

УДК 579.69

Штамм *Gordonia alkanivorans* 135 – перспективный деструктор дибензотиофена© 2020 Я.А. ДЕЛЕГАН^{1*}, Е.Э. ФРАНЦУЗОВА², А.А. ВЕТРОВА¹¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Московская обл., г. Пуцино, 142290,² Кубанский государственный университет, г. Краснодар, 350040

*e-mail: mewgia@ya.ru

Поступила в редакцию 31.03.2020 г.

После доработки 17.04.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

В геноме штамма *Gordonia alkanivorans* 135 выявлены гены, вовлеченные в деструкцию дибензотиофена. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проведена оценка эффективности деструкции этого соединения при культивировании штамма *Gordonia alkanivorans* 135 при температуре 28 °С в минеральной среде (без серы) в присутствии глюкозы (гексадекана) в качестве источника углерода. Полученные в данной работе результаты позволяют рассматривать штамм *Gordonia alkanivorans* 135 как биотехнологически перспективный при разработке способа микробного обессеривания нефти.

Ключевые слова: *Gordonia*, дибензотиофен, биодеградация

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-121-125

В настоящее время нефть и продукты ее переработки остаются одними из основных загрязнителей окружающей среды. В зависимости от вида нефти концентрация серы во фракции, используемой для производства дизельного топлива, может варьироваться от <500 до >5000 мг/л [1]. Гетероароматические соединения, содержащиеся в своей структуре этот элемент, являются одними из наиболее устойчивых в окружающей среде компонентов нефти [2]. До 70% серы в нефти органически связана, преимущественно в форме конденсированных тиофенов (дибензотиофена (ДБТ) и замещенных дибензотиофенов (метилированных ДБТ и бензо-ДБТ) [3, 4]. Использование топлива, содержащего серу, ведет к выбросам ее оксидов в атмосферу и является одной из причин кислотных дождей. Кроме того, даже низкие концентрации этих оксидов вызывают раздражение дыхательных путей человека и повреждение растений.

Способность использовать дибензотиофен в качестве единственного источника серы является одной из отличительных черт бактерий рода *Gordonia*,

что ставит их по разнообразию метаболических возможностей в один ряд с родококками – известными деструкторами различных поллютантов. Ранее [5, 6] отмечалось, что для деградации ДБТ и его производных гордонии используют так называемый 4S-путь, кодируемый опероноподобной структурой *dszABC*. Тем не менее, до настоящего времени неизвестна роль генов, кодирующих ферменты ДБТ-десульфуризации, в общем метаболизме клеток. Целью данного исследования являлось изучение физиолого-биохимических аспектов деградации ДБТ штаммом *Gordonia alkanivorans* 135 и анализ генов в геноме штамма, предположительно вовлеченных в этот процесс. Разработка способов удаления серосодержащих компонентов нефти из грунтовых и водных экосистем является не менее актуальной задачей, чем аналогичные исследования деструкции углеводородов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальный штамм. Штамм *Gordonia alkanivorans* 135 был выделен из образца нефте-

Список сокращений: ДБТ – дибензотиофен, SFM – sulfur-free medium, бессерная среда.

загрязненного грунта с территории нефтеперерабатывающего завода (г. Москва). 1 г грунта, отобранного из образца, внесли в 100 мл среды Эванса с добавлением нефти (17,6 г/л) и ДБТ (36,8 мг/л) и культивировали в течение 10 сут на качалке (180 об/мин) при температуре 28 °С. Чистые культуры выделяли из накопительной культуры, выполняя серию разведений с последующим высевом на полноценную агаризованную среду Лурия-Бертани. Штамм 135 по численности был одним из основных в накопительной культуре.

Питательные среды, источники углерода и серы. В качестве минеральной среды использовали среду Эванса [7] и бессерную среду SFM [8] следующего состава (на 1 л milli-Q воды): 1,22 г NH₄Cl, 2,5 г KН₂PO₄, 2,5 г Na₂HPO₄·2H₂O, 0,17 г MgCl₂·6H₂O, 0,5 мл раствора микроэлементов (25 г/л EDTA, 2,14 г/л ZnCl₂, 2,5 г/л MnCl₂·4H₂O, 0,3 г/л CoCl₂·6H₂O, 0,2 г/л CuCl₂·2H₂O, 0,4 г/л NaMoO₄·2H₂O, 4,5 г/л CaCl₂·2H₂O, 2,9 г/л FeCl₃·6H₂O, 1,0 г/л H₃BO₃ и 0,1 г/л KI). В качестве единственного источника углерода и энергии были использованы – глюкоза (10 г/л), или гексадекан 2%. Единственным источником серы служил 0,1 М раствор ДБТ в диметилформамиде, 200 мкл которого вносили в 100 мл среды, что составляло 36,8 мг/л. В качестве полноценной среды использовали агаризованную среду Лурия-Бертани [9] (дрожжевой экстракт и пептон производства Difco, США). Для приготовления твердых сред использовали агар производства Pronadisa (Испания).

Условия культивирования

Эксперименты проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды SFM, куда вносили источники серы (ДБТ в ДМФА) и углерода (глюкоза/гексадекан). Начальная концентрация микроорганизмов в колбах составляла не менее 1·10⁶ КОЕ/мл. Штамм культивировали в течение 3 сут (глюкоза) и в течение 5 сут (гексадекан) при 28 °С и постоянном перемешивании со скоростью 120 об/мин.

Оценка эффективности деградации ДБТ в колбах. Остаточную концентрацию ДБТ определяли в колбах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, описанном в [6]. Эффективность деградации ДБТ штаммом оценивали относительно контроля (стерильной среды SFM с глюкозой/гексадеканом и ДБТ).

Определение численности микроорганизмов. Численность микроорганизмов определяли методом серийных разведений с последующим высевом на чашки Петри с агаризованной средой Лурия-Бертани. Чашки инкубировали в течение 2 сут при температуре 28 °С, затем проводили подсчет выросших колоний.

Поиск в геноме целевых генов, предположительно вовлеченных в деградацию ДБТ. Проведено сравнение аннотаций, выполненных сервисами Prokka, RAST и GenBank NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большое значение в исследовании микробной десульфуризации нефти имеет открытие высокоспецифичного «4S пути» (сероспецифичный путь) у *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (ATCC 53968), который был выделен в 1990 году в Институте Газовых технологий (США). Из штамма IGTS8 была выделена большая линейная плазмида pSOX, которая содержала фрагмент, ответственный за окисление серы и передачу этого признака не способным к десульфуризации штаммам [10]. Гены *soxABC*, позднее переименованные в *dszABC*, ответственны за десульфуризацию и составляют опероноподобную структуру. К тому же в 4S пути необходим дополнительный ген *dszD*, расположенный на хромосоме. Хотя нет прямых подтверждений, что гены *dsz* являются индуцируемыми, они репрессируются сульфатом и серосодержащими аминокислотами.

Способность гордоний к десульфуризации ДБТ отмечалась неоднократно. Это свойство было отмечено у представителей таких видов, как *G. desulfuricans* [11], *G. amicalis* [12], *G. aichiensis* [13]. Аминсефат с соавт. [6] выделили десульфуризирующий штамм *Gordonia sp.* ANV_01 из нефтезагрязненной почвы в Кужестане (Иран). Авторы оптимизировали условия культивирования для повышения выхода 2-гидроксифенила и подтвердили, что данный штамм использует 4S-путь десульфуризирующих реакций. Способность штамма к десульфуризации ДБТ без расщепления углеводного скелета, была подтверждена методом Гиббса и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В данной работе отмечен рост штамма *Gordonia alkanivorans* 135 в среде Эванса (сульфаты в качестве источника серы) и среде SFM с добавлением ДБТ. В качестве единственного источника углерода и энергии использовалась глюкоза. Стоит отметить, что на среде SFM с глюкозой, но без ДБТ роста не наблюдалось. Полученный результат свидетельствует о возможности штамма 135 использовать сульфаты и ДБТ в качестве источников серы. Аналогичные результаты были получены Алвесом с соавт. [8] для штамма *Gordonia alkanivorans* 1B, способного к деградации ДБТ.

Геном ДБТ-деградирующего штамма 135 включает хромосому размером 5 039 827 п. н.

и кольцевую плазмиду размером 164963 п.н. [14]. Ближайшим родственником штамма 135 является *Gordonia alkanivorans* YC-RL2 (CP027114). Значение параметра средней нуклеотидной идентичности (ANI) для хромосом составило 97,45%, в связи с чем штамм 135 может быть предположительно идентифицирован как *G. alkanivorans* на основании анализа полногеномной последовательности.

Была проанализирована динамика численности микроорганизмов, культивируемых в среде SFM с ДБТ и глюкозой (гексадеканом) в качестве источников углерода (рис. 1). Середина экспоненциальной фазы приходилась на 50 ч при росте на среде как с глюкозой, так и с гексадеканом. На стационарную фазу роста культура выходила в присутствии глюкозы через 60 ч, гексадекана через 72 ч.

Была выполнена оценка способности штамма 135 утилизировать ДБТ. Полученные результаты были сравнены с результатами, полученными Соколовой с соавт. [15] для штамма *Gordonia amicalis* 6-1. Штамм 6-1 запатентован авторами как биотехнологически перспективный, снижающий содержание сероорганических соединений в нефти.

Результаты сравнения приведены в таблице 1.

Полученные результаты позволяют предположить, что штамм *Gordonia alkanivorans* 135 будет способствовать снижению содержания сероорганических соединений в нефти.

Ранее было показано, что 4S путь утилизации ДБТ актинобактериями, в том числе гордониями, является наиболее распространенным способом этих бактерий усваивать серу из конденсированных тиофенов, не разрушая при этом углерод-углеродные связи [6]. Несмотря на способность штамма утилизировать ДБТ в качестве источника серы, генов полного оперона *dsz* в штамме не выявлено. Поэтому был выполнен поиск родственных генов, которые предположительно могут принимать участие в процессе катаболизма ДБТ. При сравнении аннотаций генома штамма *Gordonia alkanivorans* 135, выполненных сервисами Prokka, RAST и GenBank NCBI, в хромосоме штамма обнаружено три таких гена.

Ген ацил-КоА дегидрогеназы (PEG1525), согласно результатам поиска последовательности, в базе данных GenBank, близок к генам семейства *SfnB*, позволяющим усваивать серу (Рис. 2). Гены этого семейства распространены

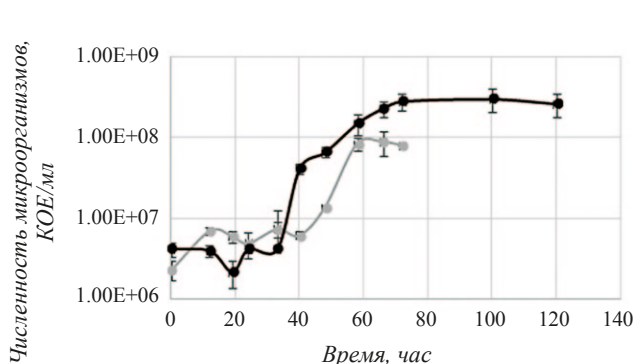


Рис. 1. Динамика численности микроорганизма *Gordonia alkanivorans* 135 при культивировании в минеральной бессерной среде с ДБТ и глюкозой (—●—) / гексадеканом (—●—) при температуре 28 °C.

Fig. 1. Dynamics of the living cells number of *Gordonia alkanivorans* 135 during growth in mineral medium with DBT and glucose (—●—) / hexadecane (—●—) at a temperature of 28 °C.

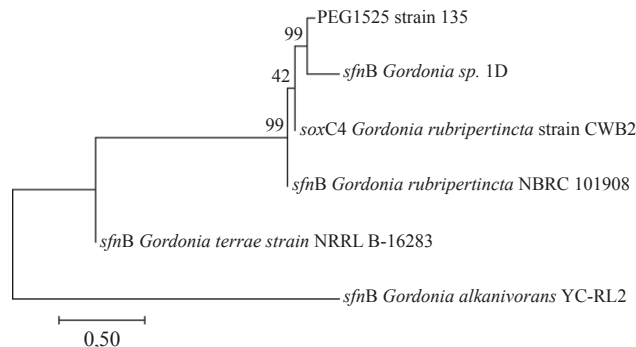


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по методу Neighbor Joining на основании анализа аминокислотных последовательностей, соответствующих гену *sfnB*, штамма *Gordonia alkanivorans* 135 и родственных генов других штаммов.

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by the Neighbor Joining method based on the aminoacid sequence analysis of the *SfnB* of *Gordonia alkanivorans* 135 and its relative strains.

Таблица 1

Сравнение способности штаммов *Gordonia alkanivorans* 135 и *Gordonia amicalis* 6-1 утилизировать ДБТ

The comparison of capability of DBT degradation by the strains *Gordonia alkanivorans* 135 and *Gordonia amicalis* 6-1

	<i>Gordonia alkanivorans</i> 135	<i>Gordonia amicalis</i> 6-1 [15]
Исходное содержание ДБТ, мг/л	36,8	25
Время эксперимента, сутки	5	15
Степень деградации ДБТ в конце эксперимента, %	36,05	98

как у грамотрицательных (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*), так и у грамположительных бактерий, в том числе актинобактерий различных родов (*Gordonia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*). Есть сведения о родстве гена *sfnB* с геном дибензотиофен десульфуризации *dszC* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR023922/>).

Последовательность гена PEG2077 (монооксигеназы) штамма *Gordonia alkanivorans* 135 родственна последовательности гена *dszC* штамма *Gordonia* sp. MMS17-SY073 (AZG47090.1), а также гену *soxC5* (альтернативное название *dsz*) штамма *G. rubripertincta* CWB2.

Анализ полученных данных выявил отсутствие генов или родственным им генов *dszA*, *dszB* и *dszD*. При этом обнаружено 2 гена, распознанных как родственные гену *dszC*. Вероятно, деградация ДБТ данным штаммом, с учетом физиолого-биохимических параметров, происходит по альтернативному пути, ранее не описанному в литературе. Подобное явление требует дальнейших детальнейших генетических исследований.

Таким образом, исследование физиолого-биохимических свойств штамма показало, что штамм 135 является активным деструктором ДБТ. Следует отметить, что в процесс деструкции ДБТ штаммом *Gordonia alkanivorans* 135 вовлечены гены, отличные от оперона *dsz*, который чаще всего встречается у ДБТ-деградирующих штаммов. Полученные в данной работе результаты позволяют рассматривать штамм *Gordonia alkanivorans* 135 как биотехнологически перспективный. В дальнейшем предполагается использовать данный штамм при разработке способа микробного обессеривания нефти.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-74-00097).

ЛИТЕРАТУРА

1. Moheballi, G., Ball A.S., Keytash A., Rasekh B. Stabilization of water/gas oil emulsions by desulfurizing cells of *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Microbiology*, 2007, 153, 1573–1581. doi: 10.1099/mic.0.2006/002543-0.
2. Pokethitiyook, P., Tangaromsuka, J., Kruatrachue, et al. Biological removal of organic sulphur by bacterial strains isolated in Thailand. *Science Asia*, 2008, 34, 361–366. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.361
3. Castorena G., Suarez C., Valdez, I., et al. Sulfur selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 215, 157–161. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11385.x
4. Li W., Zhang Y., Dong Wang M. and Shi Y. Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Microbacterium* strain ZD_M2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 247, 45–50. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.025.
5. Santos S.C.C., Alviano D.S., Alviano C.S., et al. Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization. *Appl. Microb. and Biotechnol.*, 2006, 71, 355–362. doi: 10.1007/s00253-005-0154-z
6. Aminsefat A., Rasekh B., Ardakani M.R. Biodesulfurization of dibenzothiophene by *Gordonia* sp. AHV-01 and optimization by using of response surface design procedure. *Microbiology*, 2012, 81(2), 154–159. doi: 10.1134/S0026261712020026.
7. Evans C.G.T., Herbet D., Tempest D.W. The continuous culture of microorganisms 2. Construction of a chemostat: Methods in microbiology. V.2. [Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons]. London: Acad. Press, 1970, 277–327.
8. Alves L., Salgueiro R., Rodrigues C., et al. Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* strain 1B. *Appl. Biochem. and Biotech.*, 2005, 120, 199–208. doi: 10.1385/abab:120:3:199
9. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1951, 62, 293–300.
10. Denome S.A., Olson E.S., Young K.D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol.*, 1993, 59, 2837–2843.
11. Kim S.B., Brown R., Oldfield C., et al. *Gordonia amicalis* sp. nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000, 50, 2031–2036. doi: 10.1099/00207713-50-6-2031.
12. Kim, S. B., Brown, R., Oldfield, C., et al. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene desulphurizing actinomycete. *Int J Syst Bacteriol.* 1999, 49, 1845–1851. doi: 10.1099/00207713-49-4-1845
13. Klatt S., Rainey F.A., Kroppenstedt R.M. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordonia* as *Gordonia aichiensis* comb. nov. and *Gordonia amarae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, 44, 769–773. doi: 10.1099/00207713-44-4-769
14. Delegan Y., Valentovich L., Vetrova A., et al. Complete genome sequence of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene- and hydrocarbon-degrading strain. *Microbiol. Resour. Announc.*, 2020, 9(2), 9:e01450-19. doi: 10.1128/MRA.01450-19.
15. Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., и др. Штамм *Gordonia amicalis*, способный к генерации непосредственно в нефтяном пласте нефтевытесняющего агента - биоПАВ и снижающий содержание сероорганических соединений нефти. Патент РФ №2673747 от 29.11.2018.

The strain *Gordonia alkanivorans* 135 Is a Promising Destructor of Dibenzothiophene

Ya.A. DELEGAN^{1*}, E.E. FRANTSUZOVA², and A.A. VETROVA¹

¹ Pushchino Research Center of Biological Researches, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Oblast, 142290, Russia

² Kuban State University, Krasnodar, 350040, Russia

*e-mail: mewgia@ya.ru

Received March 31, 2020

Revised April 17, 2020

Accepted July 8, 2020

Abstract—Genes involved in the dibenzothiophene degradation have been identified in the genome of *Gordonia alkanivorans* 135. The efficiency of the degradation was evaluated by high-performance liquid chromatography after the strain cultivation in mineral sulfur-free medium with glucose (hexadecane) as a carbon source at a temperature of 28 °C. The results obtained in this work allow us to consider the *Gordonia alkanivorans* 135 strain as promising for development of biotechnological method for microbial oil desulfurization.

Key words: *Gordonia*, dibenzothiophene, biodegradation.

Funding—This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Grant no. 19-74-00097).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-121-125