

УДК 579.258:574.24+579.222

## АЛКАН МОНООКСИГЕНАЗА *ALKB1* ШТАММА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* X5 НЕ ОБЯЗАТЕЛЬНА ДЛЯ РОСТА НА АЛКАНАХ

© 2024 г. К. В. Петриков<sup>а, \*</sup>, А. А. Режепова<sup>а</sup>, И. Ю. Позднякова-Филатова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН –  
особое подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290, Россия

\*e-mail: petrikov\_kv@pbcra.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 22.12.2023 г.

Принята к опубликованию 29.01.2024 г.

Изучение монооксигеназных систем, отвечающих за первичное окисление алканов, необходимо для понимания бактериального метаболизма этих углеводов. Выполненный анализ генома штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 показал большое разнообразие генов, кодирующих соответствующие ферменты, в том числе 5 гомологов алкан монооксигеназ AlkB-типа. Был сконструирован штамм, дефектный по гену *alkB1*. Сравнение способности штамма дикого типа и мутантного штамма к росту на алканах с различной длиной цепи при двух температурах (6 и 28°C) показало сохранение базового фенотипа: хотя рост мутанта при низкой температуре был ослаблен, спектр окисляемых субстратов не изменился. Это говорит о наличии других функционирующих монооксигеназных систем, активных при разных температурах в отношении широкого спектра алканов.

**Ключевые слова:** алкан монооксигеназы, алкан гидроксилазы, родококки, нефтедеструкторы, психротрофы, биодegradация

DOI: 10.31857/S0026365624050132

Микроорганизмы, способные к использованию углеводов в качестве единственного ростового субстрата, достаточно широко распространены в природе (Long et al., 2017; Tomasino et al., 2021). Бактериальная деградация углеводов не только вносит существенный вклад в естественный цикл углерода, но и находит практическое применение в технологиях биоремедиации, используемых при ликвидации последствий антропогенного загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами (Ławniczak et al., 2020). Типичным классом нефтяных углеводов являются алканы, поступление которых в окружающую среду обусловлено не только добычей и переработкой полезных ископаемых, но и разнообразными естественными источниками (Wiesenberg et al., 2009; Schulz et al., 2012).

Ключевыми ферментами бактериального метаболизма алканов являются алкан монооксигеназы, катализирующие реакцию гидроксирования субстрата (Moreno, Rojo, 2017). Известно несколько типов этих ферментов, среди которых к наиболее распространенным у углеводородокисляющих

микроорганизмов относят негемовые мембранные алкан монооксигеназы AlkB-типа, относящиеся к суперсемейству десатураз жирных кислот (Pérez-de-Mora et al., 2011; Smith et al., 2013).

Организация соответствующих генов и путь метаболизма n-алканов в аэробных условиях были достаточно подробно описаны на примере ОСТ-плазмиды штамма *Pseudomonas putida* TF4-1L (GPo1) (van Beilen, Funhoff, 2007). Однако следует отметить, что к настоящему времени значительную долю исследований составляют работы практического характера. Многочисленные алкан-окисляющие системы других микроорганизмов, равно как и важные аспекты их функционирования, например, при адаптации к экстремальным условиям окружающей среды, изучены лишь поверхностно. Понимание особенностей метаболизма алканов важно как с точки зрения получения фундаментальных знаний, так и для расширения возможностей биотехнологического использования бактерий-нефтедеструкторов (Müller et al., 2016; Tsai et al., 2017).

К хорошо известным углеводородокисляющим микроорганизмам относятся представители рода *Rhodococcus* (Kim et al., 2018). Одной из особенностей бактерий этого рода является наличие в геноме до 5 копий гомологичных генов, кодирующих алкан монооксигеназы AlkB-типа (van Beilen et al., 2002). Роль такого разнообразия, особенности функционирования конкретных генетических и ферментных систем остаются до конца не выясненными.

Целью настоящей работы было определение роли гена *alkB1* в метаболизме алканов у штамма *Rhodococcus qingshengii* X5 при умеренной и низкой положительной температурах.

Штамм *Rhodococcus qingshengii* (*erythropolis*) X5 (ВКМ Ас-2532Д) получен из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН. Полные аннотированные геномные последовательности *R. qingshengii* X5, включающие кольцевую хромосому и линейную плазмиду, депонированы в GenBank (номера CP044284 и CP044283 соответственно) (Delegan et al., 2019).

Для выращивания культур использовали лизогенный бульон (среда LB) (Sambrook, Russell, 2001), плотную среду получали добавлением 2% вес. агара. При необходимости вносили добавки, как указано далее.

Оценку способности изучаемых штаммов к росту на различных алканах выполняли визуально. Культивирование проводили на модифицированной минеральной среде Эванса (среда E) (Petrikov et al., 2013) в течение 4 сут при 27°C и 25 сут при 6°C. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли алканы в количестве 2% об. для жидких (н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-гексадекан, пристан, изоцетан) и 0.5% вес. для твердых (н-эйкозан, н-докозан, смесь парафинов C<sub>46</sub>–C<sub>48</sub>); выращивание с н-октаном проводили в пара́х, внося субстрат в специальный отросток.

Выравнивание последовательностей и построение филогенетического дерева выполняли в программе MEGA X (Kumar et al., 2018).

Штамм *R. qingshengii* X5, дефектный по гену *alkB1* (координаты гена в GenBank CP044284: 844 049..845 224), конструировали путем замены этого гена на мутантный аллель при помощи гомологичной рекомбинации. Два фрагмента, фланкирующих целевой ген, амплифицировали, используя две пары праймеров: *alkB1\_up\_F* (5'-CGGCCGCTCTAGAAGTAGTGTGGCCATATCGGGAGGACG-3') и *alkB1\_up\_R* (5'-CATCGAATTCTCCAGTTCTCGTTC-3') для upstream-участка, *alkB1\_down\_F* (5'-GACGAGAAGTGGAGAATTCGATGGCCTACGGGTGGAACGCATG-3') и *alkB1\_down\_R* (5'-CGAATTCCTGCAGCCCGGGGGTAGTTTCCTTCGACAGCGCC-3') для downstream-участка. Полученные фрагменты клонировали в плазмидном векторе pJQ200KS по методу T5 exonuclease DNA assembly (Xia et al., 2019). Скрещивание штамма-донора *E. coli* S17-1(pJQ200KSΔ*alkB1*) и штамма-реципиента *R. qingshengii* X5 проводили на плотной среде LB с добавлением гентамицина (80 мкг/мл) и налидиксовой кислоты (10 мкг/мл). Для обнаружения меродиплоидов устойчивые клоны тестировали методом ПЦР. Отбор продуктов двойного кроссинговера проводили на среде LB с добавлением сахарозы (20% вес.). У клонов, устойчивых к сахарозе и чувствительных к гентамицину, наличие делеции гена *alkB1* проверяли с помощью ПЦР с парой специфичных праймеров, расположенных upstream и downstream от целевой мутации: *alkB1\_seq\_F* (5'-ACGACCAAAGGGCCGTATTT-3') и *alkB1\_seq\_R* (5'-TCGATACCCTGCTCGGTCC-3') при следующих условиях: 98°C – 3 мин, далее 30 циклов: 98°C – 10 с, 60°C – 20 с, 72°C – 1 мин 30 с, финальная достройка: 72°C – 2 мин. Корректность мутации подтверждали с помощью

**Таблица.** Характеристика способности штамма дикого типа *R. qingshengii* X5 и мутантного штамма *R. qingshengii* X5(Δ*alkB1*), содержащего делецию гена *alkB1*, к росту на алканах при двух температурах

Субстрат	<i>R. qingshengii</i> X5		<i>R. qingshengii</i> X5(Δ <i>alkB1</i> )	
	6°C	28°C	6°C	28°C
н-Октан	Н.п.	+	Н.п.	+
н-Декан	+	++	+	++
н-Ундекан	++	++	+	++
н-Додекан	++	++	++	++
н-Гексадекан	++	++	+	++
н-Эйкозан	++	++	+	++
н-Докозан	++	++	+	++
Смесь C <sub>46</sub> –C <sub>48</sub>	+	++	+	++
Пристан	0	++	0	++
Изоцетан	0	0	0	0

Примечание. ++ – Интенсивный рост; + – умеренный рост; 0 – отсутствие роста; н.п. – не проверялась.

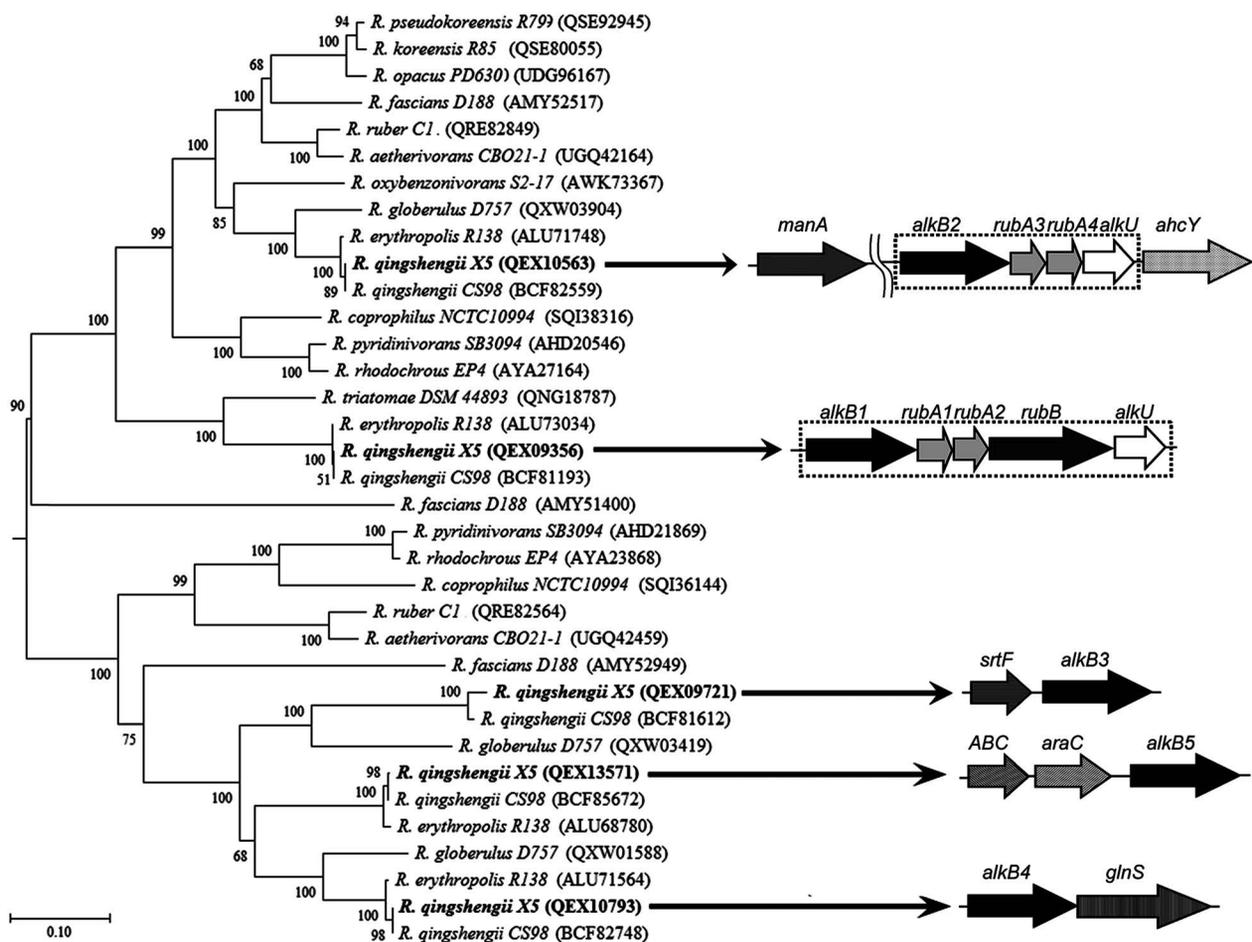
секвенирования по Сэнгеру с праймерами *alkB1\_seq\_F* и *alkB1\_seq\_R*.

В нашей работе была получена характеристика способности к росту штамма *R. qingshengii* X5 на различных алканах при двух температурах (таблица). Интенсивный рост был отмечен для обеих температур на всем спектре проверенных линейных алканов.

Кроме *n*-алканов в качестве субстратов были использованы и два разветвленных алкана: пристан, у которого субтерминальный атом углерода является третичным, и изоцетан, с четвертичным субтерминальным атомом углерода. Известно, что разветвленные алканы значительно хуже подвергаются биодegradации, чем линейные, и деструкторы таких соединений встречаются гораздо реже (Rojo, 2009).

В нашей работе рост на пристане у штамма *R. qingshengii* X5 наблюдался только при 28°C, а потреблять изоцетан штамм оказался неспособен. Ранее было описано несколько представителей родококков, растущих на пристане: *R. erythropolis* E1 (Sokolovska et al., 2003), *Rhodococcus* sp. TMP2 (Kunihiro et al., 2005), *Rhodococcus* sp. 094 (также не мог потреблять изоцетан) (Bredholt, Eimhjellen, 1999), но о зависимости этой способности от температуры не сообщалось.

Полученные результаты говорят о наличии у штамма *R. qingshengii* X5 алкан-деградирующих систем с широкой субстратной специфичностью, сохраняющих активность и при низких положительных температурах.



**Рисунок.** Слева: филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей алкан монооксигеназ AlkB-типа представителей рода *Rhodococcus*, построенное по методу Neighbor-Joining; бутстреппы рассчитаны для 1000 повторений, величина поддержки бутстрепа указана цифрами. Последовательности штамма *R. qingshengii* X5 выделены жирным шрифтом. Стрелками отмечено соответствие консервативному региону. Справа: организация консервативных регионов, в которых локализованы гены *alkB* разных подтипов. Рамкой обведены кластеры функциональных генов, непосредственно участвующих в метаболизме алканов. Обозначения генов: *alkB1-alkB5* – алкан монооксигеназы соответствующего подтипа; *rubA1-rubA4* – рубредоксины; *rubB* – рубредоксин редуктаза; *alkU* – регуляторный белок семейства TetR; *manA* – маннозо-6-фосфат изомеразы; *ahcY* – аденозил гомоцистеиназа; *srtF* – сортаза типа F; *glnS* – глутамил-тРНК синтаза; ABC – белок-транспортер; *araC* – транскрипционный регулятор AraC-типа.

В соответствии с представленной в базе данных GenBank аннотацией, в геноме штамма *R. qingshengii* X5 содержатся 5 генов алкан монооксигеназ AlkB-типа, все имеют хромосомную локализацию. Впервые такое разнообразие генов *alkB* у родококков было показано в работе van Beilen et al. (2002). Затем этой же группой было предложено разделить обнаруженные гены на 4 группы, отличающиеся не только соответствующей кластеризацией нуклеотидных последовательностей, но и локализацией в характерных регионах генома, сохраняющих консервативность окружения (Whyte et al., 2002). Так, гены подтипа *alkB1* располагались в кластере, включающем в себя гены других необходимых участников реакции гидроксилирования алканов: рубредоксина (две копии, *rubA1* и *rubA2*) и рубредоксин редуктазы (*rubB*), также в кластер входит ген регуляторного белка AlkU, относящегося к семейству TetR. Ген *alkB2* отличался отсутствием в кластере гена *rubB*, к консервативному окружению гена *alkB3* относился ген сортазы класса F, а *alkB4* – глутамил-тРНК синтазы (Whyte et al., 2002). Впоследствии были опубликованы работы, сообщающие об обнаружении новых подтипов генов *alkB* у родококков (Takei et al., 2008; Xiang et al., 2022). К настоящему времени для генов из окружения всех подтипов *alkB*, кроме 1 и 2, не известно никакой функциональной связи с потреблением алканов.

По результатам филогенетического анализа можно заключить, что каждая из 5 алкан монооксигеназ относится к своему подтипу, которые характерны для представителей рода *Rhodococcus* (рисунок).

Поскольку кластер гена *alkB1* содержит функционально необходимые для окисления алканов детерминанты, он представляется важнейшим среди всех остальных гомологов *alkB*. Ранее была показана сильная связь индукции генов этого типа с ростом на алканах (Takei et al., 2008; Gibu et al., 2019), а в экспериментах по гетерологичной экспрессии – связь гена с деградирующей активностью (Zampolli et al., 2014). Исходя из этого, ген был выбран как целевой для получения мутантного штамма с соответствующей делецией.

В ходе выполнения настоящей работы был получен мутантный штамм *R. qingshengii* X5Δ*alkB1*, содержащий делецию гена *alkB1*, кодирующего алкан монооксигеназу AlkB1 (QEX09356.1). Была проведена оценка его способности к росту в тех же условиях, что и для штамма дикого типа (таблица). В результате у мутантного штамма наблюдалось ослабление роста при температуре 6°C для некоторых алканов, однако полностью способность к их потреблению не пропадала. При 28°C различий между фенотипами мутантного штамма и штамма дикого типа не было обнаружено.

Таким образом, очевидно, что ген *alkB1* не является обязательным элементом для метаболизма алканов у штамма X5. Вероятно, этот ген играет существенную роль для потребления алканов при низких температурах, но и в этом случае очевидно наличие других функционирующих в таких условиях систем.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00192, <https://rscf.ru/project/23-24-00192/>

## 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

- Bredholt H., Eimhjellen K. Induction and development of the oil emulsifying system in an alkane oxidizing *Rhodococcus* species // Can. J. Microbiol. 1999. V. 45. P. 700–708.
- Delegan Y., Valentovich L., Petrikov K., Vetrova A., Akhremchuk A., Akimov V. Complete genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* X5, a psychrotrophic hydrocarbon-degrading biosurfactant-producing bacterium // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. Art. e01234-19.
- Gibu N., Kasai D., Ikawa T., Akiyama E., Fukuda M. Characterization and transcriptional regulation of *n*-alkane hydroxylase gene cluster of *Rhodococcus jostii* RHA1 // Microorganisms. 2019. V. 7. Art. 479.
- 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.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Kunihiro N., Haruki M., Takano K., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures // J. Biotechnol. 2005. V. 115. P. 129–136.

- Lawniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: a review // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 856.
- Long H., Wang Y., Chang S., Liu G., Chen T., Huo G., Zhang W., Wu X., Tai X., Sun L., Zhang B. Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes from the Qinghai-Tibet Plateau // *Environ. Monit. Assess.* 2017. V. 189. Art. 116.
- Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria // *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* / Ed. F. Rojo. Springer International Publishing, 2017. P. 1–25.
- Müller C.A., Weingartner A.M., Dennig A., Ruff A.J., Gröger H., Schwaneberg U. A whole cell biocatalyst for double oxidation of cyclooctane // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 43. P. 1641–1646.
- Pérez-de-Mora A., Engel M., Schloter M. Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes // *Microbiol. Ecol.* 2011. V. 62. P. 959–972.
- Petrikov K., Deegan Y., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: formation and structure // *Proc. Biochem.* 2013. V. 48. P. 931–935.
- Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2477–2490.
- Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Schulz S., Giebler J., Chatzinotas A., Wick L.Y., Fetzer I., Welzl G., Harms H., Schloter M. Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of *alkB* harbouring microbes in different soil compartments // *ISME J.* 2012. V. 6. P. 1763–1774.
- Smith C.B., Tolar B.B., Hollibaugh J.T., King G.M. Alkane hydroxylase gene (*alkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. Art. 730.
- Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 7019–7027.
- Takei D., Washio K., Morikawa M. Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. P. 1447–1452.
- Tomasino M., Aparício M., Ribeiro I., Santos F., Caetano M., Almeida C., de Fátima Carvalho M., Mucha A. Diversity and hydrocarbon-degrading potential of deep-sea microbial community from the Mid-Atlantic Ridge, south of the Azores (North Atlantic Ocean) // *Microorganisms*. 2021. V. 9. Art. 2389.
- Tsai Y.-F., Luo W.-I., Chang J.-L., Chang C.-W., Chuang H.-C., Ramu R., Wei G.-T., Zen J.-M., Yu S.S.-F. Electrochemical hydroxylation of C3–C12 *n*-alkanes by recombinant alkane hydroxylase (AlkB) and rubredoxin-2 (AlkG) from *Pseudomonas putida* GPo1 // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 8369.
- van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 13–21.
- van Beilen J.B., Smits T.H.M., Whyte L.G., Schorcht S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Engesser K.-H., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains // *Environ. Microbiol.* 2002. V. 4. P. 676–682.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5933–5942.
- Wiesenberg G.L.B., Lehndorff E., Schwark L. Thermal degradation of rye and maize straw: Lipid pattern changes as a function of temperature // *Org. Geochem.* 2009. V. 40. P. 167–174.
- Xia Y., Li K., Li J., Wang T., Gu L., Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. P. e15.
- Xiang W., Liang Y., Hong S., Wang G., You J., Xue Y., Ma Y. Degradation of long-chain *n*-alkanes by a novel thermal-tolerant *Rhodococcus* strain // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. Art. 259.
- Zampolli J., Collina E., Lasagni M., Di Gennaro P. Biodegradation of variable-chain-length *n*-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism // *AMB Express*. 2014. V. 4. Art. 73.

## Alkane Monooxygenase AlkB1 of *Rhodococcus qingshengii* strain X5 Does not Required for Growth on Alkanes

K. V. Petrikov<sup>1, \*</sup>, A. A. Rejepova<sup>1</sup>, I. Y. Pozdnyakova-Filatova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",  
Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290, Pushchino, Russia

\*e-mail: petrikov\_kv@pbcras.ru

**Abstract.** The study of monooxygenase systems responsible for the primary oxidation of alkanes is necessary to understand the bacterial metabolism of these hydrocarbons. Genome analysis of the *Rhodococcus qingshengii* strain X5 showed a wide variety of genes encoding the corresponding enzymes, including 5 homologs of AlkB-type alkane monooxygenases. A strain with knockout of the *alkB1* gene was constructed. A comparison of the ability of the wild-type strain and the mutant strain to grow on alkanes of various lengths at two temperatures (6°C and 28°C) reveals the preservation of the basic phenotype: although the growth of the mutant at low temperatures was weakened, the spectrum of oxidizable substrates did not change. This suggests that other functioning monooxygenase active at different temperatures towards a wide range of alkanes.

**Keywords:** alkane monooxygenases, alkane hydroxylases, rhodococci, oil destructors, psychrotrophs, biodegradation