа генов 16S рРНК и генов *gyrB* и топоизомеразы IV и оценка возможности использования последних для таксономии геобацилл

Филогенетические деревья, построенные на основе сравнения последовательностей *gyrB* и *parE*, дало больше информации о видовой принадлежности геобацилл, чем последовательность гена 16S рРНК. Так, штаммы *G. jurassicus* DS1^T, *G. thermocatenulans* B1259^T, *G. stearothermophilus* DSM22^T, имеющие 99% сходства генов 16S рРНК, разделились по последовательностям генов *gyrB* и *parE* на отдельные ветви кластера со сходством 86–91% и 76–85% соответственно (рис. 3). Согласно результатам анализа филогенетического сходства генов 16S рРНК штамм 3Feng был идентифицирован как представитель *G. thermoglucosidasius*, а штамм B1024 принадлежал к виду *G. toebii*. Результаты анализа последовательностей генов *gyrB* и *parE* подтвердили филогенетическую отдаленность этих штаммов от других представителей рода *Geobacillus*. Глубина различий последовательностей *gyrB* и *parE* составила 15–25% против 5%, полученных при сравнении последовательностей генов 16S рРНК этих штаммов. Основываясь на топологии *gyrB*- и *parE*-деревьев можно подтвердить предварительную идентификацию нового штамма 46, как представителя вида *G. stearothermophilus*, штамма vw3-1n – как *G. toebii* vw3-1n, референтного штамма G11MC16 – как представителя вида *G. thermodenitrificans*, а также идентифицировать новые штаммы 49 и 1017 и референтный штамм Y412MC61 как представителей вида *G. kaustophilus*.

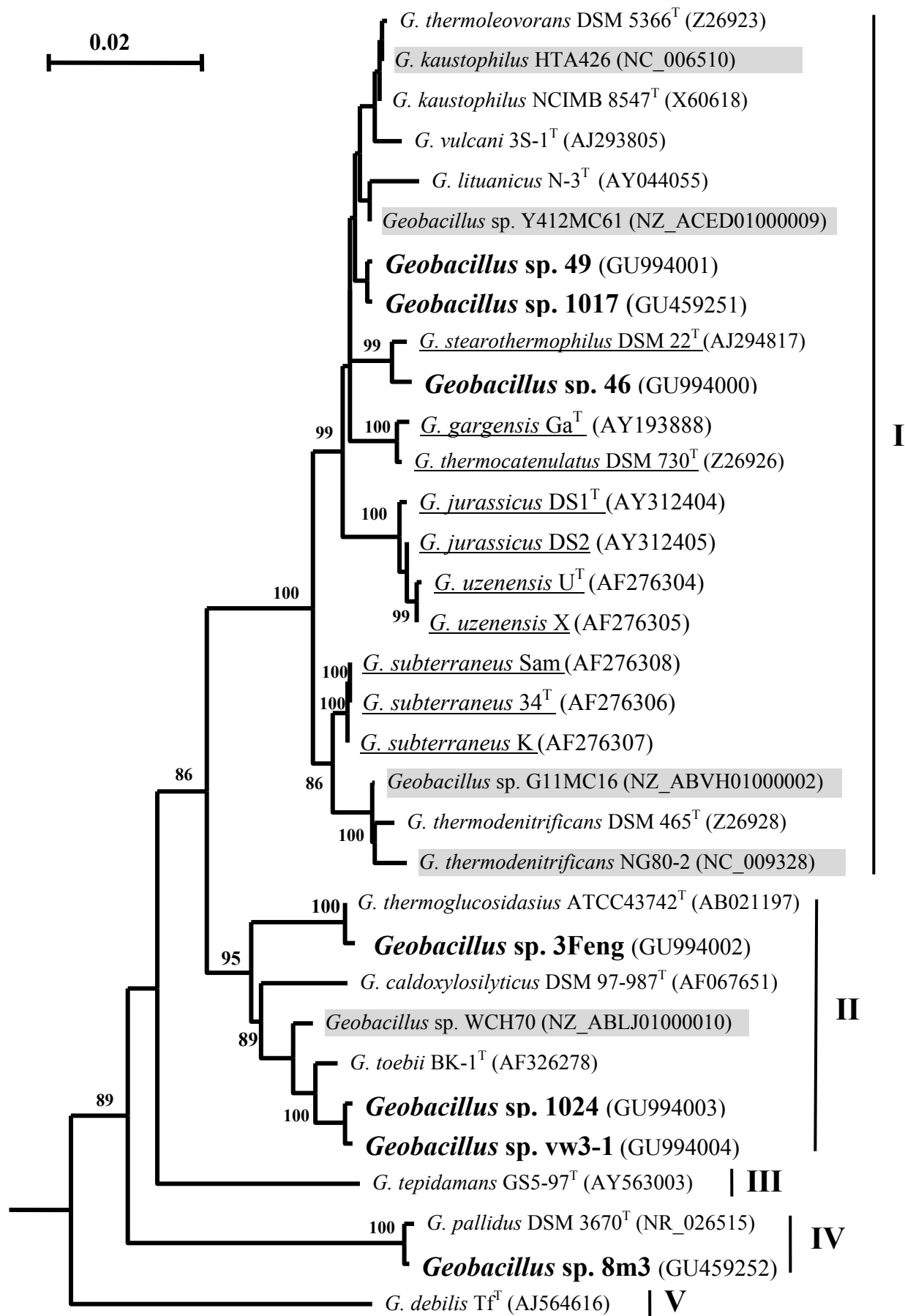


Рисунок 2. Филогенетическое дерево представителей рода *Geobacillus*, основанное на нуклеотидных последовательностях гена 16S рНК (штаммы, для которых нами определены последовательности гиразы и топоизомеразы подчеркнуты). Последовательности, определенные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Цифрами показана достоверность ветвления, определенная на основании 1000 реплик бутстреп-анализа.

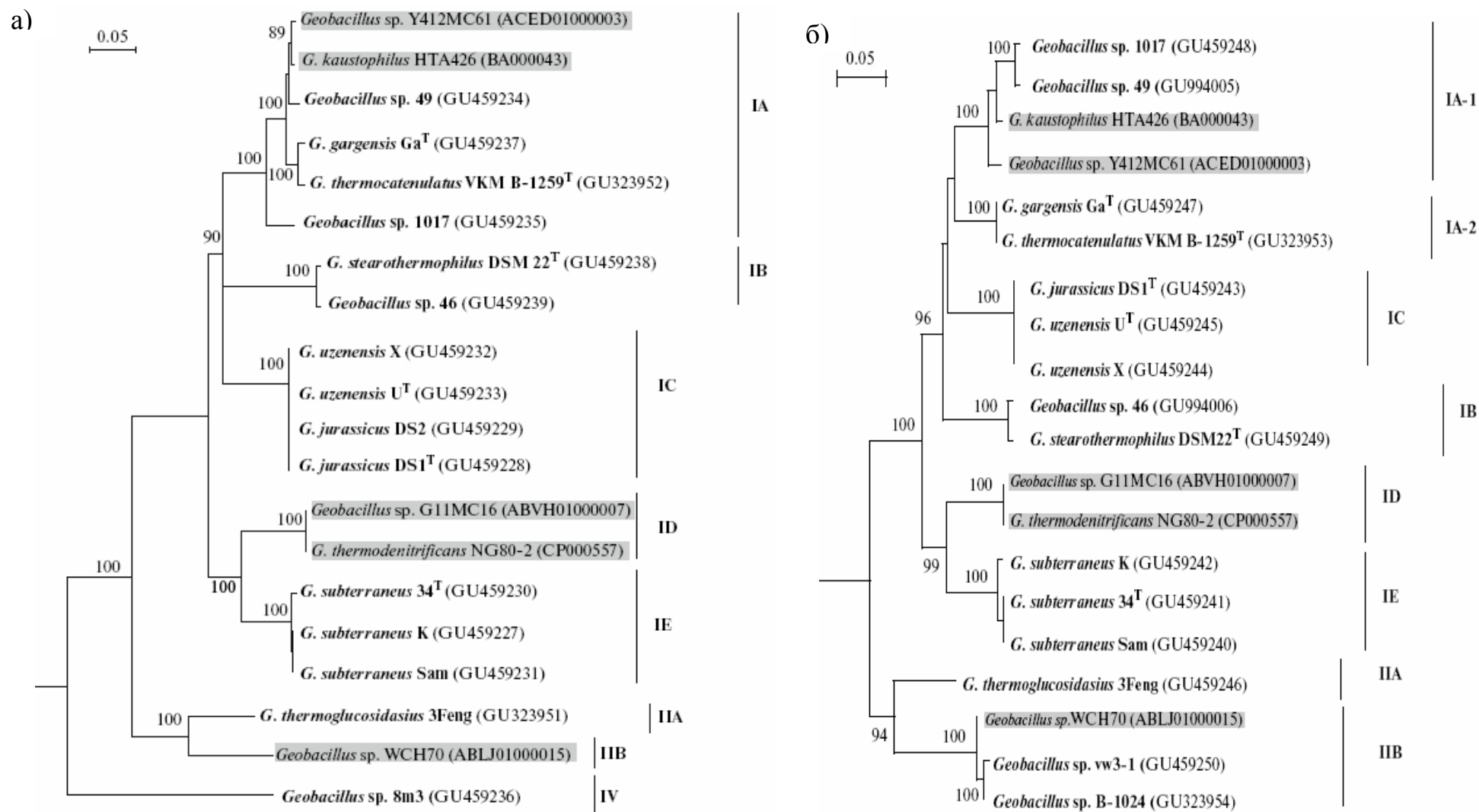


Рисунок 3. Филогенетическое дерево представителей рода *Geobacillus*, основанное на нуклеотидных последовательностях генов *gyrB* (а) и *parE* (б). Последовательности, определенные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом. Масштаб указывает количество нуклеотидных замен на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления согласно бутстреп-анализу (1000 реплик).

Филогенетическое дерево, основанное на сравнении последовательностей гена *gyrB* и *parE*, выявило необходимость уточнения видовой принадлежности штаммов *G. jurassicus* DS1^T и DS2, *G. uzenensis* X и U^T и отнесения их к одному виду. Для штаммов *G. thermocatenulans* B-1259^T и *G. gargensis* Ga^T также рекомендовано уточнить таксономическое положение.

Таким образом, сравнительный анализ последовательностей генов топоизомераз II типа – гиразы и топоизомеразы IV, свидетельствуют о возможности использования их для дифференциации видов рода *Geobacillus* в качестве филогенетических маркеров, дополняющих анализ генов 16S рРНК. Уровень генетической дистанции последовательностей генов *gyrB* и *parE* большинства видов рода *Geobacillus* значительно превышает таковой, определенный на основании сравнения генов 16S рРНК: он достигает 30% для генов *gyrB* и 25% – для генов *parE*, не опускаясь при этом ниже 10% для обоих генов. При этом топология соответствующих деревьев, хотя и коррелирует с таковой 16S-рРНК-дерева, оказывается значительно более сложной, позволяя достоверно выделить отдельные ветви (подкластеры), в значительной степени коррелирующие с видовой структурой рода *Geobacillus*.

2.3. Поиск генов ферментативной системы биodeградации *n*-алканов у бактерий рода *Geobacillus* и определение первичной структуры алкан-гидроксилаз

Настоящий этап работы проводился совместно с к.б.н. Е.М. Михайловой (ИНМИ РАН) (Турова и соавт., 2008; Назина и соавт., 2011). Осуществлен поиск генов ключевого фермента окисления *n*-алканов биodeградации углеводородов у 11 штаммов термофильных нефтеокисляющих бактерий рода *Geobacillus*. В результате амплификации с праймерами к ключевому ферменту окисления *n*-алканов – алкан-монооксигеназе (*alkB*) для всех штаммов был получен положительный результат. Сиквенс и анализ клонированных фрагментов длиной около 500 п.н. показал, что каждый штамм геобацилл содержал несколько гомологов гена *alkB*, число которых превышало 3. Всего выявлено 8 вариантов гена *alkB* геобацилл (*alkB-geo1*, *alkB-geo2*, *alkB-geo3*, *alkB-geo4*, *alkB-geo5*, *alkB-geo6*, *alkB-geo7*, *alkB-geo8*) (табл. 1). Уровень сходства между разными гомологами геобацилл составлял 59.7–96.7%.

Результаты анализа не выявили какой-либо закономерности распределения гомологов в зависимости от вида и штамма геобацилл. Схожий набор гомологов обнаружен у штаммов разных видов: гомологи *alkB-geo1-alkB-geo4* для *G. thermocatenulatus* B-1259^T, *G. stearothermophilus* DSM 22^T и *G. gargensis* Ga^T; гомологи *alkB-geo1-alkB-geo5* для *G. thermocatenulatus* 3Feng и *G. toebii* B1024. Набор гомологов у штаммов одного вида (например, у *G. subterraneus* 34^T и *G. subterraneus* K, у *G. toebii* B1024 и *G. toebii* vw3-1n) наоборот отличался. Последовательности гомологов *alkB-geo1* и *alkB-geo4* были обнаружены у всех исследованных штаммов геобацилл. Наиболее редкими оказались гомологи *alkB-geo7* и *alkB-geo8*. Гомолог *alkB-geo7* был обнаружен у 2 штаммов: *G. uzenensis* U^T и *G. toebii* vw3-1n. Гомолог *alkB-geo8* выявлен только у *G. stearothermophilus* 22^T (табл. 1).

Таблица 1. Разнообразие последовательностей гена *alkB* у бактерий рода *Geobacillus*

Гомолог генов алкан-монооксигеназы <i>alkB</i>	<i>alkB-geo1</i>	<i>alkB-geo2</i>	<i>alkB-geo3</i>	<i>alkB-geo4</i>	<i>alkB-geo5</i>	<i>alkB-geo6</i>	<i>alkB-geo7</i>	<i>alkB-geo8</i>
Ближайший ген согласно BLAST	<i>alkB4</i> (<i>Rhodococcus erythropolis</i> NRRL B-16531)	<i>alkB4</i> (<i>R. erythropolis</i> NRRL B-16531)	<i>alkB3</i> (<i>Nocardia</i> sp. H17-1)	<i>alkB3</i> (<i>R. erythropolis</i> NRRL B-16531)	<i>alkB2</i> (<i>R. erythropolis</i> 50-V)	<i>alkB2</i> (<i>R. erythropolis</i> NRRL B-16531)	<i>alkB</i> (природный клон alkG4-35k)	<i>alkB1</i> (<i>Rhodococcus</i> sp. Q15)
Сходство ДНК* (АК [§]), %	99.2 (100)	90.0(98.6)	87.3(89.7)	96.7(96.6)	95.4 (100)	99.0 (100)	69.8(71.2)	70.0(67.4)
<i>G. gargensis</i> Ga ^T	+	+	+	+				
<i>G. jurassicus</i> DS1 ^T	+		+	+	+	+		
<i>G. stearothermophilus</i> 22 ^T	+	+	+	+				+
<i>G. subterraneus</i> 34 ^T	+	+		+				
<i>G. subterraneus</i> K	+	+		+		+		
<i>G. thermocatenulatus</i> B-1259 ^T	+	+	+	+				
<i>G. thermoglucosidasius</i> 3Feng	+	+	+	+	+			
<i>G. thermoleovorans</i> 5366 ^T	+	+	+	+	+	+		
<i>G. toebii</i> B1024	+	+	+	+	+			
<i>G. toebii</i> vw3-1n	+	+	+	+	+		+	
<i>G. uzenensis</i> U ^T	+	+	+	+	+		+	

*Сходство последовательностей ДНК между ближайшим *alkB* геном из GenBank и *alkB* генами геобацилл.

§Сходство аминокислотного состава (АК) между транслированными последовательностями ближайшего *alkB* гена из GenBank и *alkB* гомологами геобацилл.

Филогенетический анализ фрагментов *alkB* генов исследованных штаммов геобацилл свидетельствовал о том, что последовательности *alkB-geo1*, *alkB-geo4* и *alkB-geo6* были практически идентичными, соответственно, *alkB4-*, *alkB3-* и *alkB2-*гомологам *Rhodococcus erythropolis* NRRL B-16531 и *Rhodococcus* sp. Q15 (Whyte et al, 2002), три другие были близки к ним, и только два наиболее редких гомолога (*alkB-geo7* и *alkB-geo8*) были уникальными. По ГЦ-составу гомологи *alkB*-генов геобацилл были также ближе к хромосомной ДНК родококков, чем к хромосомной ДНК и генам «домашнего хозяйства» (*recN* и *rpoB*) геобацилл. Это может свидетельствовать о появлении у геобацилл генов *alkB* в результате горизонтального межвидового переноса.

Исследование гомологов алкан-монооксигеназы *alkB* у *G. subterraneus* К. Для проверки гипотезы о возможном обнаружении других гомологов генов *alkB* у геобацилл при расширении выборки клонов или использовании других методов исследования, был выбран штамм *G. subterraneus* К. В результате клонирования продукта ПЦР с вырожденными праймерами к генам *alkB* штамма *G. subterraneus* К получено 95 клонов. Секвенирование и последующий филогенетический анализ фрагментов гена *alkB* клонов показал, что кроме обнаруженных ранее у штамма гомологов гена *alkB* – *alkB-geo1*, *alkB-geo2*, *alkB-geo4* и *alkB-geo6*, в геноме *G. subterraneus* К присутствуют гомологи *alkB-geo3* и *alkB-geo5*.

В параллельном эксперименте на матрице тотальной ДНК штамма К была проведена реакция ПЦР-РВ с использованием специфичных праймеров для всех 8 гомологов гена *alkB*. Реакция подтвердила присутствие в геноме *G. subterraneus* К обнаруженных среди клонированных последовательностей гомологов *alkB-geo1* – *alkB-geo6*, а также позволила выявить еще один гомолог – *alkB-geo7*. Гомолог *alkB-geo8* у штамма К не был выявлен перечисленными методами. Экспериментально показано, что геобациллы могут содержать большее число гомологов, чем было выявлено на основании первичного анализа библиотеки клонов генов *alkB*. Таким образом, увеличение количества клонов, содержащих вставку фрагментов генов *alkB*, в геномной библиотеке, и применение специфичных праймеров позволило выявить у штамма *G. subterraneus* К семь из восьми известных генов-гомологов геобацилл, вместо четырех, обнаруженных при первичном исследовании. По-видимому, аналогичный результат можно ожидать и для других штаммов геобацилл.

2.4. Локализация генов *alkB* в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* штамм К

Обнаруженное близкое родство большинства *alkB* генов-гомологов геобацилл аналогичным генам родококков позволяет предположить участие этих генов в процессах горизонтального переноса. Как известно, в процесс переноса наиболее часто вовлекаются адаптационные гены, расположенные на плаزمиде. Для определения локализации генов *alkB* в геноме *G. subterraneus* К

было проведено раздельное выделение хромосомной и плазмидной ДНК из выращенной биомассы. Показано, что штамм содержит плазмиду размером около 100 тыс. п.н. Контроль чистоты полученного препарата плазмидной ДНК осуществляли путем постановки ПЦР с праймерами к генам 16S рРНК и *gyrB*, имеющим хромосомную локализацию. Последующая амплификация фрагмента гена *alkB* с использованием вырожденных праймеров (Alk-BFB и Alk-BRB) на полученных препаратах дала положительный результат только на матрице хромосомной ДНК (данные приведены в диссертации). Полученные результаты свидетельствуют о хромосомной локализации генов *alkB* в геноме исследуемого штамма *G. subterraneus* К.

2.5. Детекция мРНК генов *alkB* у бактерии *G. subterraneus* К при росте на *n*-алканах

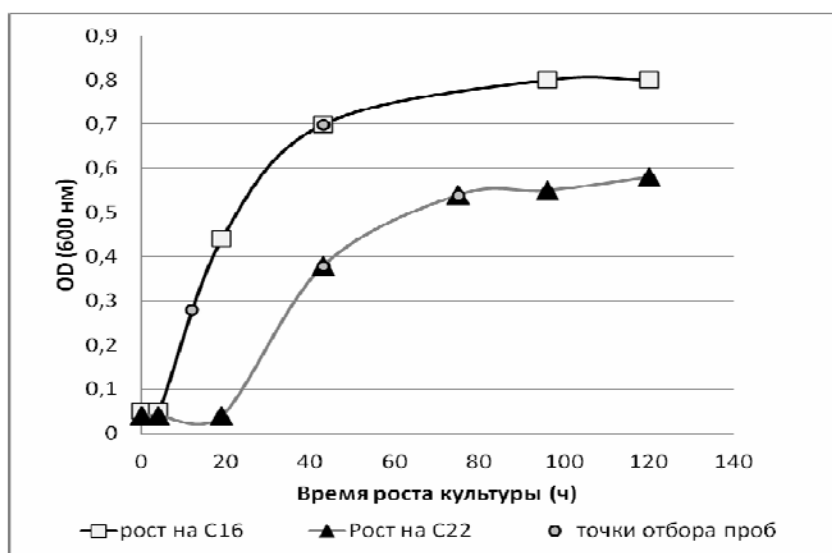
Для определения функциональной роли генов-гомологов у штамма *G. subterraneus* К, в геноме которого обнаружено 7 из 8 гомологов гена *alkB*, методом ПЦР-РВ исследовали образование матричной РНК (мРНК) гомологов при росте культуры на *n*-гексадекане ($n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$) и *n*-докозане ($n\text{-C}_{22}\text{H}_{46}$) при 60°C (рис. 4а). В качестве отрицательно контроля проводили амплификацию на кДНК из культуры *G. subterraneus* К, выращенной на глюкозе и ацетате.

В экспоненциальную фазу при росте *G. subterraneus* К на глюкозе образования мРНК не наблюдалось. Однако при росте на ацетате обнаружена мРНК гомолога *alkB-geo3*. Результаты анализа мРНК гомологов *alkB*, синтезируемых в экспоненциальную фазу при росте на *n*-алканах с разной длиной углеродной цепи (C_{16} и C_{22}), оказались идентичными. В обоих случаях наблюдалось образование мРНК гомологов *alkB-geo5* и *alkB-geo6*, а мРНК других гомологов не было обнаружено (рис. 4б).

В связи с этим было исследовано образование мРНК гомологов *alkB* штаммом К, растущим на C_{16} и C_{22} *n*-алканах в начале стационарной фазы (OD_{600} 0.71 и 0.54 соответственно). При росте на обоих субстратах в начале стационарной фазы также наблюдалось совпадение результатов: обнаруживалась мРНК одного и того же гомолога *alkB-geo4* (рис. 4в).

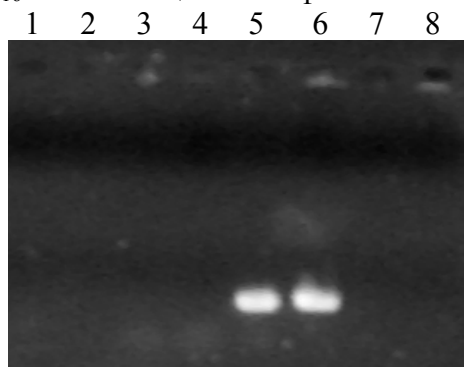
Таким образом, длина цепи исследованных окисляемых $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ и $n\text{-C}_{22}\text{H}_{46}$ *n*-алканов не влияла на дифференциальную транскрипцию генов-гомологов *alkB* у бактерии *G. subterraneus* К. Избирательная транскрипция разных гомологов *alkB* зависела от условий роста культуры. В экспоненциальной фазе роста при оптимальных условиях транскрибировались гомологи *alkB-geo5* и *alkB-geo6*, а в стационарную фазу при ухудшении условий роста транскрибировался *alkB-geo4*.

Полученные результаты позволяют судить о функциональной роли трех из восьми обнаруженных генов-гомологов *alkB* у геобацилл. Условия индукции ферментов, детерминированных не только редкими гомологами *alkB-geo7* и *alkB-geo8*, но и универсальным для всех геобацилл *alkB-geo1* и близким к нему *alkB-geo2*, остаются неизвестными. Возможно, эти варианты фермента индуцируются другими углеводородными компонентами нефти или в иных условиях роста, что нуждается в дальнейших исследованиях.



а)

б) C₁₆: экспоненциальная фаза



в) C₁₆: стационарная фаза

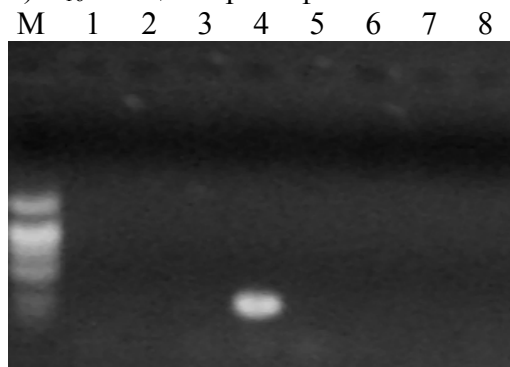


Рисунок 4. а). Кривая роста *G. subterraneus* К в средах с C₁₆H₃₄ и C₂₂H₄₆ (C₁₆; C₂₂) *n*-алканами в качестве единственного источника углерода и энергии при 60°C. б) Электрофореграммы продуктов реамплификации со специфичными праймерами к гомологам *alkB* генов геобацилл, полученных на матрице кДНК культур *G. subterraneus* К, растущих на *n*-гексадекане (C₁₆), в экспоненциальную (б) и стационарную (в) фазы роста. Условные обозначения: М – маркер молекулярного веса ДНК, 1-8 – амплификация со специфическими праймерами к гомологам *alkB-geol* – *alkB-geol8* соответственно.

2.6. Филогенетическое разнообразие генов 16S рРНК и *alkB* в библиотеках клонов, полученных на основе ДНК и РНК из накопительных культур аэробных углеводородокисляющих бактерий из высокотемпературного нефтяного пласта

Разнообразие генов 16S рРНК в библиотеках клонов накопительных культур. Настоящий этап работы проводился совместно с к.б.н. Е.М. Михайловой (ИНМИ РАН) и к.б.н. Н.М. Шестаковой (ИНМИ РАН) (Шестакова Н.М. и соавт., 2011). Накопительные культуры термофильных углеводородокисляющих бактерий из призабойной зоны нагнетательной скважины (культура 8м3) и из добывающей скважины (культура 1017-3) нефтяного месторождения Даган, полученные в среде со смесью C₁₀–C₂₂ *n*-алканов, использовали для выделения тотальной ДНК и

РНК. РНК использовали в качестве матрицы для обратной транскрипции и синтезировали первую цепь кДНК. Такой подход впервые применен для выявления метаболически активных микроорганизмов из нефтяных пластов. В призабойной зоне (проба 8 м³) нагнетательной скважины вода обогащена растворенным кислородом, температура колеблется от 40 до 60°C. В пробе из добывающей скважины (1017-3) микроорганизмы находятся в анаэробных условиях при постоянной температуре не ниже 60°C. Обе пробы пластовой воды использовали для получения накопительных культур аэробных углеводородокисляющих бактерий. Из каждой культуры на основе ДНК и РНК было создано по 2 библиотеки. Всего было проанализировано 265 клонов.

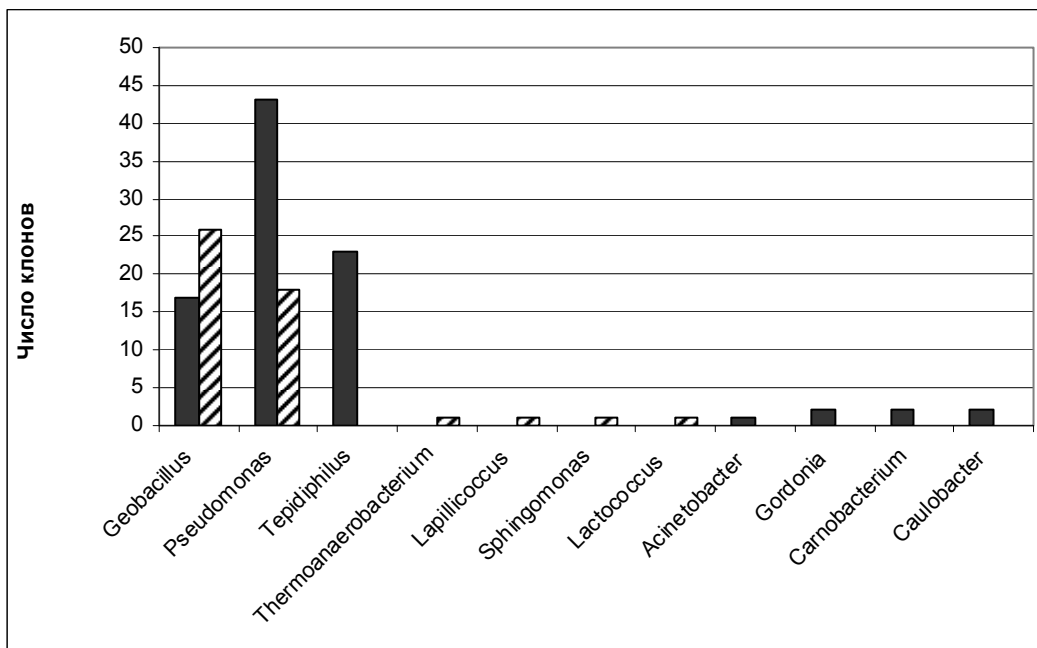
Бактериальное сообщество пластовой воды из зоны нагнетательной скважины (проба 8 м³) оказалось более разнообразным по сравнению с сообществом воды из добывающей скважины 1017-3 (рис. 5). В ДНК-библиотеке генов 16S рРНК (проба 8 м³) доминировали флотипы мезофильных бактерий рода *Pseudomonas* (почти 50% исследованных клонов) и термофильных бактерий родов *Tepidiphilus* (26%) и *Geobacillus* (19%). Однако в РНК-библиотеке численно преобладали последовательности бактерий родов *Geobacillus* (55% клонов) и *Pseudomonas* (32%), а последовательности представителей рода *Tepidiphilus*, несмотря на их высокую долю в ДНК-библиотеке, в РНК-библиотеке не обнаруживались. Минорные компоненты в ДНК-библиотеке включали гены 16S рРНК бактерий родов *Acinetobacter*, *Gordonia*, *Carnobacterium* и *Caulobacter*, а в РНК-библиотеке – *Thermoanaerobacterium*, *Lapillicoccus*, *Sphingomonas* и *Lactococcus*.

В библиотеках, созданных на основе РНК и ДНК микроорганизмов пластовой воды из добывающей скважины, большинство составляли клонированные последовательности геобацилл (98.7% и 31.0% соответственно). Доля последовательностей бактерий рода *Pseudomonas* в ДНК-библиотеке составляла 1.3%, в РНК-библиотеке – 11.3%. Минорные компоненты сообщества были обнаружены только в РНК-библиотеке и включали последовательности бактерий родов *Shigella*, *Gordonia*, *Leuconostoc*, *Williamsia* и *Methylobacterium*.

Разнообразие *alkB* генов в библиотеках клонов накопительных культур. Препараты ДНК и кДНК из обеих накопительных культур использовали в качестве матрицы для ПЦР с вырожденными праймерами для гена *alkB*. При использовании ДНК обеих культур синтез ПЦР-продуктов не наблюдали, наработка фрагментов гена *alkB* обнаружена только на матрице кДНК. Данный факт служил свидетельством того, что при росте культур 8м3 и 1017-3 на углеводородах происходит заметная экспрессия гена *alkB*. В библиотеке клонов генов *alkB* культуры 8м3 (41 клон) были обнаружены гомологи *alkB-geo2* и *alkB-geo4*, в библиотеке культуры 1017-3 (51 клон) – гомологи *alkB-geo1* и *alkB-geo4*. Сходство полученных последовательностей с аналогичными гомологами генов *alkB* составило 98–99%.

Выделение представителей родов *Geobacillus* и *Pseudomonas* из накопительных культур. Микробиологическими методами из культур выделены термофильные и мезофильные аэробные бактерии, принадлежащих согласно анализу генов 16S рРНК и *gyrB* к видам *Geobacillus*

А



Б

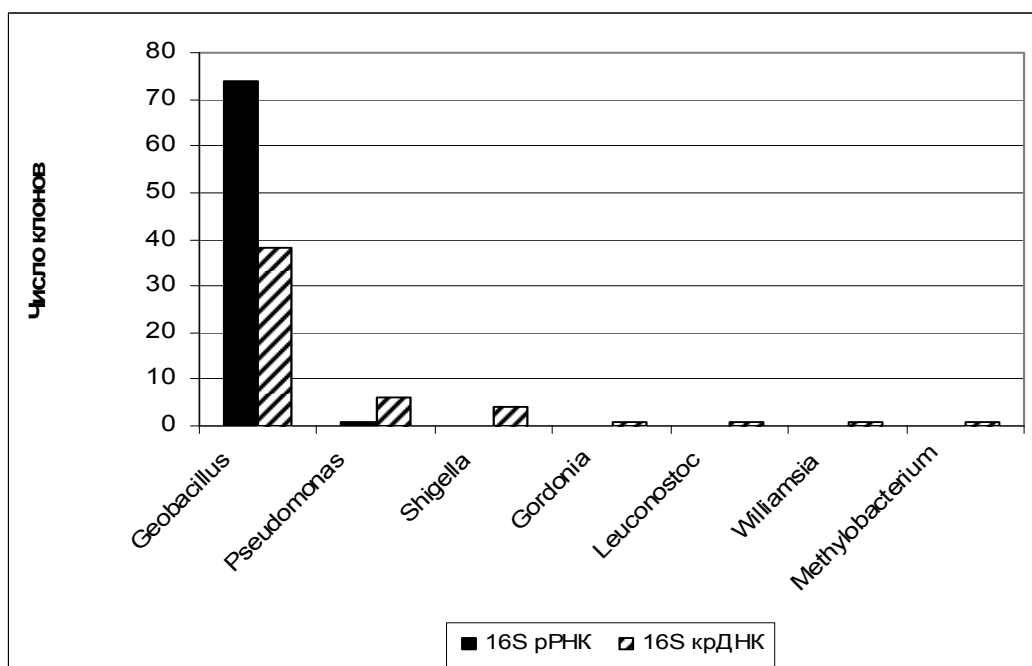


Рисунок 5. Разнообразие генов 16S рРНК и 16S крДНК в библиотеках клонов, полученных из тотальных ДНК и РНК накопительных культур углеводородокисляющих бактерий, выделенных из пластовой воды нагнетательной скважины (А) и из добывающей скважины (Б) нефтяного месторождения Даган.

stearothermophilus и *Pseudomonas putida* соответственно. Выделенные штаммы рода *Pseudomonas* росли на *n*-гексадекане в качестве единственного источника углерода и энергии при 30-37°C и не росли при 60°C. Однако амплификация с вырожденными праймерами к гену *alkB* дала отрицательный результат.

Хотя основными компонентами обеих накопительных культур являются геобациллы и псевдомонады, обнаружение транскриптов генов *alkB* и доминирование доли 16S рРНК бактерий рода *Geobacillus* указывает на геобацилл как наиболее вероятных функционально активных деструкторов углеводов в изучаемом сообществе накопительных культур. Таким образом, изучение биоразнообразия микроорганизмов методом анализа генов 16S рРНК, полученных на основе ДНК микробного сообщества, позволяет обнаружить компоненты сообщества, вероятно, предпочтительно выявляемые использованными праймерами, тогда как наиболее достоверное представление о метаболически активных микроорганизмах дает изучение генов 16S рРНК, полученных на основе РНК микробного сообщества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы проводятся интенсивные исследования экологии и биотехнологического потенциала бактерий рода *Geobacillus*. Выделен ряд новых видов геобацилл, способных образовывать термостабильные ферменты (рестриктазы, киназы, дегидрогеназы, ДНК-полимеразы и др.). Показано широкое распространение геобацилл в высокотемпературных нефтяных пластах и образование ими поверхностно-активных метаболитов. В связи с высоким сходством генов 16S рРНК у представителей разных видов геобацилл имеется ряд проблем, связанных с идентификацией геобацилл. Показано использование геобациллами сырой нефти, ароматических углеводов, в то же время гены, кодирующие алкан-монооксигеназу, ответственную за окисление *n*-алканов, оставались мало изученными. Настоящее исследование посвящено поиску генов, позволяющих прояснить вопросы таксономии геобацилл и их метаболической функции в микробном сообществе нефтяных пластов.

На примере термофильных бактерий рода *Geobacillus* выполнен анализ генов *gyrB* и *parE*. К генам *gyrB* и *parE* геобацилл были подобраны специфичные праймеры для проведения родоспецифической ПЦР и амплификации в режиме реального времени. Определена первичная структура гена β -субъединицы гиразы (*gyrB*) и гена топоизомеразы IV (*parE*) у 18 штаммов геобацилл. Показано, что филогенетический анализ последовательностей генов *gyrB* и *parE* служит полезным дополнением к анализу гена 16S РНК и ДНК-ДНК гибридизации и позволяет установить таксономическое положение бактерий рода *Geobacillus* на видовом уровне, как в чистых культурах, так и составе микробного сообщества. На основе сравнительного филогенетического анализа полученных последовательностей генов *gyrB*, *parE* и 16S рРНК у разных видов рода *Geobacillus* показано попарное сходство *G. thermocatenulatus* – *G. gargensis*, *G.*

jurassicus – *G. uzenensis*, *G. lituanicus* – *G. vulcani*, что свидетельствовало о необходимости уточнения таксономического статуса этих видов. Полученные в настоящей работе результаты обнаружения сходства генов *gyrB* и *parE* у ряда видов были использованы зарубежными исследователями (Coorevits et al., 2012) при выполнении последней ревизии рода *Geobacillus*.

У 11 штаммов геобацилл, использующих *n*-алканы, обнаружено восемь гомологов гена *alkB* ключевого фермента окисления *n*-алканов – алкан-монооксигеназы (*alkB-geo1*, *alkB-geo2*, *alkB-geo3*, *alkB-geo4*, *alkB-geo5*, *alkB-geo6*, *alkB-geo7*, *alkB-geo8*). Показано, что гены *alkB* у геобацилл локализованы на хромосомной ДНК. Гомологи гена *alkB* геобацилл не обладают видовой специфичностью. Последовательности *alkB-geo1* и *alkB-geo4* обнаружены у всех исследованных штаммов геобацилл, тогда как набор остальных гомологов варьирует у разных штаммов. В геноме *G. subterraneus* К выявлены семь гомологов гена *alkB*, за исключением *alkB-geo8*. Впервые для термофильных прокариот показано, что один штамм бактерий может содержать до семи гомологов гена алкан-гидроксилазы. Филогенетический анализ *alkB* генов геобацилл обнаружил их высокое сходство с *alkB* генами родококков: совпадение по нуклеотидной и аминокислотной последовательности для некоторых гомологов составило 100%. Таким образом, гены *alkB* геобацилл не могут служить единственным молекулярным маркером для обнаружения и идентификации бактерий рода *Geobacillus* в составе микробного сообщества.

При исследовании уровня мРНК гомологов гена *alkB* у штамма *G. subterraneus* К показано, что в деградации среднецепочечных и длинноцепочечных *n*-алканов принимают участие белковые продукты гомологов *alkB-geo4*, *alkB-geo5* и *alkB-geo6*. Гомологи *alkB-geo5* и *alkB-geo6* экспрессируются в клетке в экспоненциальной фазе при оптимальных условиях роста. Гомолог *alkB-geo4* экспрессируется в стационарной фазе при недостатке ростовых субстратов.

Впервые методом анализа двух клонотек генов 16S рРНК и 16S крДНК, созданных на основе тотальных ДНК и РНК микробного сообщества, определено геномное разнообразие микроорганизмов, и показано доминирование геобацилл в накопительных культурах термофильных углеводородокисляющих бактерий из высокотемпературных нефтяных пластов. Обнаружение среди клонированных последовательностей транскриптов *alkB*, близких *alkB-geo1*, *alkB-geo2* и *alkB-geo4* геобацилл, 16S крДНК и генов 16S рРНК бактерий рода *Geobacillus* свидетельствует о присутствии и функциональной активности геобацилл в культурах термофильных углеводородокисляющих бактерий из нефтяных пластов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на основании определения последовательностей генов β -субъединицы гиразы и топоизомеразы IV (*gyrB* и *parE*) и их филогенетического анализа у 15 штаммов бактерий рода *Geobacillus* показана возможность использования этих генов для уточнения таксономического положения геобацилл.

2. Определены фрагменты последовательностей гена *alkB* у 11 штаммов бактерий рода *Geobacillus*, растущих на C₁₆H₃₄–C₂₂H₄₆ *n*-алканах, и выявлено 8 гомологов гена *alkB*, близких по нуклеотидной и аминокислотной последовательности алкан-гидроксилазам бактерий рода *Rhodococcus*. Впервые у термофильных прокариот обнаружено, что в одном штамме может содержаться от трех до семи гомологов, из которых только два являются универсальными для исследованных штаммов геобацилл. Показана хромосомная локализация генов *alkB* в геноме штамма *G. subterraneus* К.

3. Разработаны праймеры для 8 гомологов гена *alkB* геобацилл, и определено разнообразие и функциональная роль ряда гомологов *alkB* у штамма *G. subterraneus* К. Показано, что при росте на *n*-алканах гены *alkB-geo5* и *alkB-геоб* экспрессируются в клетке в экспоненциальной фазе роста, а ген *alkB-geo4* – в стационарной фазе, что указывает на участие белковых продуктов этих генов в деградации *n*-алканов.

4. Впервые накопительные культуры углеводородокисляющих бактерий из нефтяных пластов исследованы методом анализа библиотек клонов гена 16S рРНК и *alkB*, созданных на основе ДНК и РНК. Анализ библиотек клонов генов 16S рРНК, созданных на основе РНК культур, дает более полное представление о метаболически активных микроорганизмах и свидетельствует о доминировании геобацилл в культурах аэробных углеводородокисляющих бактерий из высокотемпературных нефтяных пластов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня журналов, рекомендованных ВАК РФ:

1. Турова Т.П., Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Родионова Т.А., Екимов А.Н., **Машукова А.В.**, Полтараус А.Б. Гомологи *alkB* гена термофильных бактерий рода *Geobacillus* // Молекулярная биология. 2008. Т. 42. № 2. С. 247–257.

2. Турова Т.П., **Коршунова А.В.**, Михайлова Е.М., Соколова Д.Ш., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Применение анализа сходства нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* и *parE* для дифференциации видов рода *Geobacillus* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. С. 376–389.

3. Шестакова Н.М., **Коршунова А.В.**, Михайлова Е.М., Соколова Д.Ш., Турова Т.П., Беляев С.С., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Сравнение библиотек клонов, полученных на основе ДНК и РНК из накопительных культур аэробных углеводородокисляющих бактерий из высокотемпературного нефтяного пласта // Микробиология. 2011. Т. 80. № 1. С. 63–73.

4. **Коршунова А.В.**, Турова Т.П., Шестакова Н.М., Михайлова Е.М., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция и транскрипция генов биодegradации *n*-алканов (*alkB*) в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* штамм К // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 669–678.

5. Назина Т.Н., Михайлова Е.М., Шестакова Н.М., Соколова Д.Ш., Ивойлов В.С.,

Коршунова А.В., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Беляев С.С., Иванов М.В. Биодegradация нефти и гены *alkB* аэробных термофильных бактерий из нефтяных пластов. Труды Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН. Вып. 16. Термофильные микроорганизмы / Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Отв. редактор В.Ф. Гальченко. М.: МАКС Пресс, 2011. С. 193–216.

Тезисы докладов

1. Mikhailova E.M., Shestakova N.M., Rodionova T.A., **Mashukova A.V.**, Tourova T.P., Nazina T.N., Poltaraus A.B. Alkane hydroxylase homologues and its localization in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. In Abstract Book: 7th Int. Symp. for Subsurface Microbiology. Shizuoka, Japan, November 16-21, 2008. P. 172.

2. **Машукова А.В.**, Турова Т.П., Михайлова Е.М., Алешин В.В., Назина Т.Н., Полтараус А.Б. Использование сравнительного анализа последовательностей гена *gyrB* для видовой идентификации бактерий рода *Geobacillus*. Пятый Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Материалы Пятого Московского международного конгресса, часть 2 (Москва, 16-20 марта, 2009 г.). М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009. С. 340–341.

3. **Машукова (Коршунова) А.В.**, Турова Т. П. Михайлова Е.М., Назина Т.Н., Полтараус А. Б. Гены биодegradации углеводов у термофильных бактерий рода *Geobacillus*: строение и функции / Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Ломоносов-2009», Москва, 13-16 апреля 2009. С. 164.

4. Shestakova N.M., Mikhailova E.M., **Mashukova A.V.**, Tourova T.P., Poltaraus A.B., Nazina T.N. Alkane hydroxylase genes in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus* and in enrichment cultures of hydrocarbon-oxidizing bacteria from a high-temperature petroleum reservoir. 2nd International Conference on Applied Microbiology and Molecular Biology in Oil Systems. ISMOS² Abstract Book, 17-19th June 2009, Aarhus, Denmark. P. 80.

5. **Коршунова А.В.**, Е.М. Михайлова, Н.М. Шестакова, Д.Ш. Соколова, Т.П. Турова, А.Б. Полтараус, Т.Н. Назина. Использование рибосомных и функциональных генов в исследовании микробных сообществ высокотемпературных нефтяных пластов. Актуальные аспекты современной микробиологии: V молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Москва, 26-27 октября 2009 г.: Тезисы. – М.: МАКС Пресс, 2009. С. 86-87.

Автор выражает глубокую признательность научным руководителям д.б.н. Т.Н. Назиной и В.В. Алешину, к.б.н. А.Б. Полтараусу, д.б.н. Т.П. Туровой и к.б.н. Шестаковой за полезные советы и помощь при выполнении работы и обсуждении результатов. Автор приносит благодарность коллегам и друзьям за содействие и поддержку.