
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 578.81+578.23

ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

© 2024 г. А. Д. Новиков^{а, *}, И. П. Токмакова^а, А. А. Самарин^а,
К. В. Лавров^а, А. С. Яненко^а

^аНИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, 123182, Россия

*e-mail: alexm19@mail.ru

Поступила в редакцию 25.10.2023 г.

После исправления 23.12.2023 г.

Принята к опубликованию 25.12.2023 г.

Впервые были выделены бактериофаги, специфичные для *Rhodococcus aetherivorans*, и впервые была показана перспективность беспозвоночных (в частности, *Hyalophora cecropia*, *Eisenia fetida*) как объектов для скрининга фаговой флоры представителей рода *Rhodococcus*. Часть выделенных фагов была способна расти на *R. ruber* и *R. qingshengii*. Была разработана эффективная методика размножения бактериофага в жидкой культуре *R. aetherivorans*. Найденные бактериофаги могут быть использованы для разработки эффективных генетических инструментов для *Rhodococcus*, в том числе и промышленно значимых штаммов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, бактериофаг, микробиота беспозвоночных, рекомбиназы, гесЕТ

DOI: 10.31857/S0026365624040084

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают большим биотехнологическим потенциалом в силу их способностей к биотрансформации и биосинтезу широкого круга органических молекул, таких, как лигноцеллюлоза, акриловые мономеры, триацил-глицеролы, полигидроксиалканоаты, гликолипидные биосурфактанты, стероиды (Larkin et al., 2005; Martinkova et al., 2009; Kim et al., 2018). Разработка высокоактивных промышленно-значимых штаммов этих бактерий сдерживается ограниченной доступностью методов редактирования их генома, а именно, методов введения, замены и удаления генов, фрагментов генома и отдельных нуклеотидов (см. Grechishnikova et al., 2022; Liang et al., 2021).

Одним из путей расширения арсенала таких методов является поиск новых генов, кодирующих эффективные нуклеазы, рекомбиназы, интегразы, то есть ферменты, способные направленно изменять последовательность ДНК. Богатейшим источником разнообразия таких генов являются геномы бактериофагов, поэтому обнаруживаемые в природе фаги могут быть ценным источником генетического инструментария такого рода. Для бактерий *E. coli* сегодня активно применяются методы редактирования генома, основанные на рекомбинационных системах бактериофагов (Bubnov et al., 2022). Как правило, активность

у фаговых рекомбиназ существенно выше, чем у бактериальных, что и является решающим фактором для их широкого применения. Для бактерий *Rhodococcus* такие подходы пока единичны (Liang et al., 2020), в первую очередь из-за недостатка эффективно работающих в родококках рекомбиназ. Эффективность функционирования фаговых генов в *Rhodococcus* (как и в клетках бактерий других родов) существенно зависит от оптимизированности их экспрессии, т.е. сходных с хозяином кодонных предпочтений и других особенностей. В силу этого, наиболее перспективным путем поиска новых ферментов для редактирования в *Rhodococcus* является поиск бактериофагов, способных размножаться на культурах этих бактерий. В российских и зарубежных коллекциях микроорганизмов количество таких изолятов невелико по сравнению с бактериофагами *E. coli*.

Мы провели анализ находящихся в открытом доступе геномов фагов, специфичных в отношении *Rhodococcus* (более 70), и выяснили, что лишь три генома содержат рекомбиназы RecET семейства, для которых показана функциональность в бактериях. Эти результаты указывают на то, что для расширения разнообразия рекомбиназ и выбора наиболее эффективных из них необходим поиск новых бактериофагов, специфичных в отношении *Rhodococcus*.

Целями настоящей работы были поиск в природе бактериофагов, способных размножаться на промышленно-значимых штаммах *Rhodococcus*, определение видоспецифичности изолятов и оптимизация методики выделения ДНК таких фагов, пригодной для молекулярно-биологических исследований.

В качестве бактерий-хозяев для исследования были выбраны промышленно значимые штаммы-биокатализаторы из коллекции ВКПМ *R. aetherivorans* Ac-926 (SU 1731814, 1990) и *R. aetherivorans* Ac-2610 (US 20140187818A1, 2014).

Бактерии рода *Rhodococcus* являются типичными представителями почвенной микрофлоры. Однако ряд штаммов был обнаружен в составе микробиоты кровососущих насекомых (Yassin, 2005), различных полужесткокрылых (Salcedo-Porras et al., 2020), микробиоты тараканов (Guzman et al., 2021) и в кишечнике некоторых вредителей сельскохозяйственных культур. В связи с этим поиск штаммов проводился не только в разнообразных почвенных, компостных и водных образцах, полученных из различных природных зон, но также и в образцах экскрементов различных насекомых и иных беспозвоночных (*Hyalophora cecropia*, *Medauroidea extradentata*, *Peruphasma schultei*, *Sungaya inexpectata*, *Eisenia fetida*).

Фаги были изолированы методом обогащения (по Summer et al., 2011). Для этого 10–15 г материала образцов смешивали с 50 мл стерильной жидкой среды LB (триптон казеиновый – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 7 г, H₂O_{дист.} – до 1 л; pH 7.0), содержащей 1% хлороформа, инкубировали 4 ч при 30°C, 300 об./мин, затем отделяли осадок центрифугированием (10 мин, 10 тыс. об./мин). Надосадочную жидкость фильтровали через 0.22 мкм шприцевой фильтр (“Merck”), затем не менее 5 мл фильтрата добавляли к 45 мл культуры *R. aetherivorans* в среде LB в логарифмической стадии роста (ОП₆₀₀ 0.6), с последующей инкубацией в течение 4 ч при 30°C без перемешивания. Далее культуру продолжали культивировать в течение ночи при 30°C, 300 об./мин. Далее добавляли хлороформ до 1% и продолжали инкубирование при тех же условиях в течение 30 мин. После инкубации отделяли бактериальную биомассу центрифугированием с последующим фильтрованием через 0.22 мкм фильтр, фильтрат использовали для дальнейшей работы. Для изоляции, получения чистых культур и наработки посевных культур бактериофагов и культур штаммов-хозяев использовали агаризованную среду LB (для получения агаризованной среды дополнительно добавлялся агар-агар, 15 г/л). Верхний агар имел следующий состав (г/л): триптон казеиновый – 10, NaCl – 5, агар-агар – 10, H₂O_{дист.} – до 1 л; pH 7.0. После автоклавирования в верхний агар добавляли 5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5 mM CaCl₂ и глюкозу до 0.04%.

Для получения негативных колоний бактериофагов из обогащенных культур 1 мл фильтрата смешивали с 1 мл расплавленного и охлажденного до 48°C верхнего агара с суспензией клеток *Rhodococcus* (конечная концентрация агар-агара в верхнем агаре 0.5%). При необходимости использовали разведение фильтрата. Чистые культуры бактериофагов получали путем неоднократной изоляции отдельной негативной колонии, ее суспендирования в фаговом буфере (10 mM Tris·HCl с pH 7.6, 5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% желатин), разведения и посева (не менее 3–4 “раундов” очистки).

Наибольшее разнообразие штаммов бактериофагов *R. aetherivorans* удалось обнаружить в образцах зрелых компостов из различных географических зон, а также из экскрементов гусениц и дождевых червей. Насколько нам известно, это первое сообщение о выделении бактериофагов, специфичных для *R. aetherivorans*. Кроме того, мы впервые показали, что экскременты беспозвоночных являются перспективным источником бактериофагов родококков. Из водных образцов, взятых как в морских, так и пресных биотопах, выделить бактериофаги *Rhodococcus* не удалось.

Часть чистых культур фагов были использованы для капельного теста на видоспецифичность, проводившегося, как описано ранее, (Бактериофаги, 2012) на штаммах, полученных из ВКПМ. Анализ бактериофагов, выделенных из микробиоты *Hyalophora cecropia*, показал частичную перекрестную видоспецифичность с *R. ruber* Ac-1801, *R. qingshengii* Ac-1800, *R. qingshengii* Ac-1793, но не со штаммами *R. erythropolis* и *R. rhodochrous*. Большинство из протестированных изолятов (15 изолятов) были специфичны по отношению к *R. aetherivorans* (табл. 1).

Полученные изоляты были депонированы в НБРЦ ВКПМ.

На последнем этапе нашей работы, для получения больших объемов фаголизатов с высоким титром для целей выделения ДНК для секвенирования, депонирования штаммов и закладки их в лабораторную коллекцию нами была разработана методика наработки бактериофагов с использованием жидких культур *R. aetherivorans*. Культивирование проводили в 50 мл разбавленной среды LB (г/л): триптон – 5, дрожжевой экстракт – 2.5, NaCl – 4. Колбы Эрленмейера с 50 мл среды засеивали ночной культурой *R. aetherivorans* до ОП₆₀₀ не менее 0.8, после чего заражали посевной культурой бактериофага (конечные значения титра – не менее 10⁵ БОЕ/колбу). Посевные культуры для получения больших объемов фаголизатов получали путем смыва верхнего агара фаговым буфером с последующим фильтрованием через 0.22-мкм шприцевые фильтры. Зараженную фагом культуру культивировали в термостате при 30°C без перемешивания в течение не менее 4 ч с последующим культивированием не менее 12 ч при 30°C, 300 об./мин.

Таблица 1. Оценка видоспецифичности выделенных фагов в отношении некоторых видов рода *Rhodococcus*

№ штамма	<i>R. aetherivorans</i> M33	<i>R. aetherivorans</i> Ac-2063	<i>R. ruber</i> Ac-1801	<i>R. qingshengii</i> Ac-1800	<i>R. qingshengii</i> Ac-1793	<i>R. erythropolis</i> Ac-1737	<i>R. rhodochrous</i> Ac-1572
11	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
12	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
13	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
14	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
15	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
16	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
32	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
33	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
34	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
35	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
36	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
37	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
38	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
39	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C1	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C2	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Нет	Нет	Нет	Нет
C3	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C4	Лизис	Лизис	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
C5	Лизис	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Нет	Нет
C6	Лизис	Лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Неполный лизис	Нет	Нет

Примечание. Штаммы 11–39 были выделены из различных образцов компоста; штаммы C1–C6 были выделены из экскрементов *Hyalophora cecropia*. Показаны не все выделенные штаммы.

Дополнительный цикл культивирования – 4 ч 30°C без перемешивания, с последующим культивированием не менее 4 ч при 30°C и 300 об./мин повышал выход бактериофага примерно на 10%. Далее к фаголизату добавляли хлороформ до конечной концентрации 0.1% и культивирование с перемешиванием продолжали еще 30 мин. Лизат центрифугировали при 4°C, 12000 об./мин и фильтровали через 0.22-мкм шприцевые фильтры (“Merck”). Титр бактериофагов в лизатах, приготовленных таким образом, колебался от 10⁹ до 10¹¹ БОЕ/мл (в зависимости от штамма).

Геномную ДНК бактериофагов выделяли фенольным методом, как описано в работе (Petrovski et al., 2011), со следующей модификацией: перед стадией обработки фенолом образец смешивали с равным объемом гуанидинового буфера (Тритон

X100 3%, гуанидин гидрохлорид 5%, Трис HCl pH 8.0 10 mM, ЭДТА 0.2 mM, H₂O_{dist} – до 1 л).

Геномная ДНК из найденных нами 25 новых штаммов бактериофагов *R. aetherivorans* была выделена, как описано выше. Качество препаратов геномной ДНК проверяли гель-электрофорезом, рестрикционным анализом и ПЦР. Оказалось, что препараты ДНК выглядели как гомогенная полоса с молекулярным весом около 40 т.п.н., что говорит об отсутствии значительных примесей более тяжелой хромосомной ДНК бактерий и продуктов ее деградации. При гидролизе рестриктазами ДНК бактериофагов давала характерный воспроизводимый профиль фрагментов различного веса (данные не приведены), что указывает на достаточную для молекулярно-биологических операций чистоту препарата.

Таким образом, в работе впервые были выделены бактериофаги, специфичные для *R. aetherivorans*, и впервые была показана перспективность беспозвоночных как объектов для скрининга фаговой флоры представителей рода *Rhodococcus*. Была разработана методика наработки суспензий бактериофагов с высоким титром с использованием жидких культур *R. aetherivorans*. Найденные бактериофаги могут быть использованы для разработки эффективных молекулярно-биологических инструментов для *Rhodococcus aetherivorans*, в том числе и промышленно значимых штаммов представителей этого вида.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику ООО “ДНК Экспертиза” Радченко В.В. и коллективу Сибирского ботанического сада ТГУ (г. Томск) за предоставленные образцы экскрементов беспозвоночных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ Курчатовский институт, при частичной поддержке Соглашения МОН 075-15-2019-1659 о создании геномных центров мирового уровня (выделение и анализ ДНК бактериофагов).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бактериофаги. Биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А.М. Сулаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. 640 с.
- Bubnov D.M., Yuzbashev T.V., Khozov A.A., Melkina O.E., Vybornaya T.V., Stan G.B., Sineoky S.P. Robust counterselection and advanced λ Red recombineering enable markerless chromosomal integration of large heterologous constructs // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. P. 8947–8960.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac649>
- Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. *Rhodococcus*: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2023. V. 43. P. 835–850.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2091976>
- Guzman J., Vilcinskas A. Draft genome sequence of *Rhodococcus rhodochrous* strain G38GP, isolated from the Madagascar hissing cockroach // *Microbiol. Resour. Announc.* 2021. V. 10. Art. e0077721.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00777-21>
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 28. P. 1037–1051.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. P. 282–290.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.007>
- Liang Y., Jiao S., Wang M., Yu H., Shen Z. A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH // *Metab. Engin.* 2020. V. 57. P. 13–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.10.003>
- Liang Y.X., Yu H.M. Genetic toolkits for engineering *Rhodococcus* species with versatile applications // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 49. Art. 107748.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107748>
- Martinkova L., Uhnakova B., Patek M., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // *Environ. Int.* 2009. V. 35. P. 162–177.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- Salcedo-Porras N., Umana-Diaz C., de Oliveira Barbosa Bitencourt R., Lowenberger C. The role of bacterial symbionts in triatomines: an evolutionary perspective // *Microorganisms.* 2020. V. 8. Art. 1438.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091438>
- Summer E.J., Liu M., Gill J.J., Grant M., Chan-Cortes T.N., Ferguson L., Janes C., Lange K., Bertoli M., Moore C., Orchard R.C., Cohen N.D., Young R. Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 669–683.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01952-10>
- Yassin A.F. *Rhodococcus triatoma* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1575–1579.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63571-0>
- Патент СССР. 1990. № SU1731814.
- Патент США. 2014. № US20140187818A1.

SHORT COMMUNICATIONS

**Search for Bacteriophages Specific against Members
of the Genus *Rhodococcus*****A. D. Novikov^{1, *}, I. P. Tokmakova¹, A. A. Samarin¹, K. V. Lavrov¹, and A. S. Yanenko¹**¹NRC "Kurchatov Institute", Kurchatov Genomic Center, 123182 Russia

*e-mail: alexm19@mail.ru

Received October 25, 2023; revised December 23, 2023; accepted December 25, 2023

Abstract. This is the first report on the isolation of *Rhodococcus aetherivorans*-specific bacteriophages and of applicability of such invertebrates as *Hyalophora cecropia* and *Eisenia fetida* as objects for screening the phage microflora of *Rhodococcus* species. Some of the isolated phages were capable of growth of *R. ruber* and *R. qingshengii*. An efficient procedure for bacteriophage reproduction in the liquid culture of *R. aetherivorans* was developed. The revealed bacteriophages may be used for development of efficient genetic tools for *Rhodococcus* strains, including the industrially significant ones.

Keywords: *Rhodococcus*, bacteriophage, invertebrate microbiota, recombinases, recET