

ГЕНЕТИКА

УДК 579.871.8

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-459-463.

Л. Н. Ананьина

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА *BREVIBACTERIUM* SP. U1, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЗАСОЛЕННОЙ ПОЧВЫ, В СИСТЕМЕ РОДА *BREVIBACTERIUM***

Исследовано филогенетическое положение галотолерантного штамма *Brevibacterium* sp. U1, выделенного ранее из почвы района промышленной соледобычи (г. Березники, Пермский край), в системе рода *Brevibacterium* на основе анализа нуклеотидных последовательностей *ect*-генов, кодирующих ферменты биосинтеза осмопротекторного вещества – этоина, и 16S рДНК. Анализ нуклеотидных последовательностей генов *ectB* и *ectC* согласовался с результатами анализа 16S рДНК. Однако было выявлено значительное эволюционное расстояние нуклеотидных последовательностей *ectC*-гена штамма *Brevibacterium* sp. U1 от филогенетически близкородственного вида *B. aurantiacum*.

**Ключевые слова:** *Brevibacterium*; 16S рДНК; *ect*-гены; филогения.

L. N. Anan'ina

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

**PHILOGENETIC STATUS OF THE HALOTOLERANT STRAIN *BREVIBACTERIUM* SP. U1, ISOLATED FROM SALINE SOIL, IN THE *BREVIBACTERIUM* GENUS SYSTEM**

The position of the previously isolated from the soil of the industrial salt production area halotolerant strain *Brevibacterium* sp. U1 in the system of the genus *Brevibacterium* was studied based on the analysis of the nucleotide sequences of *ect*-genes encoding the biosynthesis enzymes of the osmoprotective substance, ectoine, and the 16S rDNA. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the *ectB* and *ectC* genes was consistent with the results of the analysis of 16S rDNA. However, a significant evolutionary distance of the nucleotide sequences of the *ectC* gene of the strain *Brevibacterium* sp. U1 from phylogenetically closely related species *B. aurantiacum* was observed.

**Key words:** *Brevibacterium*; 16SrDNA; *ect*-genes; phylogeny.

Представители рода *Brevibacterium* семейства *Brevibacteraceae* класса *Actinobacteria*, выделены из молокосодержащих продуктов, включая сыры, встречаются у людей и птиц в качестве комменсалов или условно-патогенных микроорганизмов; населяют морские и почвенные экосистемы [Ivanova et al., 2004]. Особое внимание исследователи уделяют ассоциированным с созреванием сыра бревибактериям. Поскольку в процессе производства сыров их поверхность солят или погружают в насыщенный рассол, изучена осмоадаптация бревибактерий к условиям высокой осмолярности внешней среды. На примере биотехнологически значимого вида *B. linens* было показано, что преобладающим осмопротектором является эктоин [Bernard et al., 1993].

Последующее изучение геномов представителей рода *Brevibacterium* показало наличие генов,

кодирующих биосинтез эктоина у большинства исследованных видов, за исключением видов, ассоциированных с человеком [Pham et al., 2017]. В других работах выявлена коллинеарность эволюционных расстояний между нуклеотидными последовательностями 16S рДНК и аминокислотными последовательностями ферментов синтеза эктоина близкородственных организмов (эволюционное расстояние менее 0.15) [Cai et al., 2011; Widderich et al., 2014].

Ранее из почвы района солеразработок Верхнекамского месторождения солей был выделен галотолерантный грамположительный бактериальный штамм U1, способный к активному росту по сравнению с другими исследованными в этой работе штаммами в полноценной среде Раймонда в присутствии 12%-ного NaCl. На основе морфологиче-

ских характеристик штамм был отнесен к роду *Brevibacterium* [Плотникова и др., 2006].

Цель настоящей работы – определение филогенетического положения штамма *Brevibacterium* sp. U1 в системе рода *Brevibacterium* на основе анализа последовательностей 16S рДНК и генов, кодирующих ферменты биосинтеза эктоина.

## Материалы и методы исследования

### Объекты исследования

*Brevibacterium* sp. U1 был выделен из почвы района солеразработок Верхнекамского месторождения солей [Плотникова и др., 2006].

### Среды и условия культивирования

Минеральная среда Раймонда (г/л деионизированной воды):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2.0,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.01,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0.1, pH – 7.0 [Raymond, 1961].

Агаризованная богатая среда Раймонда следующего состава (г/л среды Раймонда): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2.5, NaCl – 30, агар – 15.

Культивирование штамма проводили на агаризованной богатой среде Раймонда в термостатируемом шкафу ТС-1/80 СПУ (Россия) при температуре 28°C.

### Молекулярно-генетические и биоинформационные методы исследования

Геномную ДНК из бактериальных клеток выделяли SDS-СТАВ методом [Wilson, 1995].

С препаратов ДНК амплифицировали фрагмент гена 16S рРНК согласно методике, описанной ранее [Ананьина et al., 2011].

Амплификацию и детекцию *ect*-генов на матрице ДНК выполняли, используя систему праймеров G2F/G2R согласно протоколу, описанному в статье [Ананьина, Шестакова, Плотникова, 2018].

Секвенирование генов проводили с помощью соответствующих праймеров и Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v3.1 («Thermo Fisher Scientific», «Fisher Scientific», США), следуя инструкциям фирмы-производителя на приборе Genetic Analyzer 3500xl в лаборатории молекулярной биологии и генетики при кафедре ботаники и генетики растений ПГНИУ.

### Биоинформационное обеспечение

Сервис публичной базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) – Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Пакет программ Mega v. 5.0, позволяющий выравнивать нуклеотидные последовательности, рассчитывать эволюционные расстояния с последующим графиче-

ским представлением результатов.

## Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК длиной 1425 п.н. штамма *Brevibacterium* sp. U1 с помощью программы Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) выявил высокий уровень сходства с нуклеотидными последовательностями генов представителей рода *Brevibacterium*, что подтвердило результат предварительной идентификации штамма на основе морфо-физиологических характеристик. На филогенетическом дереве штамм входил в кластер *Brevibacterium sensu stricto*, формируя подкластер с видами *B. aurantiacum* и *B. antiquum*, уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК составил 99.29 и 97.8%, соответственно. Следует отметить, что уровень 16S рДНК сходства между видами кластера *Brevibacterium sensu stricto* находился в пределах 93.5–99.2%. Максимальное значение сходства 99.2% отмечено между видами *B. linens* и *B. iodinum*. Таким образом, уровень сходства штамма *Brevibacterium* sp. U1 и представителя вида *B. aurantiacum* сопоставим с межвидовым для группы *Brevibacterium sensu stricto* (рис. 1). Кроме того, типовой штамм вида *B. aurantiacum* VKM Ac-2111<sup>T</sup> был выделен из сыра сорта Camambert (<http://www.vkm.ru/Catalogue.htm>). Современное исследование показало доминирование представителей вида *B. aurantiacum* в пяти различных сырах, созревающих в рассоле [Cogan et al., 2014]; в то время как исследуемый штамм *Brevibacterium* sp. U1 был выделен из засоленной почвы, загрязненной отходами соледобывающего предприятия [Плотникова и др., 2006]. Принимая во внимание вышесказанное, становится очевидной необходимость дополнительного исследования для уточнения таксономического (филогенетического) положения штамма *Brevibacterium* sp. U1 с применением других генов.

Использование разработанной нами ранее системы праймеров [Ананьина, Шестакова, Плотникова, 2018] позволило получить ПЦР-продукт ожидаемой длины около 800 п.н., включающий фрагменты *ectB*- и *ectC*-генов, на ДНК-матрице исследуемого штамма *Brevibacterium* sp. U1. Предварительный скрининг в публичных базах данных нуклеотидной последовательности фрагмента *ect*-оперона с помощью программы Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) выявил его гомологию с *ect*-генами бактерий рода *Brevibacterium*.

В настоящее время только у 6 из 15 видов группы *Brevibacterium sensu stricto* представлены нуклеотидные последовательности *ect*-генов в публичной базе данных Национального центра биотехнологической информации США. Уровни сход-

ства нуклеотидных последовательностей *ectB*- и *ectC*-генов типовых штаммов видов группы *Brevibacterium sensu stricto* находились в пределах 64.2–93.2 и 74.6–97.6%, соответственно. Результаты свидетельствуют о более высоком уровне дивергенции *ect*-генов по сравнению с геном 16S рРНК (рис. 2а, б). При этом *ectC*-ген имел меньшие значения эволюционного расстояния между видами группы *Brevibacterium sensu stricto*, чем *ectB*-ген (рис. 2а, б). Наиболее высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей *ectB*- и *ectC*-генов, 97.3 и 94.3%, соответственно, исследуемый штамм проявил с видом *B. aurantiacum* (рис. 2а, б). Примечательно, что значение сходства нуклеотидной последовательности *ectB*-гена штамма U1 было выше уровня межвидового сход-

ства. В то время как для *ectC*-гена это значение находилось в вычисленном интервале, а на филогенетическом дереве штамм формировал отдельную ветку в группе *B. aurantiacum*/*B. antiquum* (рис. 2б). При этом положение видов относительно друг друга в кластере *Brevibacterium sensu stricto* на «*ectB*»- и «*ectC*»-деревьях отличалось, что может быть следствием горизонтального переноса генов. Современные исследования геномов штаммов, близкородственных виду *B. aurantiacum*, выявили большое количество транспозаз и интеграз, а также фрагменты гомологичных последовательностей ДНК, что предполагает горизонтальный перенос генов, который, по мнению авторов, обеспечивает приспособление к условиям экологической ниши [Levesque et al., 2019].

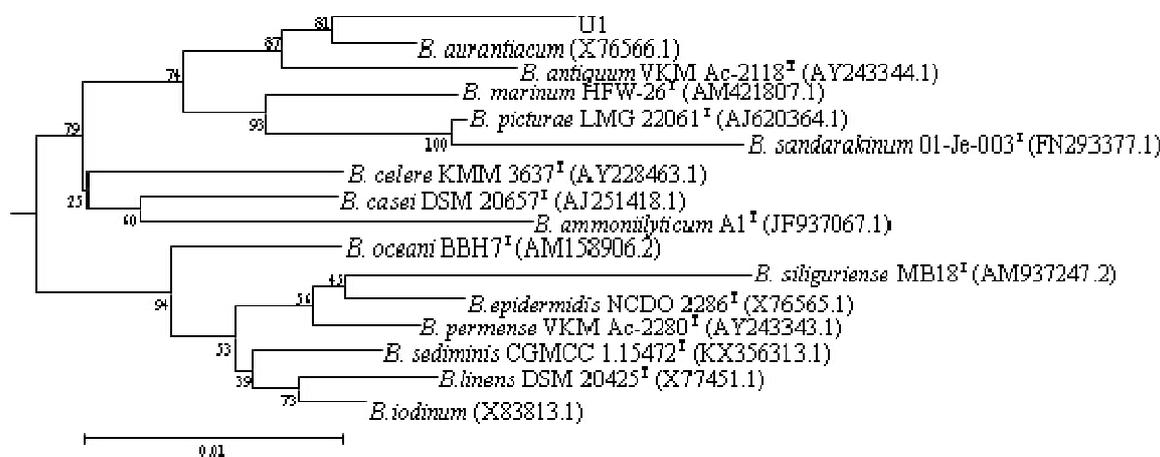


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S рДНК с использованием метода «ближайшего соседа»; масштаб соответствует 1 замене на каждые 100 нуклеотидов

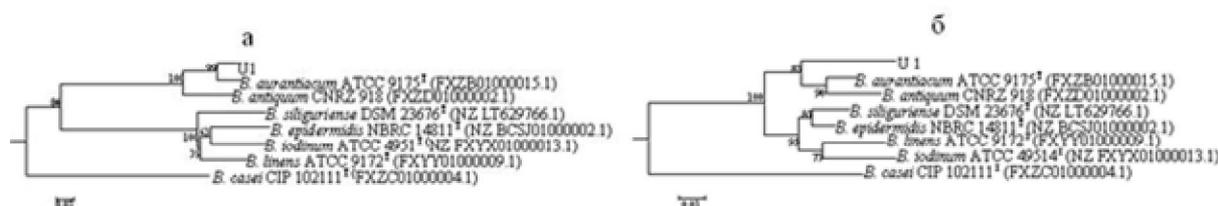


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов (а) *ectB* и (б) *ectC* с использованием метода «ближайшего соседа»; масштаб соответствует 1 замене на каждые 100 нуклеотидов

## Заключение

Полученные в ходе исследования данные выявили высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и генов, кодирующих ферменты биосинтеза эктоина, штамма *Brevibacterium sp. U1* с видом *B. aurantiacum*. Тем не менее, выявлено значительное эволюционное расстояние нуклеотидных последовательностей *ectC*-гена исследованного штамма и близкородственного вида *B. aurantiacum*. В связи с вышеска-

занным можно предположить, что исследуемый штамм может быть представителем нового вида.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353247.

## Библиографический список

Ананьина Л.Н., Шестакова Е.А., Плотникова Е.Г. Детекция генов, кодирующих ферменты биосинтеза эктоина, у актинобактерий, выделен-

- ных из почвы района разработки Верхнекамского соленосного бассейна // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. Вып. 3. С. 264–269.
- Плотникова Е.Г. и др. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
- Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011. Vol. 100. P. 309–316.
- Bernard T. et al. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* // *J. Gen. Microbiol.* 1993. Vol. 139. P. 129–136.
- Cai L. et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships // *Microb. Cell Fact.* 2011. Vol. 1. P. 88.
- Cogan T. M. et al. Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen cheeses // *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2. doi: 10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012.
- Ivanova E.P. et al. *Brevibacterium celere* sp. nov., isolated from degraded thallus of a brown alga // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. Vol. 54. P. 2107–2111.
- Levesque S. et al. Mobilome of *Brevibacterium aurantiacum* sheds light on its genetic diversity and its adaptation to smear-ripened cheeses // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 1270.
- Pham N.P. et al. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat // *BMC Genomics*. 2017. Vol. 7. P. 955.
- Plotnikova E.G. et al. Characterization of microorganisms isolated from technogenic soil of Pre-Urals. *Экология*, N 4 (2006): pp. 261–268. (In Russ.).
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Ind. Microbiol.*, V. 2. (1961): pp. 23–32.
- Widderich N. et al. Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms // *PLoS One*. 2014. Vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0093809.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds). *Current protocols in molecular biology*. 3rd edn. Wiley; New York, 1995.
- ed from the soil of area of industrial development of the upperkamian salted basin]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 3 (2018): pp. 264–269. (In Russ.).
- Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. V. 100 (2011): pp. 309–316.
- Bernard T. et al. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* V. 139 (1993): pp. 129–136.
- Cai L. et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microb. Cell Fact.* V. 1 (2011): pp. 88.
- Cogan T. M. et al. Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen cheeses. *Microbiol. Spectr.* V. 2 (2014). doi: 10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012
- Ivanova E.P. et al. *Brevibacterium celere* sp. nov., isolated from degraded thallus of a brown alga. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 54 (2004): pp. 2107–2111.
- Levesque S. et al. Mobilome of *Brevibacterium aurantiacum* sheds light on its genetic diversity and its adaptation to smear-ripened cheeses. *Front. Microbiol.* V. 10 (2019): p. 1270.
- Pham N.P. et al. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*. V. 7 (2017): p. 955.
- Plotnikova E.G. et al. Characterization of microorganisms isolated from technogenic soil of Pre-Urals. *Экология*, N 4 (2006): pp. 261–268. (In Russ.).
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Ind. Microbiol.*, V. 2. (1961): pp. 23–32.
- Widderich N. et al. Biochemical properties of ectoine hydroxylases from extremophiles and their wider taxonomic distribution among microorganisms. *PLoS One*, V. 8 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0093809.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (eds.) *Current protocols in molecular biology*, 3rd edn. Wiley, New York, 1995.

## References

Anan'ina L.N., Shestakova E.A., Plotnikova E.G. [Detection of the genes coding ectoine biosynthesis enzymes for halotolerant actinobacteria isolated

Поступила в редакцию 12.09.2019

**Об авторе**

Ананьина Людмила Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0003-4721-2863  
614081, Пермь, ул. Голева, 13;  
ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

**About the author**

Anan'ina Lyudmila Nikolaevna, candidate of biology, researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism  
UB RAS.  
**ORCID:** 0000-0003-4721-2863  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
ludaananyina@mail.ru; (342)2808431

**Информация для цитирования:**

Ананьина Л.Н. Филогенетическое положение галотолерантного штамма *Brevibacterium* sp. U1, выделенного из засоленной почвы, в системе рода *Brevibacterium* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 4. С. 459–463. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-459-463.

Anan'ina L.N. [Phylogenetic status of the halotolerant strain *Brevibacterium* sp. U1, isolated from saline soil, in the *Brevibacterium* genus system]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 4 (2019): pp. 459-463. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-4-459-463.

