

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ (БИОТОПЛИВА)

Е.В. Охремчук, С.В. Цинкевич, О.В. Евдокимова, Л.Н. Валентович

Государственное научное учреждение Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, valentovich@mbio.bas-net.by

Аннотация. В данном исследовании была установлена критическая для роста 5 штаммов бактерий рода *Staphylococcus* концентрация бутанола в питательной среде. Для анализа детерминант, которые могут быть вовлечены в толерантность к органическим растворителям, был секвенирован геном *St. warneri* 22.1, после чего был проведен сравнительный анализ генетических детерминант у различных представителей рода *Staphylococcus* и естественного продуцента бутанола, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.

Ключевые слова: *n*-бутанол, *Staphylococcus*, устойчивость к растворителям, аннотация генома

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-962-965

В настоящее время, в связи с проблемой истощения природных ресурсов, исследования в области разработки и усовершенствования технологий получения биотоплива стали глобальным приоритетом. Хорошей альтернативой нефти в качестве топлива является *n*-бутанол [Liu et al., 2017]. На данный момент самой распространенной биотехнологией получения бутанола является микробный синтез с помощью анаэробных бактерий рода *Clostridium*. С развитием метаболической инженерии производство данного соединения стало возможно также и в гетерологичных системах, таких как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas putida* и *Bacillus subtilis*. Однако *n*-бутанол крайне токсичен для большинства микроорганизмов: уже при низких концентрациях спирта ($\approx 2\%$) наблюдается угнетение роста бактерий-продуцентов [Moon et al., 2016].

Бактерии обладают разнообразными механизмами устойчивости к органическим растворителям. Данные механизмы связаны с работой продуктов нескольких групп генов, вовлеченных в функционирование клеточной мембраны [Kanno et al., 2016; Reyes et al., 2011]:

1. Гены эффлюкс-систем и антипортов;
2. Гены транспортеров аминокислот и сахаров;
3. Гены синтеза мембранных липопротеинов;
4. Гены помп, обеспечивающих множественную лекарственную резистентность;
5. Гены белков стрессового ответа.

В последнее время в литературе появились данные о выявлении бутанол-толерантных бактерий: *Staphylococcus aureus* и *St. warneri* [Zhang et al., 2016]. Возможно, данное свойство является общей характеристикой рода, что делает данные микроорганизмы перспективными в качестве объектов метаболической инженерии для создания потенциальных продуцентов бутанола или других органических растворителей.

Целью работы стало установление критической для роста стафилококков концентрации бутанола в питательной среде, а также анализ генетических детерминант, которые обеспечивают высокую стрессоустойчивость представителей рода *Staphylococcus*.

Исследование проводилось на 5 штаммах рода *Staphylococcus*: *St. warneri* 22.1, *St. equorum* PLC, *St. saprophyticus* BSU, *St. aureus* ATCC 25925, *St. aureus* ATCC 6531.

Доступные нам бактерии были исследованы на способность расти в полноценной питательной среде в присутствии различных концентраций бутанола (рисунок).

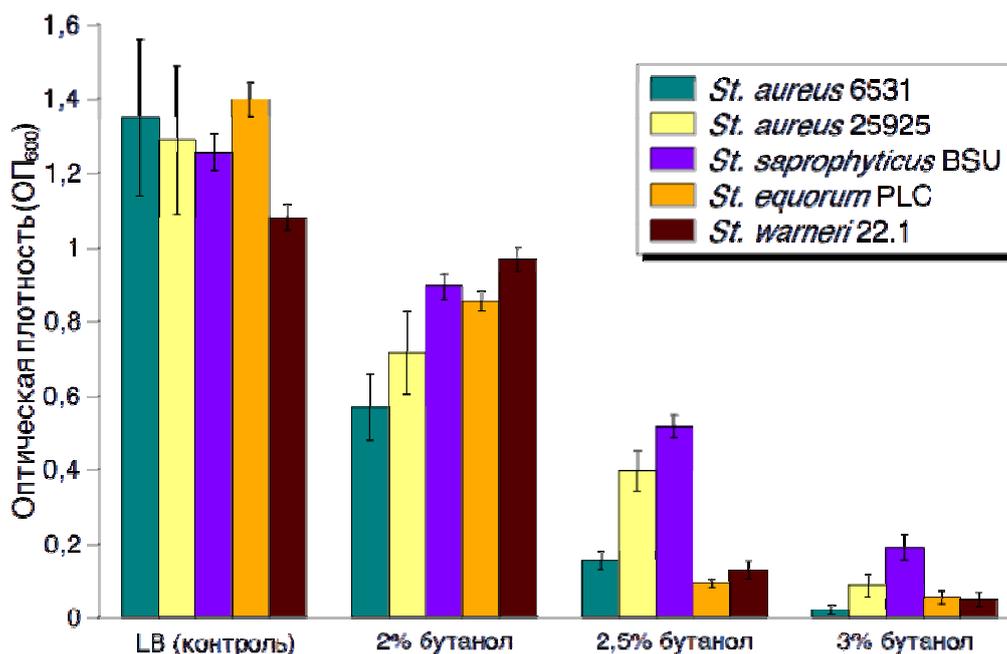


Рисунок. Интенсивность роста штаммов рода *Staphylococcus* в жидкой среде LB с бутанолом (24 часа культивации).

Все исследуемые микроорганизмы хорошо растут в присутствии 2% бутанола. Интенсивность роста бактерий значительно снижается при повышении концентрации бутанола в среде до 2,5%. Бактерии *St. saprophyticus* BSU способны расти в питательной среде, содержащей 3% бутанола [Цинкевич и др., 2017].

Методом газовой хроматографии было установлено, что исследуемые штаммы не метаболизируют бутанол, а лишь обладают устойчивостью к данному веществу. Из этого следует, что в геноме стафилококков имеются генетические детерминанты, определяющие толерантность к органическим растворителям, не связанные с работой метаболических путей по утилизации бутанола.

В ходе работы также был секвенирован геном *St. warneri* 22-1 для дальнейшего анализа детерминант, которые могут быть вовлечены в толерантность данных микроорганизмов к органическим растворителям.

Был проведен количественный анализ генетических детерминант стрессового ответа штаммов рода *Staphylococcus* и *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 (таблица). Данный штамм был выбран для сравнительного анализа по той причине, что он является естественным продуцентом бутанола, и в настоящее время широко используется в производстве.

Выявлено, что наибольшее количество групп генов стрессового ответа присутствует у *Cl. acetobutylicum* ATCC 824. Вероятно, это связано с тем, что данные микроорганизмы являются облигатно анаэробными и для них атмосферный кислород также является стресс-фактором.

Кроме того, количественный анализ показал, что у *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 имеется значительно большее количество групп генов, связанных с работой эффлюкс-помп, обеспечивающих множественную лекарственную резистентность. У всех из исследованных штаммов стафилококков количество данных групп генов составляет 4-6, клостридии же имеют 7 таких групп генов [Brettin et al., 2015].

Таблица.

Сравнение количества генов стрессового ответа у представителей рода *Staphylococcus* и *Cl. acetobutylicum*

Количество групп генов стрессового ответа	Микроорганизм				
	<i>St. warneri</i> 22-1	<i>St. aureus</i> ATCC 25923	<i>St. equorum</i> KS1039	<i>St. saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 824
Осмотический стресс	13	12	15	14	10
Окислительный стресс	28	30	31	29	37
Периплазматический стресс	1	-	-	1	1
Тепловой шок	16	16	15	15	19
Холодовой шок	3	3	3	2	2
Детоксикация	8	10	10	8	13
Без категории	10	10	10	14	7

Примечание. Последовательности геномов *St. equorum* KS1039 (код доступа NZ_CP013114.1), *St. saprophyticus* ATCC 15305 (NC_007350.1), *St. aureus* ATCC 25923 (NZ_CP009361.1) и *Cl. acetobutylicum* ATCC 824 (NC_003030.1) были получены из БД GenBank. Данные штаммы были выбраны как типичные для своего вида.

Стоит отметить, что устойчивость к органическим растворителям требует дополнительных энергетических затрат. В геноме *St. saprophyticus* были детектированы гены (2-изопропилмалатсинтазы, 3-изопропилмалатдегидрогеназы, *argD*, репрессора аргинин-деиминазного пути и др.), продукты которых участвуют в переносе сахаров и аминокислот в клетку, что способствует выживаемости данных микроорганизмов в присутствии бутанола [Reyes et al., 2016; Brettin et al., 2015]. Известно также, что при появлении в среде бутанола повышается экспрессия гена *fecD*, который также был детектирован в геноме *St. saprophyticus*. Продукт данного гена является частью регуляторной сети, управляющей проницаемостью клеточной мембраны [Reyes et al., 2016]. Таким образом, можно предположить, что одним из механизмов устойчивости данных микроорганизмов к н-бутанолу также является предотвращение поступления н-бутанола во внутреннее пространство клетки.

Наибольший вклад в толерантность к органическим растворителям у всех из исследуемых представителей рода *Staphylococcus* связана с наличием капсул, массивность которых увеличивается при стрессовых условиях среды [Kanno et al., 2013]. Анализ геномов исследуемых штаммов показал, что присутствие генов, участвующих в образовании капсул, характерно для всех из анализируемых штаммов.

Безусловно, для рассмотрения данной группы организмов в качестве продуцентов необходимо также изучить их степень патогенности. Анализ геномов показал, что геном *St. arneri* 22-1 не содержит специализированных детерминант, которые позволяли бы успешно проявлять себя в качестве патогена в организме человека и животных. В геноме *St. warneri* 22-1 выявлена лишь одна область, подобная островкам патогенности, а также 3 островка генов резистентности к различным стресс-факторам [Bertelli et al., 2017; Yoon et al., 2007].

Таким образом, можно заключить, что все исследованные стафилококки обладают устойчивостью к бутанолу в концентрации 2%, а штамм *St. saprophyticus* PCL способен расти и при 3%. Анализ секвенированного нами генома бактерий *St. warneri* 22-1 показал наличие у них ряда детерминант, обеспечивающих высокую степень толерантности к органическим растворителям. Следовательно, данные

микроорганизмы могут использоваться для генно-инженерных манипуляций с целью создания продуцентов бутанола или других органических растворителей.

Литература

Цинкевич С.В., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н. Исследование физиолого-биохимических характеристик бактерий рода *Staphylococcus* – потенциальных продуцентов органических растворителей (биотоплива) // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. X Междунар. науч. конф., Минск, 5-9 июня 2017 г. – Минск: Беларуская навука. – Минск, 2017. – С. 103–105.

Bertelli C. et al. Island Viewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, No. W1. – P. 30–35.

Brettin T. et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 1–5.

Kanno M. et al. Isolation of butanol- and isobutanol-tolerant bacteria and physiological characterization of their butanol tolerance // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79, No. 22. – P. 6998–7005.

Liu S., Qureshi N., Hughes S.R. Progress and perspectives on improving butanol tolerance // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 33, No. 3. – P. 51.

Moon H.G. et al. One hundred years of clostridial butanol fermentation // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – V. 363, No. 3 – P. 1–15.

Reyes L.H., Almario M.P., Kao K.C. Genomic library screens for genes involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli* // *PLOS ONE.* – 2011. – V. 6, No. 3. – P. 17678–17686.

Yoon S.H. et al. Towards pathogenomics: a web-based resource for pathogenicity islands // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 395–400.

Zhang J. et al. Isolation and characterization of butanol-tolerant *Staphylococcus aureus* // *Bio-technol. Lett.* – 2016. – V. 38, No. 11. – P. 1929–1934.

CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS* AS A POTENTIAL BIOFUEL PRODUCTION PLATFORM

K.V. Akhremchuk, S.V. Tsynkevich, O.V. Evdokimova, L.N. Valentovich

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
valentovich@mbio.bas-net.by

Abstract. In this study the ability to grow in the presence of n-butanol was observed for the 5 strains of *Staphylococcus*. The whole genome of *St. warneri* 22-1 was sequenced and assembled. In addition, we analyzed genetic determinants involved in n-butanol tolerance in the *Staphylococcus* strains and *Cl. acetobutylicum* ATCC 824.

Keywords: n-butanol, *Staphylococcus*, solvent tolerance, genome annotation