

УДК 579.252.5

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПЛАЗМИДЫ БИОСИНТЕЗА СИДЕРОФОРОВ pSID БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5AP

© 2024 г. М. И. Мандрик^{а, *}, А. А. Высоцкая^а, Ю. В. Егорова^а,
Д. В. Суржик^а, А. Ю. Ларченко^а, С. Л. Василенко^а

^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030, Беларусь

*e-mail: charnyimi@bsu.by

Поступила в редакцию 06.12.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к публикации 31.12.2023 г.

В клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в результате секвенирования полной последовательности генома выявлена плазмида pSID (CP063453.1) размером 250428 п.н. За репликацию данной плазмиды, по всей вероятности, отвечает ген *dnaB*. Гены, которые могут быть вовлечены в репликацию (*dnaB*, *ssb*) и разделение плазмид после репликации (*parA*), проявляют наибольшую степень сходства с детерминантами, расположенными на крупных (224–343 т.п.н.) плазмидах родококков: unnamed1 *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 *Rhodococcus* sp. RDE2 и pRho-VOC14-C342 *R. opacus* VOC-14. На плазмиде pSID выявлено два локуса, ответственных за синтез вторичных метаболитов, один из которых определяет синтез поликетидного соединения (сходные последовательности выявлены на плазмидах родококков), а второй — предположительно, синтез сидерофора: гены биосинтеза (*sid1–5*) данного соединения проявляют наибольшую степень сходства (не более 75%) с последовательностями бактерий *Streptomyces vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Локус плазмиды pSID, отвечающий за синтез сидерофора, имеет уникальную организацию, т.к. ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется во встречном направлении, тогда как у других бактерий он входит в состав оперона и располагается в начале или в конце. Установлено, что при инактивации гена *sid1* снижается антагонистическая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap против фитопатогенных бактерий *P. carotovorum* 2.18, снижается устойчивость к ионам железа, кадмия и арсенатам, а также появляются фитотоксические свойства в отношении редиса красного, тогда как бактерии дикого типа обладают стимулирующей рост растений активностью.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, плазмиды, сидерофоры, стимулирующая рост растений активность, антагонистическая активность, устойчивость к тяжелым металлам

DOI: 10.31857/S0026365624040034

Бактерии рода *Rhodococcus* широко известны как деструкторы органических соединений различной природы и в основном применяются в составе биопрепаратов для биоремедиации сред, загрязненных углеводородами. Такие среды характеризуются изменением физико-химических свойств почвы, нарушением состава микробиоценоза, а также растительного покрова. Результатом же биоремедиации должно стать не только разложение загрязнителя, но и восстановление всех характеристик почвы. Соответственно, наиболее перспективными будут те бактерии-деструкторы, которые не только разрушают загрязнители, но и способствуют росту растений, т.е.

обладающие рост-стимулирующими и защитными свойствами. В этом плане родококки являются привлекательными объектами природоохран-ных биотехнологий, т.к. помимо углеводородов, способны разлагать токсины, в том числе микотоксины, продуцируемые фитопатогенными грибами (Kriszt et al. 2012; Cserháti et al., 2013; Ji et al., 2016), а также продуцируют ряд соединений с рост-стимулирующей активностью по отношению к растениям и антагонистической активностью по отношению к разным группам микроорганизмов, в том числе фитопатогенным (Kundu et al., 2016; Stevens et al., 2017; Kuhl et al., 2019; Iminova et al., 2022).

Одной из важных групп соединений с антагонистической и стимулирующей рост растений активностью являются сидерофоры (Глик, Пастернак, 2002). Родококки, как и другие бактерии, продуцируют в среду различные виды сидерофоров для эффективной добычи ионов железа, входящих в состав активных центров многочисленных оксигеназ — ферментов, обеспечивающих окисление широкого спектра углеводов. На этом участие сидерофоров в биодegradативной активности не заканчивается. Показано, что они способны индуцировать возникновение в средах активных форм кислорода, которые, в свою очередь, обеспечивают окисление органических загрязнителей (Roskova et al., 2022). Сидерофоры, наряду с биосурфактантами, обеспечивают бактериям устойчивость к тяжелым металлам и металлоидам за счет неспецифического связывания с некоторыми из них (Presentato et al., 2020). Такое неспецифическое связывание играет важную роль при фитобиоремедиации загрязненных тяжелыми металлами сред, поскольку делает ионы тяжелых металлов более доступными для поглощения растениями (Saha et al., 2013). Кроме того, сидерофоры являются факторами антагонизма, обеспечивая своим продуцентам селективное преимущество в средах с дефицитом железа (Глик, Пастернак, 2002; Saha et al., 2013).

Положительное действие бактерий — продуцентов сидерофоров на растения обеспечивается за счет нескольких механизмов. Во-первых, бактериальные сидерофоры более активны по сравнению с грибными, поэтому бактерии выигрывают в конкурентной борьбе с фитопатогенными грибами в ризосфере растения (Глик, Пастернак, 2002). Во-вторых, показано, что сидерофоры способствуют выработке бактериальных ауксинов в ризосфере растения в условиях загрязнения тяжелыми металлами (Dimkra et al., 2008). В-третьих, установлено, что сидерофоры обладают элиситорным воздействием и стимулируют иммунный ответ растения (Aznar et al., 2014).

Таким образом, бактерии рода *Rhodococcus* можно рассматривать не только как деструкторов опасных поллютантов, перспективных для использования при биоремедиации и фитобиоремедиации загрязненных сред, но и как перспективных агентов для защиты растений и продуцентов ценных биологически активных метаболитов.

Способность продуцировать биологически активные соединения, так же как и способность утилизировать различные трудно разлагаемые соединения, часто определяется мобильными генетическими элементами, в частности, плазмидами.

Целью данного исследования был анализ вклада плазмиды pSID в устойчивость, антагонистическую и стимулирующую рост растений активность бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap — деструкторов углеводов нефти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ В-939 Г). Для клонирования фрагмента гена биосинтеза сидерофоров использовали суицидальный вектор pK18mob (Km^r , LacZ') (Schäfer et al., 1994). Для отбора рекомбинантных молекул ДНК и последующего их введения в клетки родококков использовали штаммы *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) и BW19851 (Metcaff et al., 1994). В качестве тест-культуры для проверки антагонистической активности использовали бактерии *Pectobacterium carotovorum* 2.18 (депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ В-1640). Для определения стимулирующих рост растений свойств использовали семена редиса красного *Raphanus sativus* L. var. *sativus* сорта Гранат. Анализируемая нуклеотидная последовательность плазмиды pSID бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap депонирована в GenBank NCBI под номером CP063453.1.

Среды и растворы. Для культивирования бактерий использовали пептонно-дрожжевую среду (жидкую — ПДБ: пептон — 10 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, NaCl — 8 г/л, pH 7.0–7.2; плотную — ПДА — добавляли агар бактериологический — 7 или 15 г/л); среду Мейнелла с 2% мелассой (Мейнелл, Мейнелл, 1967), плотную минеральную среду М9 (Миллер, 1976) с добавлением глюкозы (0.2%), суццината (0.2%) или нафталена (пары) в качестве единственного источника углерода. Для проращивания семян растений использовали 1% водный агар (агар бактериологический — 10 г/л).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) тяжелых металлов и металлоидов. Исследуемые бактерии культивировали в среде ПДБ с аэрацией (140 об./мин) в течение 24 ч при 28°C. Полученной культурой (20 мкл) инокулировали среду ПДБ (3 мл) с различными концентрациями тяжелых металлов и металлоидов, вносимых в виде солей: $NiCl_2$ (0.1; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 4; 5 ммоль/л), $ZnSO_4$ (0.5; 0.6; 0.75; 0.9; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л), $CoCl_2$ (0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.5 ммоль/л), $CuCl_2$ (0.1; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 1.6; 1.7; 1.8; 1.9; 2; 4; 6; 8; 10 ммоль/л), $CdCl_2$ (0.1; 0.2; 0.5; 0.75; 1; 1.5 ммоль/л), $Hg(NO_3)_2$ (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1 ммоль/л), $Pb(NO_3)_2$ (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л), $FeCl_3$ (0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5 ммоль/л), Na_3AsO_3 (0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 ммоль/л). Инкубировали с аэрацией (140 об./мин) в течение 48 ч при 28°C. Визуально оценивали рост культур и производили измерение OP_{600} (положительный результат регистрировали при достижении значения OP_{600} 0.2). За МИК

принимали концентрацию, следующую за той, при которой наблюдался рост.

Антагонистическую активность оценивали с помощью метода отсроченного антагонизма. На поверхность агаризованной среды (ПДА, М9 с глюкозой (0.2%), М9 с сукцинатом (0.2%) или М9 с нафталином (пары)) в чашке Петри медальонами засеивали штаммы исследуемых бактерий, культивировали при температуре 28°C в течение 48 ч. Ночную культуру фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* 2.18 выращивали с аэрацией при 28°C. В 5 мл 0.7% ПДА добавляли 100 мкл культуры фитопатогенных бактерий. Далее наслаивали 0.7% ПДА на чашку Петри с медальонами и инкубировали при температуре 28°C. Размер зоны задержки роста тест-штамма вокруг медальонов измеряли через 24 ч культивирования от края медальона до начала роста тест-культуры.

Стимулирующую рост растений активность оценивали на растениях редиса красного сорта Гранат. Ночную культуру исследуемых штаммов выращивали в среде Мейнелла при температуре 28°C в течение 24 или 48 ч. Семена редиса предварительно замачивали в течение 30 мин в культуральной жидкости каждого штамма, среде Мейнелла и воде (контроли). Помещали семена на поверхность 1% водного агара, инкубировали при комнатной температуре. Через 7 сут определяли морфометрические показатели (длина гипокотыля, длина корня).

Трансформацию *E. coli* осуществляли по методике, описанной в руководстве (Маниатис и соавт., 1984).

Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозидным методом (te Riele et al., 1986).

Выделение плазмидной ДНК. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit ("Jena Bioscience", Германия).

ПЦР проводили с использованием набора реактивов производства Thermoscientific (ЕС), ОДО "Праймтех" (РБ) и праймеров производства ОДО "Праймтех" (РБ). Реакцию проводили в объеме 25–50 мкл. Реакционная смесь содержала 1× буфер с ионами Mg^{2+} для соответствующей ДНК-полимеразы, смесь дНТФ (0.2 ммоль/л каждого нуклеотида), 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 1.25–2.5 ед. ДНК-полимеразы (Taq или Pfu).

Аmplification фрагмента плазмидного гена *sid* проводили при режимах: 95°C – 3 мин (1 цикл); 95°C – 1 мин, 57°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (30 циклов); 72°C – 5 мин (1 цикл). Использовали праймеры Sid-fw (AGGAGCAGGCCACCACTTAC) и Sid-rev (AGGAGGTTAGAGAGCGATCC), размер получаемого фрагмента составил 562 п.н.

ПЦР-анализ результатов инсерционного мутагенеза осуществляли с использованием пары праймеров M13 Forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) или M13 Reverse (GGATAACAATTTTCACACAGG)

и Sid-fw и режимов: 94°C – 5 мин; 94°C – 30 с, 48°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (5 циклов); 94°C – 30 с, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин (25 циклов); 72°C – 10 мин.

Инактивация гена *sid1* в опероне биосинтеза сидерофоров была осуществлена с помощью направленного инсерционного мутагенеза (Чернявская, 2016). Полученные на среде ПДА с рифампицином (100 мкг/мл) и канамицином (25 мкг/мкл) клоны рассеивали на среде М9 с канамицином (25 мкг/мкл) и нафталином (пары) в качестве единственного источника углерода.

Инструменты биоинформационного анализа. Для анализа нуклеотидных последовательностей и построения генетической карты использовали программу SnapGene Viewer 5.0.8 и онлайн ресурс <https://proksee.ca/> (Grant et al., 2023). Поиск фрагментов, которые были приобретены в результате горизонтального переноса, производили с помощью инструмента Alien Hunter (Vernikos, Parkhill, 2006). Для идентификации кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов использовали онлайн ресурс antiSMASH, версии 7.0.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (Blin et al., 2023). Уровень синтении генов биосинтеза сидерофора оценивали с помощью ресурса SyntTax (<https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/>) (Oberto, 2013).

Статистический анализ проводили с использованием пакета статистики MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плазмида pSID размером 250428 п.н. (рис. 1) была выявлена в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar в результате секвенирования полной последовательности генома (Мандрик и соавт., 2024).

При аннотации плазмиды pSID не было выявлено генов *rep*, кодирующих специфические белки инициации репликации. В целом, далеко не все плазмиды обладают данными генами (в частности, плазмиды тета-типа репликации групп В и Е грамотрицательных и грамположительных бактерий) (Титок, 2004). В составе репликона выявлены гены *dnaB* (INP59_27530) и *ssb* (INP59_27510), располагающиеся в пределах области размером 5265 п.н. и разделенные 3 генами, кодирующими неизвестные белки; а также единственный ген *parA* (INP59_26825), локализованный на большом расстоянии от вышеупомянутых генов.

DnaB – это хеликаза, обеспечивающая расплетение ДНК в точке начала репликации. Как правило, при репликации плазмид используется хозяйский белок DnaB, кодируемый хромосомными генами. Однако есть отдельные группы плазмид (Turner et al., 2002), несущие эти гены в своем составе. В частности, на плазмиде pQBR55 (NZ_LN713927.1) вблизи точки начала репликации локализованы два

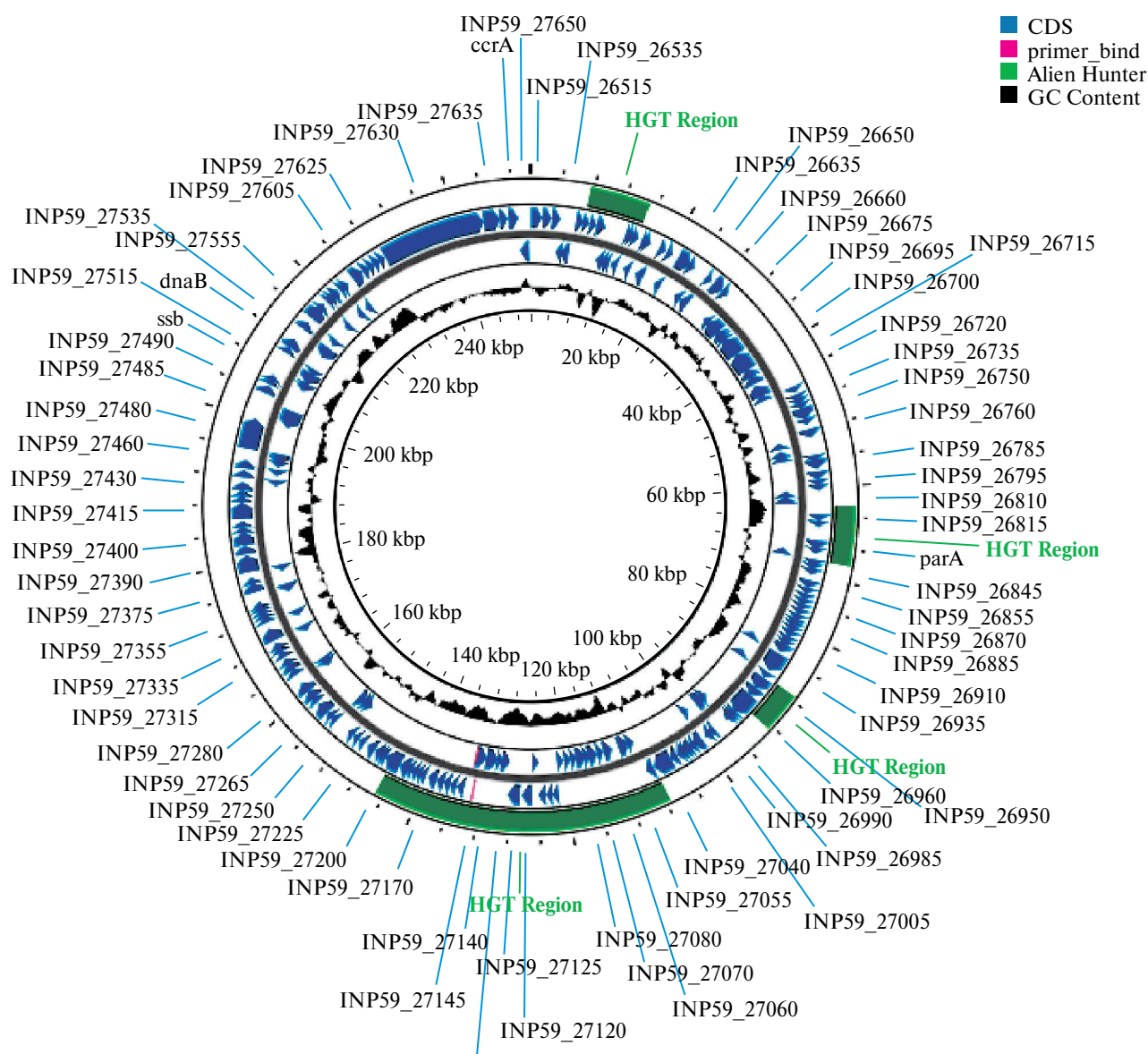


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды P_{sid}. INP — обозначение белок-кодирующих последовательностей, HGT Region — участок, который, предположительно, был привнесен в результате горизонтального переноса.

гена *dnaB* (PQBR55_RS00220 и PQBR55_RS00225). S.L. Turner et al. (2002) показали, что, по крайней мере, второй из них необходим для репликации. Белковые продукты этих генов сходны между собой на 64% (на 79% с учетом синонимичных замен). Сравнение белков DnaB, кодируемых плазмидами pSID (QOW01910.1, 441 а.к.о.) и pQBR55 (для сравнения использовали последовательность белка, участие которого в репликации было установлено экспериментально, WP_011031943.1, 464 а.к.о.), выявило сходство по аминокислотному составу 31% (46% с учетом синонимичных замен).

Известно также, что плазмидный ген *dnaB* входит в состав мини-репликона линейной плазмиды

SLP2 бактерий *Streptomyces lividans* 1326 (Ahsan, Kabir, 2013). Кодированный плазмидным геном белок DnaB (AAO61160.1, 451 а.к.о.) проявляет сходство 26% (44% с учетом синонимичных замен) с белком исследуемых бактерий, в то время как гены не обнаруживают значимого сходства.

Все вышеперечисленное дает основания предполагать, что в репликации плазмиды pSID участвует белок DnaB, а вблизи его гена можно ожидать наличие сайта начала репликации *oriV*. Поиск повторов, потенциально составляющих DnaA-боксы, вблизи гена *dnaB* не дал результатов. Однако известно, что не всем плазмидам они свойственны. В частности, у плазмид групп В и С

они отсутствуют, как и АТ-богатые области (Титок, 2002).

Выше гена *dnaB* на плазмиде pSID расположена ОРС (INP59_27525), 3'-конец которой перекрывается с 5'-концом гена *dnaB*. Сравнение их нуклеотидных последовательностей выявило сходство 90.48%, однако белковые продукты сходства не проявляют. Очевидно, в первом гене могли произойти мутации, в результате которых он утратил свою функциональность.

SSB-белки выполняют при репликации функцию стабилизации одноцепочечных участков ДНК. Обычно они кодируются хромосомными генами: сходство с хромосомным геном (INP59_23825, 519 п.н.) составляет 85.29%. В то же время на некоторых плаزمиде гены *ssb* обнаруживаются рядом с точкой начала конъюгационного переноса *oriT* (а с противоположной стороны локализованы гены *tra*), хотя их значимое участие в конъюгации не показано (Howland et al., 1989). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *ssb* плазмид pSID и ColIb-P9 (M25505.1, 528 п.н.) не выявило значимого сходства, тогда как аминокислотные последовательности белков сходны на 29.55% (47% с учетом синонимичных замен). Генов, непосредственно связанных с конъюгационным переносом плазмиды pSID, вблизи гена *ssb* не выявлено. Близкое расположение гена *ssb* к гену *dnaB* позволяет предполагать его участие в процессе репликации плазмиды pSID.

Продукт гена *parA* в клетках бактерий отвечает за разделение плазмид после репликации. Как правило, он работает в паре с белком ParB, являющимся продуктом гена, входящего в состав одного оперона с *parA*. Однако известна плаزمиды pSK1 бактерий *Staphylococcus aureus*, за распределение которой отвечает лишь один белок Par (AAF63251.1, 245 а.к.о.), ген которого расположен рядом с *rep*-геном и транскрибируется в противоположном направлении (Chan et al., 2022). Сравнение белка ParA (QOW01990.1, 384 а.к.о.) исследуемых бактерий с белком Par *S. aureus* pSK1 не выявило гомологии. Вблизи гена *parA* не выявлено ОРС, обладающих сходством с известными *rep*-генами. Сравнение последовательностей плазмидного и хромосомного (QOV96885.1, 327 а.к.о.) белков ParA выявило сходство 25% (42% с учетом синонимичных замен).

Сходные нуклеотидные последовательности генов *dnaB*, *ssb* и *parA* были выявлены только в составе плазмид бактерий рода *Rhodococcus* (табл. 1).

Причем все три гена (*dnaB*, *ssb* и *parA*) обнаруживались в составе более крупных плазмид (224–343 т.п.н.), тогда как на плазмиде меньшего размера (117–167 т.п.н.) обнаруживался только гомологичный ген *parA*. В то же время на плазмиде меньшего размера выявлены гены *parB*.

На плазмиде pRJH1, pRDE01, pRho-VOC14-C342 перед геном *dnaB*, так же как на плазмиде pSID,

Таблица 1. Сравнительный анализ систем репликации плазмиды pSID с известными

Штамм	Источник	Плаزمид	Размер (п.н.)	Номер в базе данных GeneBank NCBI	Степень сходства, %			Наличие других детерминант, связанных с репликацией и сегрегацией
					гена <i>dnaB</i>	гена <i>ssb</i>	гена <i>parA</i>	
<i>R. pyridinivorans</i> YF3	Денитрифицирующий биореактор, разлагающий хинолин, Китай	Unnamed1	337 275	CP040720.1	99.92	100.00	99.74	Не аннотирована
<i>R. rhodochrous</i> LH-B3	Загрязненная нефтепродуктами почва, Китай	Unnamed1	300 219	CP120357.1	98.57	99.80	99.74	Не аннотирована
<i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	Почва, Шеньян, Китай	pRJH1	327 914	CP050179.1	98.57	99.80	99.74	—
<i>Rhodococcus</i> sp. RDE2	Япония	pRDE01	224 658	AP025187.1	86.74	99.22	99.65	—
<i>R. oracus</i> VOC-14	Дерново-подзолистая почва, загрязненная сольвентом, Минск, Беларусь	pRho-VOC14-C342	342 121	CP130954.1	84.33	86.32	73.18	—
<i>R. oracus</i> 9	Грунтовые воды, загрязненные нитрофенолом и трихлорэтиленом, Австралия	Unnamed1	139 990	CP095405.1	—	—	73.57	<i>parB</i> (локализован далеко от <i>parA</i>)
<i>R. oracus</i> PD630	Завод в 10 км от Геттингена, Германия	pRoPD630_2	167 985	CP080956.1	—	—	73.11	<i>parB</i> (локализован далеко от <i>parA</i>)
<i>Rhodococcus</i> sp. USK10	Аллювиальные осадки, Китай	Unnamed1	117 483	CP076046.1	—	—	73.84	<i>parAB</i> (локализован рядом с отдельно стоящим <i>parA</i>)

Примечание. “—” — детерминанты не выявлено.

Таблица 2. Гены биосинтеза вторичных метаболитов

№ ОРС	Название продукта	Размер гена, п.н.	Размер белка, а.к.о.	Сходство нуклеотидной последовательности гена с известными: штамм, № в GenBank NCBI, %
Локус 1 – Биосинтез сидерофора				
INP59_27105	Аминотрансфераза IV класса	921	306	–
INP59_27110	Фосфотрансфераза	939	312	<i>Rhodococcus</i> sp. 2G plasmid p1 (CP018064.1, 74.51%)
INP59_27115	SAM-зависимая метилтрансфераза I класса	747	248	–
INP59_27120	MFS-транспортер	1347	448	<i>Nocardioides</i> sp. TF02-7 (CP092535.1, 71.28%)
INP59_27125 (sid5)	Белок биосинтеза сидерофора семейства IucA/IucC*	1692	563	<i>Streptomyces</i> sp. NBC00162 (CP102509.1, 68.86%)
INP59_27130 (sid4)	Моноксигеназа семейства SidA/IucD/PvdA**	1311	436	<i>S. ficellus</i> NRRL 8067 (CP034279.1, 75.25%)
INP59_27135 (sid3)	Ацетилтрансфераза**	555	184	<i>Streptomyces</i> sp. NBC00162 (CP102509.1, 69.89%)
INP59_27140 (sid2)	Сидерофорсинтаза*	1800	599	<i>S. vilmorinianum</i> YP1 (CP040244.1, 73.69%)
INP59_27145 (sid1)	Аминотрансфераза**	1512	503	<i>S. vilmorinianum</i> YP1 (CP040244.1, 72.95%)
INP59_27150	Альфа/бета-гидролаза**	978	325	–
INP59_27155	Гидролаза семейства HAD	687	228	–
Локус 2 – Биосинтез поликетидного соединения				
INP59_27520	Белок, содержащий SH3-домен	333	110	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плазмида unnamed1 (CP040720.1, 99.10%), <i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 99.10%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 99.10%)
INP59_27530	АТФаза семейства AAA	1326	441	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плазмида unnamed1 (CP040720.1, 99.92%)
INP59_27585	Транскрипционный регулятор, содержащий домен wHTH	312	103	<i>R. pyridinivorans</i> YF3, плазмида unnamed1 (CP040720.1, 98.72%)
INP59_27605	Субстрат-связывающий белок ABC-транспортера	1584	527	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 97.92%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 97.92%)
INP59_27610	Пермеаза ABC-транспортера	954	317	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 97.17%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 97.17%)
INP59_27615	Пермеаза ABC-транспортера	837	278	<i>Rhodococcus</i> sp. GA1 (CP097186.1, 96.65%)
INP59_27620	АТФ-связывающий белок ABC-транспортера	933	310	<i>R. rhodochrous</i> LH-B3, плазмида unnamed1 (CP120357.1, 96.46%), <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2, плазмида pRJH1 (CP050179.1, 96.46%)
INP59_27625	Белок, содержащий АТФ-связывающую кассету	783	260	–
INP59_27630	НАД(Ф)-зависимая оксидоредуктаза семейства SDR*	14484	4827	<i>R. pyridinivorans</i> P23 плазмида pB (CP113800.1, 96.25%)
INP59_27635	Белок, содержащий тиоэфирредуктазный домен**	2292	763	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.29%)
INP59_27640	Альфа/бета-гидролаза**	1074	357	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.28%)
INP59_27645	Кротонил-КоА-карбоксилаза/редуктаза**	1353	450	<i>R. pyridinivorans</i> Y6 плазмида unnamed4 (CP096039.1, 96.30%)

*Основные гены биосинтеза. **Вспомогательные гены биосинтеза.

расположена перекрывающаяся с ним рамка считывания, но не проявляющая с ним какого-либо сходства. Для плазмид бактерий *R. pyridinivorans* YF3 и *R. rhodochrous* LH-B3 такой анализ не проведен, т.к. они не аннотированы. Гены *ssb* располагаются вблизи генов *dnaB*, тогда как гены *parA* обнаруживаются в ином локусе плазмид.

Анализ генома плазмиды на наличие генов, отвечающих за синтез вторичных метаболитов, позволил выявить два локуса (табл. 2), один из которых определяет биосинтез сидерофора (121628–137136 п.н.), а второй – поликетидного соединения (209405–250428 п.н.).

Многие детерминанты локуса 2 (INP59_27520–INP59_27620), определяющие синтез поликетидного соединения, проявляют высокую степень сходства с гомологичными генами, локализованными на плаزمидах unnamed1 *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1, pRDE01 и немного меньшую с плазмидными генами pRhoVOC14-C342, для которых было установлено сходство детерминант, определяющих репликацию, конъюгацию и распределение по дочерним клеткам. Это может говорить об общем происхождении данных плазмид. В то же время основные биосинтетические детерминанты (INP59_27630–INP59_27645) проявляют наибольшую степень подобия с гомологичными генами, расположенными на других плазмидах: pB *R. pyridinivorans* P23 (CP113800.1), unnamed4 *R. pyridinivorans* Y6 (CP096039.1), unnamed2 *R. pyridinivorans* YF3 (CP040721.1).

Большой интерес представляет локус 1 (табл. 2), т.к. гены биосинтеза сидерофора проявляют наибольшую степень сходства (хотя она и не превышает 75%) с последовательностями бактерий *S. vimorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Данный локус расположен на фрагменте плазмиды, который, предположительно, приобретен в результате горизонтального переноса (рис. 1).

В локусе 1 гены *sid1–4*, по всей видимости, образуют оперон, а ген *sid5* транскрибируется во встречном направлении. Такая организация является уникальной для плазмиды pSID, т.к. у известных бактерий ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется в том же направлении и находится либо в начале, либо в конце оперона (рис. 2).

Для оценки вклада сидерофора, за синтез которого отвечает локус 1, в биологическую активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap был проведен инсерционный мутагенез первого гена в опероне – *sid1*. Полученный мутантный вариант бактерий обозначили *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid::pK18mob*.

При инактивации гена *sid1* у исследуемых бактерий снижается устойчивость к железу, кадмию и арсенатам (табл. 3). Это согласуется с данными об участии сидерофоров во внеклеточной биосорбции мышьяка, железа, свинца, цинка, кадмия и др. (Presentato, 2020).

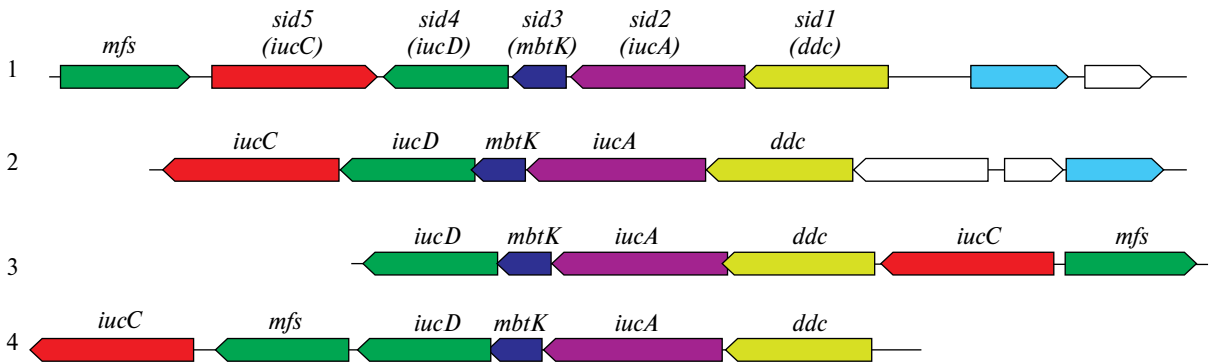


Рис. 2. Организация кластера биосинтеза сидерофоров у различных бактерий: 1 – плаزمида pSID *R. pyridinivorans* 5Ap; 2 – *Paenactinomyces guangxiensis* s-10 (NZ_JACEIQ000000000.1); 3 – *Streptomyces ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1); 4 – *Mycobacterium hansupus* mixupus (CP012109.1).

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ионов тяжелых металлов и арсената для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа и его мутантного варианта

Штамм	МИК иона, ммоль/л							
	Pb ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Fe ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	As ₂ O ₄ ²⁻
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (дикий тип)	0.15	4	<0.5	1	3	0.5	<0.05	3
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap Rif ^R <i>sid::pK18mob</i>	0.15	4	<0.5	0.5	3	0.2	<0.05	2

Таблица 4. Антагонистическая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа и мутантного варианта

Штаммы-антагонисты	Зона задержки роста тест-штамма <i>P. carotovorum</i> 2.18, мм			
	ПДА	M9 + глюкоза	M9 + сукцинат	M9 + нафталин
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (дикий тип)	19.0 ± 0.5	37.3 ± 8.0	0	0
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap Rif ^R <i>sid</i> ::pK18mob	13.3 ± 0.7*	16.0 ± 2.0*	0	0

*Значение имеет достоверное отличие ($p < 0.05$) от дикого типа.

Антагонистическая активность мутантных бактерий по отношению к фитопатогенным бактериям *P. carotovorum* 2.18 снижается (табл. 4), что говорит об антимикробной активности продуцируемого соединения.

Однако способность подавлять рост тест-штамма не исчезает полностью, что говорит либо о синтезе соединения с более низкой активностью (т.к. ген *sid1* относится к вспомогательным генам биосинтеза, а один из основных биосинтетических генов *sid5* и вовсе не входит в состав оперона), либо о синтезе других соединений с антимикробной активностью (в частности, locus 2 определяет синтез поликетидного соединения). Интересно и то, что синтез антимикробных метаболитов происходит на полноценной среде (ПДА) и минеральной среде с глюкозой, в то время как на средах с сукцинатом или нафталином бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap таких метаболитов не производят.

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap обладают стимулирующим воздействием на корни редиса красного (рис. 3), в то время как мутантный вариант *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob по какой-то причине вызывает достоверное уменьшение длины корней проростков.

На рост гипокотыля негативное влияние оказывала сама среда Мейнелла, в то время как при обработке культурой (как 24-, так и 48-часовой) бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, а также 24-часовой культурой *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob значения длины гипокотыля не отличаются от контрольных с водой. 48-часовая культура мутантных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob оказывает угнетающее, по сравнению с водой, воздействие. Вероятно, инактивация гена *sid1* приводит к образованию соединения, обладающего фитотоксичностью.

Таким образом, в результате полногеномного секвенирования в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap была выявлена плазмида pSID размером 250428 п.н. За репликацию данной плазмиды, по всей вероятности, отвечает ген *dnaB*, хотя вблизи него не выявлено характерных для *oriV* структур (повторов, DnaA-боксов, АТ-богатых участков). Гены, которые могут быть вовлечены в репликацию (*dnaB*, *ssb*) и разделение плазмид после репликации (*parA*), проявляют наибольшую степень

сходства с детерминантами, расположенными на крупных (224–343 т.п.н.) плазмидах родококков: unnamed1 *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 *Rhodococcus* sp. RDE2 и pRho-VOC14-C342 *R. opacus* VOC-14.

Плазмида pSID определяет способность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap синтезировать биологически активное соединение, обладающее антагонистической активностью против фитопатогенных бактерий *P. carotovorum* 2.18, стимулирующей рост активностью в отношении редиса красного и определяющее устойчивость к ионам железа, кадмия и арсенатам. Нарушение гена *sid1* (одного из вспомогательных биосинтетических генов, первого гена в опероне *sid1–4*) приводит к снижению антагонистической активности бактерий и появлению у них фитотоксических свойств. Гены биосинтеза (*sid1–5*) данного соединения (предположительно, сидерофора)

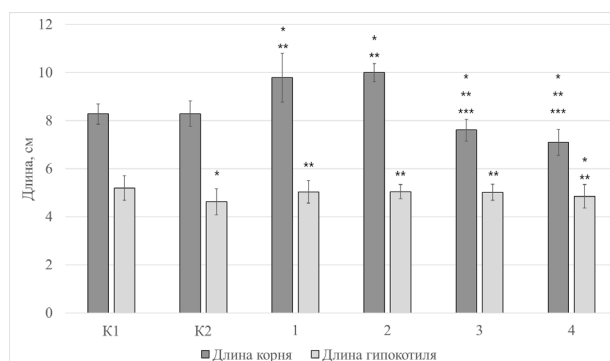


Рис. 3. Влияние бактерий рода *Rhodococcus* на морфометрические показатели проростков редиса красного. K1 – вода; K2 – среда Мейнелла; 1 – 24-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap; 2 – 48-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap; 3 – 24-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob; 4 – 48-часовая культура бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R *sid*::pK18mob. * – Отличия от K1 достоверны при $p \leq 0.05$; ** – отличия от K2 достоверны при $p \leq 0.05$; *** – отличия от дикого типа достоверны при $p \leq 0.05$. Высота столбцов отражает среднее значение, планки погрешностей – среднее квадратичное отклонение.

проявляют наибольшую степень сходства (не более 75%) с последовательностями бактерий *S. vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1) и некоторых других стрептомицетов, но не обладают сходством с какими-либо известными генами биосинтеза сидерофоров у родококков. Кроме того, данный локус плазмиды pSID имеет уникальную организацию, т.к. ген *sid5* (*iucC*) транскрибируется во встречном направлении, тогда как у других бактерий он входит в состав оперона и располагается в начале или в конце.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансировании в рамках грантов БРФФИ Б18М-075, Б22МВ-029 и задания 3.6.2 ГПНИ “Биотехнологии” (2021–2023 гг.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают, что конфликты интересов отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М: Мир, 2002. 589 с.
- Мандрик М.И., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Трушлис Э.В., Ларченко А.Ю., Василенко С.Л. Характеристика генетических локусов, определяющих деградацию фенола, в геноме бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Экспериментальная биология и биотехнология. 2024. №1. С. 27–40.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
- Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. М.: Мир, 1967. 320 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 436 с.
- Титок М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. Минск: Изд-во БГУ, 2004. 120 с.
- Чернявская М.И. Характеристика штаммов нафталинутилизующих бактерий рода *Rhodococcus* // Труды БГУ: Микробиология. 2016. Т. 11. Ч. 1. С. 190–197.
- Ahsan S., Kabir M.S. Linear plasmids and their replication // Stamford J. Microbiol. 2013. V. 2. P. 1–5.
- Aznar A., Chen N.W., Rigault M., Riache N., Joseph D., Desmaële D., Mouille G., Boutet S., Soubigou-Taconnat L., Renou J.P., Thomine S., Expert D., Dellagi A. Scavenging iron: a novel mechanism of plant immunity activation by microbial siderophores // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 2167–2183.
- Blin K., Shaw S., Augustijn H.E., Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., Fetter A., Terlouw B.R., Metcalf W.W., Helfrich E.J.N., van Wezel G.P., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. P. W46–W50.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>
- Bullock W.O. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // BioTechniques. 1987. V. 5. P. 376–378.
- Chan H.Y., Jensen S.O., LeBard R.J., Figgett W.A., Lai E., Simpson A.E., Brzoska A.J., Davies D.S., Connolly A.M., Cordwell S.J., Travis B.A., Salinas R., Skurray R.A., Firth N., Schumacher M.A. Molecular analysis of pSK1 par: a novel plasmid partitioning system encoded by staphylococcal multiresistance plasmids // J. Mol. Biol. 2022. V. 434. Art. 167770.
- Cserhádi M., Kriszt B., Krifaton Cs., Szoboszlay S., Háhn J., Tóth Sz., Nagy I., Kukolya J. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 166. P. 176–185.
- Dimkpa C.O., Svatoš A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., Kothe E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. // Chemosphere. 2008. V. 74. P. 19–25.
- Grant J.R., Enns E., Marinier E., Mandal A., Herman E.K., Chen C., Graham M., Van Domselaar G., Stothard P. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. P. W484–W492.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>
- Howland C.J., Rees C.E., Barth P.T., Wilkins B.M. The *ssb* gene of plasmid ColIb-P9 // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 2466–2473.
- Iminova L., Delean Y., Frantsuzova E., Bogun A., Zvonarev A., Suzina N., Anbumani S., Solyanikova I. Physiological and biochemical characterization and genome analysis of *Rhodococcus qingshengii* strain 7B capable of crude oil degradation and plant stimulation // Biotech. Rep. 2022. V. 35. Art. e00741.
- Ji C., Fan Yu, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins // Animal Nutr. 2016. V. 2. P. 127–133.
- Kriszt R., Krifaton C., Szoboszlay S., Cserhádi M., Kriszt B., Kukolya J., Czéh Á., Fehér-Tóth S., Török L., Szőke Z., Kovács K.J., Barna T., Ferenczi S. New zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain // PLoS One. 2012. V. 7. Art. e43608.

- Kuhl T., Felder M., Nussbaumer T., Fischer D., Kublik S., Chowdhury P.S., Schloter M., Rothballer M. De novo genome assembly of a plant-associated *Rhodococcus qingshengii* strain (RL1) isolated from *Eruca sativa* Mill. and showing plant growth-promoting properties // Microbiol. Res. Announc. 2019. V. 8. Art. e01106-19. <https://doi.org/10.1128/mra.01106-19>
- Kundu D., Hazra C., Chaudhari A. Biodegradation of 2,6-dinitrotoluene and plant growth promoting traits by *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: identification and toxicological analysis of metabolites and proteomic insights // Biocat. Agric. Biotech. 2016. V. 8. P. 55–65.
- Metcalf W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. V. 138. P. 1–7.
- Oberto J. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy // BMC Bioinformatics. 2013. V. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-4>
- Presentato A., Piacenza E., Turner R.J., Zannoni D., Capelletti M. Processing of metals and metalloids by Actinobacteria: cell resistance mechanisms and synthesis of metal (loid)-based nanostructures // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 2027.
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? // Sci. Tot. Environ. 2022. V. 819. Art. 153144.
- Saha R., Saha N., Donofrio R.S., Bestervelt L.L. Microbial siderophores: a mini review // J. Bas. Microbiol. 2013. V. 53. P. 303–317.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- Stevens V., Thijs S., McAmmond B., Langill T., Van Hamme J., Weyens N., Vangronsveld J. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* VSD3, a diesel fuel-degrading and plant growth-promoting bacterium isolated from *Hedera helix* leaves // Gen. Announc. 2017. V. 5. <https://doi.org/10.1128/genomea.01680-16>
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Turner S.L., Lilley A.K., Bailey M.J. Two *dnaB* genes are associated with the origin of replication of PQBR55, an exogenously isolated plasmid from the rhizosphere of sugar beet // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 42. P. 209–215.
- Vernikos G.S., Parkhill J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella pathogenicity* islands // Bioinf. 2006 V. 22. P. 2196–2203.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Bioinformatic and Functional Analysis of the pSID Siderophore Biosynthesis Plasmid of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

M. I. Mandryk¹*, A. A. Vysotskaya¹, Yu. V. Yahorava¹, D. U. Surzhyk¹,
A. Yu. Larchenka¹, and S. L. Vasylenko¹

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: charnymi@bsu.by

Received December 6, 2023; revised December 29, 2023; accepted December 31, 2023

Abstract. Complete genome sequencing of *R. pyridinivorans* strain 5Ap revealed the pSID plasmid (CP063453.1) 250428 bp in size. The gene responsible for replication of this plasmid is, most probably, *dnaB*. The genes which may be involved in the replication (*dnaB*, *ssb*) and plasmid separation after replication (*parA*) showed the highest similarity to the determinants located on large (224–343 kb) plasmids of rhodococci: unnamed1 of *R. pyridinivorans* YF3, unnamed1 of *R. rhodochrous* LH-B3, pRJH1 of *R. pyridinivorans* YC-JH2, pRDE01 of *Rhodococcus* sp. RDE2, and pRho-VOC14-C342 of *R. opacus* VOC-14. The pSID plasmid was found to contain two loci responsible for the synthesis of secondary metabolites, one of them determining the synthesis of a polyketide compound (similar sequences have been revealed on plasmids of other rhodococci) and the other one probably determines the synthesis of a siderophore: the genes for biosynthesis of this compound (*sidI*–*5*) exhibited the highest similarity (not exceeding 75%) with the sequences from *Streptomyces vilmorinianum* YP1 (CP040244.1), *S. ficellus* NRRL 8067 (CP034279.1), *Streptomyces* sp. NBC00162 (CP102509.1), and some other streptomycetes, while showing no similarity to the known siderophore biosynthesis genes of rhodococci.

The locus of the pSID plasmid responsible for the siderophore synthesis had a unique organization, since transcription of the *sid5 (iucC)* gene occurs in the opposite direction, while in other bacteria it belongs to an operon and is located at one of its termini. Inactivation of the *sidI* gene was found to result in decreased antagonistic activity of *R. pyridinivorans* 5Ap against plant-pathogenic bacteria *P. carotovorum* 2.18, lower resistance to iron and cadmium ions and arsenate, as well as in emergence of phytotoxic properties against radish, while wild-type bacteria exhibit plant growth-promoting activity.

Keywords: Rhodococcus, plasmids, siderophores, plant growth-promoting activity, antagonistic activity, heavy metal resistance