

УДК 579.674; 573.6.086.835:579.8

Э.Ж. Хасенова*, Г.Ж. Шарипова, Н.Б. Молдагулова, А.Б. Шевцов
РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан
*e-mail: Ecolab@biocenter.kz

Идентификация психотрофных нефтеокисляющих микроорганизмов на основе определения прямой нуклеотидной последовательности 16S rRNA

В статье представлены результаты идентификации психотрофных нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из территорий Западного Казахстана, методом определения прямой нуклеотидной последовательности 16 S rRNA.

Ключевые слова: психотрофные микроорганизмы, идентификация, нуклеотидная последовательность

Э.Ж. Хасенова, Шарипова Г.Ж., Молдагулова Н.Б

16S RNA түзу нуклеотидтік тізбекті анықтау психотрофты мұнайотықтырғыш микроағзаларды сәйкестендіру

Мақалада 16S RNA түзу нуклеотидтік тізбекті анықтау әдісімен Батыс Қазақстан аумағынан бөлініп алынған психотрофты микроағзаларды мұнайотықтырғыш сәйкестендіру нәтижелері көрсетілген.

Түйін сөздер: психотрофты микроағзалар, сәйкестендіру, нуклеотидтік тізбек

Khasenovna E.Zh., Sharipova G.Zh., Moldagulova N.B., Shevtsov A.B.

Identification of psikhrofilny petroleumoxidizing microorganisms on the basis of direct nucleotide sequence 16 S RNA identification

The results of the psikhrofilny petroleumoxidizing microorganisms identification are presented in this article. This microorganisms were allocated from territories of the West Kazakhstan, with the method of direct nucleotide sequence 16 S RNA determination.

Key words: psikhrofilny microorganisms, identification, nucleotide sequence

Современные тенденции развития микробиологии включают, наряду с совершенствованием традиционных методов, активное использование молекулярно-биологических подходов для изучения генетических особенностей микроорганизмов. Многие исследователи используют методы ПЦР и системы олигонуклеотидных праймеров для определения микроорганизмов до вида с помощью амплификации генов отдельных микроорганизмов.

Таким образом, предлагаемая нами идея поиска и изучения свойств психотрофных бактерий, проявляющие высокую нефтедеструктивную активность является весьма актуальной задачей. Применение биопрепаратов-нефтедеструкторов на основе психотрофных нефтеокисляющих микроорганизмов в сочетании с традиционными методами позволит проводить биоремедиационные работы круглый год [1].

Материалы и методы.

Выделение хромосомной ДНК проводили по методу Kate Wilson [2,3]. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop при длине волны 260 нм. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [1] 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R-5' ggACTACCAgggTATСТААТ.

Амплификация фрагмента 16S rRNA гена: реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [1] 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R-5' ggACTACCAgggTATСТААТ в общем объеме 20 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера.

Очистку ПЦР продуктов проводили ферментативным методом, используя *Exonuclease I* (*Fermentas*) и щелочную фосфатазу (*Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas*) [4]. Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Построение филогенетических деревьев проводили с использованием программного обеспечения Mega 3.1 и метода ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ), выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм ClustalW.

Результаты и обсуждение.

Отбор образцов почвенных проб проводили из месторождений Каламкас, Узень, Жетыбай Мангистауской области и магистрального нефтепровода «Павлодар – Шымкент» Южно-Казахстанской области. Выделение психротрофных нефтеокисляющих микроорганизмов проводили из

нефтезагрязненных почв методом накопительных культур и путем высева почвенной суспензии на агаризованную среду Ворошиловой-Диановой, с добавлением в качестве единственного источника углерода и энергии – 1% сырой нефти.

Идентификация штаммов психротрофных углеводородокисляющих бактерий была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank.

Были выделены ДНК психротрофных углеводородокисляющих микроорганизмов. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C – 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации.

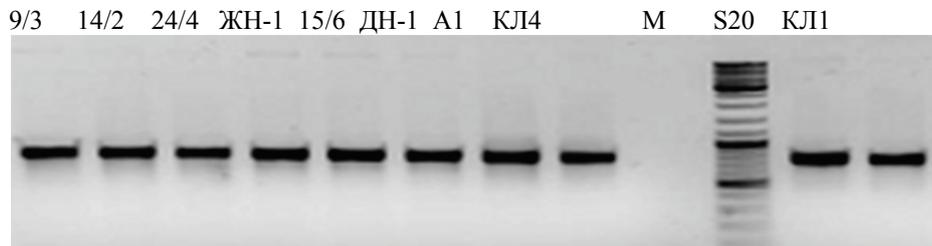


Рисунок 1 – электрофореграмма продуктов амплификации

Определение нуклеотидной последовательности ПЦР продуктов от не связавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя *Exonuclease I* (*Fermentas*) и щелочную фосфатазу (*Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas*) [5].

ПЦР продукты из каждого изолята были секвенированы, нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена идентифицируемых штаммов анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты,

имеющие низкий показатель качества), что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью 730 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST [6, 7]. Результаты идентификации представлены в таблице 1. Как видно на рисунке 2 штамм 14/2 при филогенетическом анализе фрагмента *16S rRNA* гена был при идентификации в Gene Bank находится на одной филогенетической ветви с EU375845 *Dietzia schimae*, X79290 *Dietzia maris*. Высокая нуклеотидная идентичность между данными генами не позволяет провести их видовую идентификацию.

Таблица 1 – результаты идентификации нефтеокисляющих психротрофных микроорганизмов

№ п/н	Наименование	Результат идентификации	Процент гомологии, %
1	9/3	<i>Rodococcus pyridinovorans</i>	99
2	ДН-1	<i>Rodococcus erythropolis</i>	99
3	ЖН-1	<i>Kocuria erytromyxa</i>	98
4	14/2	<i>Dietzia sp.</i>	98
5	А-1	<i>Rodococcus pyridinovorans</i>	98
6	КЛ-1	<i>Rodococcus erythropolis</i>	99
7	КЛ-4	<i>Rodococcus gordoniae</i>	99
8	15/6	<i>Rodococcus pyridinovorans</i>	99
9	S20	<i>Rhodococcus sp.</i>	99

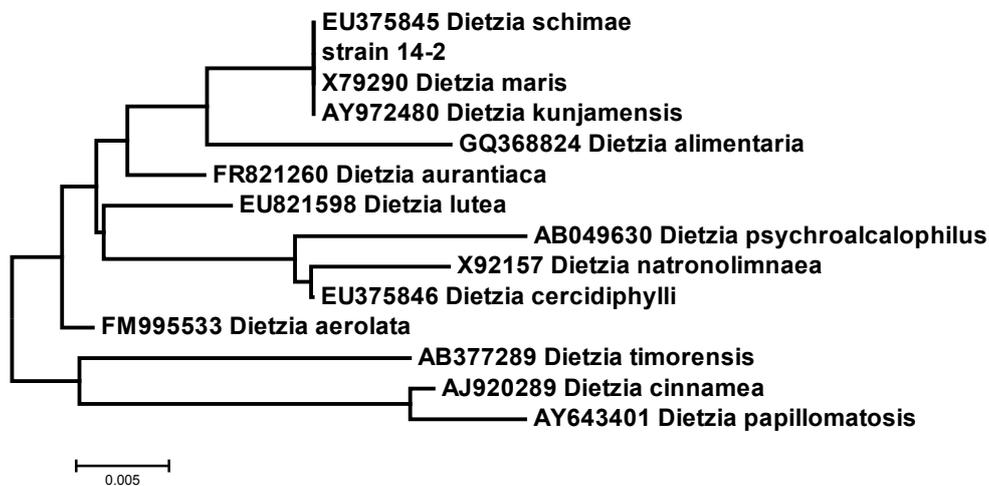


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагмента гена *16S rRNA* группы *Dietzia sp.*

На рисунке 3 видно, что три штамма 9/3, А-1, 15/6 при идентификации в Gene Bank находятся на филогенетической ветви генетически ближе к AF173005 *Rodococcus pyridinovorans*. Штамм КЛ-4 был объединен в один кластер с AY233201 *Rodococcus gordoniae*. При филогенетическом анализе фрагмента *16S rRNA* гена был при идентификации в Gene Bank штаммы ДН-1, КЛ1 идентифицированы как *Rodococcus erythropolis*. Штамм S20 находится на одной филогенетической ветви с AB071951 *Rodococcus baicomurensis*, DQ090961 *Rodococcus gingshengii*. Высокая нуклеотидная

идентичность между данными генами не позволяет провести видовую идентификацию. Как видно на рисунке 4 штамм ЖН-1 при филогенетическом анализе фрагмента *16S rRNA* гена был объединен в один кластер с *Kocuria erytromyxa*.

Таким образом, в результате молекулярно-генетического метода типирования нами идентифицированы нефтеокисляющие штаммы, относящиеся к *Rodococcus*, *Kocuria* и *Dietzia*. Результаты идентификации штаммов методом анализа фрагмента *16S rRNA* гена могут быть использованы, как молекулярно-биологическая характеристика штаммов.

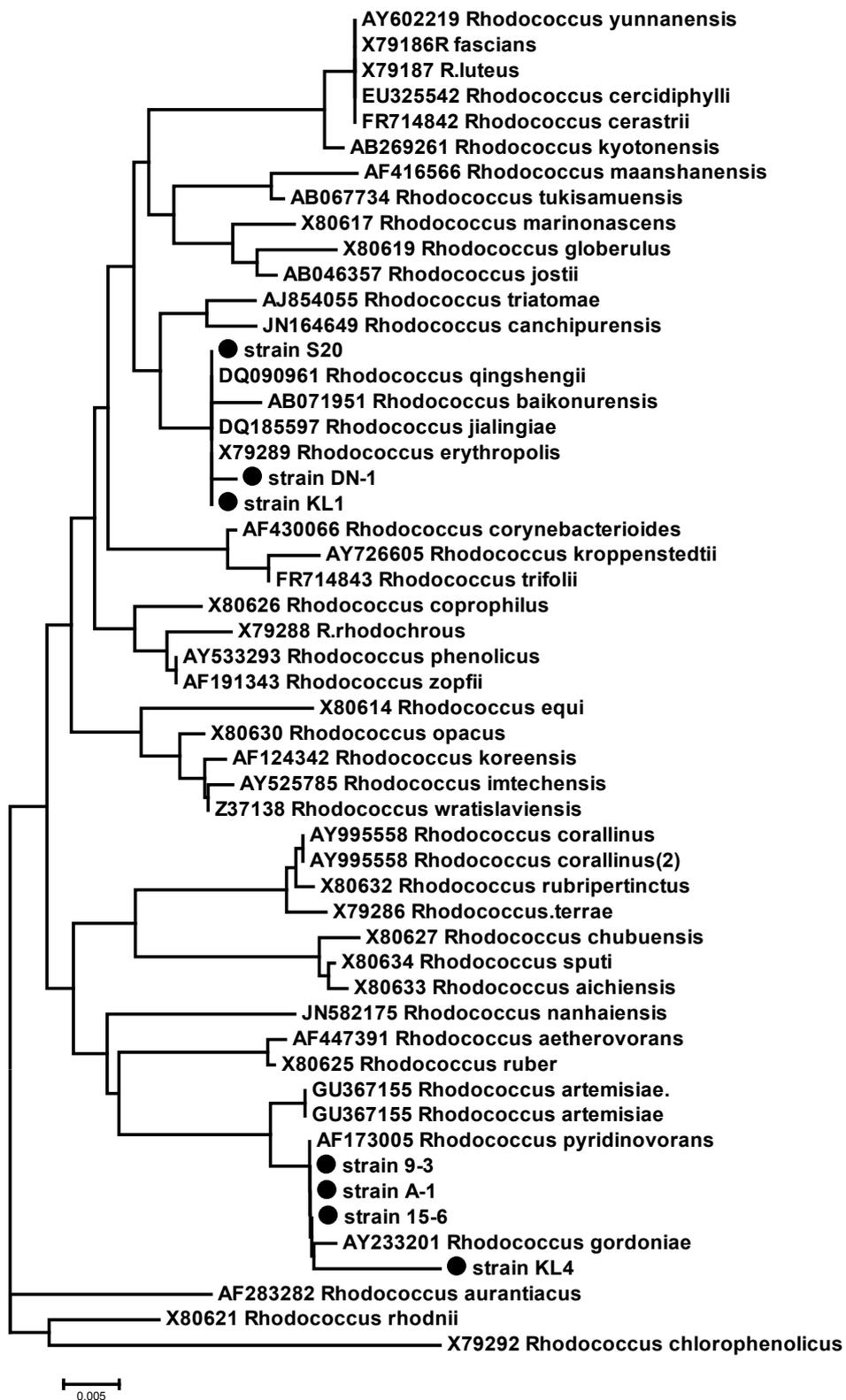


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагмента гена *16S rRNA* группы *Rhodococcus sp.*

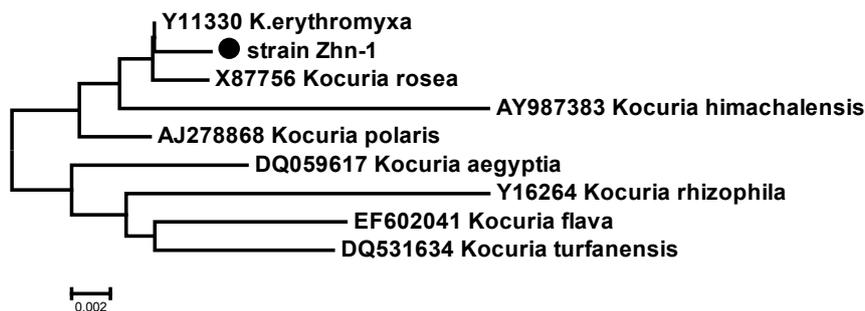


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево, построенное на основании анализа фрагмента гена *16S rRNA* группы *Kocuria sp.*

Литература

1. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. - 1995. - № 5. - С. 534-539.
2. Дудикова Г.Н., Яушева Т.В., Кудрякова А.В., Жолдыбаева Е.В., Шевцов А.Б. Генетическая идентификация молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидной последовательности // Биотехнология. Теория и практика. №3 2012. С.55-56
3. Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C.. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45. – P. 595–599.
4. Zhang Q., Kennon R., Koza M. A., Hulten K., Clarridge III J. E.. 2002. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulgai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – P. 1134–1139.
5. Куйбагаров М.А., Шевцов А.Б., Жумалин А.Х., Карибаев Т.Б., Аканова А.А., Шевцова Е.С. Генетическая идентификация бактерий коллекционных штаммов на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности 16S RNA гена// Вестник науки Казахского Агротехнического университета им.С.Сейфуллина.- 2013 №2(77). С.14-20
6. www.ncbi.nlm.gov/BLAST/
7. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150–163.