

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

УДК 575.113.1

А.В. Яковчиц, И.А. Липко, В.Б. Ицкович, О.В. Калюжная

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ СИМБИОТИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА ЭНДЕМИЧНОЙ ГУБКИ *LUBOMIRSKIA BAICALENSIS*

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

Цель. Идентифицировать бактериальные штаммы, выделенные из микробного сообщества губки *Lubomirskia baicalensis* и провести ПЦР-скрининг на наличие в их геномах генов синтеза биоактивных метаболитов.

Материалы и методы. Проведено секвенирование 16S рРНК исследуемых штаммов, их идентификация по базе данных EMBL и ПЦР-скрининг с вырожденными праймерами на наличие генов синтеза поликетидсинтаз (PKS).

Результаты. Идентифицировано 30 культур, определена их принадлежность к филумам *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*; в 15 штаммах обнаружены продукты ПЦР, соответствующие по размеру фрагменту кетосинтазного домена генного кластера PKS.

Заключение. Работа вносит вклад в изучение таксономического разнообразия культивируемых микроорганизмов байкальских губок. Показано, что метод ПЦР-скрининга генов PKS применим для исследования потенциальной способности микроорганизмов разных таксономических групп вырабатывать вторичные метаболиты.

Ключевые слова: бактериальные штаммы, симбиотическое сообщество *Lubomirskia baicalensis*, гены 16S рРНК, гены поликетидсинтаз (PKS), ПЦР-скрининг, секвенирование

A.V. Yakovchits, I.A. Lipko, V.B. Itskovich, O.V. Kaluzhnaya

MOLECULAR IDENTIFICATION AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM SYMBIOTIC COMMUNITY OF ENDEMIC SPONGE *LUBOMIRSKIA BAICALENSIS*

Limnological Institute, SB RAS, Irkutsk, Russia

Objective. Identify the bacterial strains, isolated from a microbial community of sponge *Lubomirskia baicalensis* and hold the PCR-screening for the presence of bioactive metabolites gene synthesis in their genomes.

Materials and methods. Sequencing of the 16S rRNA of the investigated strains was made and their identification by EMBL database and PCR-screening with degenerate primers for the presence of genes polyketide synthesis (PKS) was fulfilled.

Results. It is determined that 30 strains belong to bacterial phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*; in 15 strains the PCR-products corresponding to the size of ketosynthase domain of PKS gene cluster were found.

Conclusions. This work made a contribution to the taxonomic diversity of cultivated microorganisms community from Baikal sponge. It is shown that the method of PCR screening of PKS genes applicable to investigate the potential ability of microorganisms of different taxonomic groups to produce secondary metabolites.

Key words: bacterial strains, symbiotic community of *Lubomirskia baicalensis*, 16S rRNA genes, polyketidesynthase (PKS) genes, PCR- screening, sequencing

Введение

Губки (тип *Porifera*) – фильтрующие воду животные – аккумулируют в своем теле микроорганизмы различных систематических групп, многие из которых способны продуцировать биологически-активные вещества (БАВ). Бактерии составляют до 40% биомассы некоторых морских губок, а известное к настоящему времени микробное разнообразие в сообществах губок составляет 32 бактериальные филы (phylum) [1]. На сегодняшний день известно, что многие метаболиты бактериального происхождения (такие как антибиотики, токсины или статины) являются поликетидами и синтезируются мультиферментными комплексами – поликетидсинтазами (PKS). Такие мультиферментные комплексы используют в качестве субстрата мономеры ацил-коэнзима-А и состоят из нескольких белков – «строительных блоков». Каждый белок имеет доменное строение, и соответственно, несколько центров, обладающих разными каталитическими активностями. Группа доменов, отвечающая за один цикл конденсации, образует «модуль», состоящий минимум из трёх доменов: кетосинтазного (KS), ацилтрансферазного (AT) и ацилпереносящего (ACP) [2]. Поскольку последовательности модулей в PKS системах соответствуют кластерам генов в геномах микроорганизмов, обнаружить способность сообществ микроорганизмов и их отдельных штаммов продуцировать биоактивные компоненты можно с помощью ПЦР-детекции данных генов.

Отмечено, что бактериальные штаммы, полученные из необычных и неисследованных сообществ, часто являются источником новых биоактивных метаболитов. Большое видовое богатство губок, населяющих озеро Байкал (18 видов, 14 из которых являются эндемиками) связывают с многообразием экологических ниш и условий обитания [3]. В этой связи актуальными являются исследования, направленные на выявление способности микроорганизмов байкальских губок вырабатывать биоактивные метаболиты.

В настоящей работе проведена идентификация 30 бактериальных штаммов, выделенных из эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis*, а также ПЦР-скрининг данных штаммов на наличие в их геномах фрагментов гена кетосинтазного домена PKS.

Материалы и методы

Образцы *L. baicalensis* были собраны в декабре 2010 г. в районе пос. Листвянка (юго-западное побережье оз. Байкал) с глубины 15 м с помощью водолазной техники. Выделение бактериальных штаммов из губки проводили

на среде R2A агар («Becton Dickinson», США) по методу, опубликованному ранее [4]. ДНК из бактериальных культур выделяли с использованием набора «РибоСорб» по инструкции производителя (АмплиСенс, Россия). Идентификацию штаммов осуществляли путём анализа последовательностей генов 16S рРНК, амплифицированных с помощью эубактериальных праймеров 9F и 1093R, как описано в нашей предыдущей работе [5].

Подбор праймеров для ПЦР-скрининга генов поликетидсинтаз (PKS) проводили на основе литературных данных [6]. Сравнение с базами данных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы BLASTX сервера NCBI.

Результаты и обсуждение

30 бактериальных штаммов, выделенных из пресноводной губки *L. baicalensis* в декабре 2010 г., идентифицированы по последовательностям генов 16S рРНК.

В коллекции выявлены представители 11 родов, принадлежащие трём бактериальным филам (табл.): *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (классы *Aphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*), что говорит о присутствии в составе симбиотического сообщества *L. baicalensis* значительного разнообразия культивируемых микроорганизмов. Ранее нами показано, что филы *Actinobacteria* и *Proteobacteria* являются доминирующими в симбиотических ассоциациях байкальских губок [5, 7], поэтому присутствие бактерий данных систематических групп в культурах является вполне закономерным. В таблице приводится гомология полученных последовательностей 16S рРНК с таковыми, опубликованными в базе данных Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Большинство анализируемых последовательностей проявляли 99-100% гомологии с известными бактериальными штаммами. Среди идентифицированных бактерий к филе *Actinobacteria* отнесены штаммы, гомологичные *Micromonospora sp.*, *M. chokoriensis*, *Streptomyces paradoxus*, *Dietzia maris*, *Streptosporangium vulgare*; к филе *Firmicutes* – *Bacillus sp.*, *B. simplex*, *B. muralis*, *B. toyonensis*, *Paenibacillus sp.*, *P. borealis*; к филе *Proteobacteria* – *Sphingomonas mucosissima*, *S. aerolata*; *Herminiimonas aquatilis*; *Yersinia sp.*, *Y. kristensenii*, *Pseudomonas sp.* (табл).

Таблица. Бактериальные штаммы, изолированные из пресноводной губки *L. baicalensis* в декабре 2010 г.

Штамм	Ближайший гомолог, номер доступа в банке данных EMBL	% гомологии	Систематическая группа	ПЦР-сигнал PKS
1	2	3	4	5
01-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0617 (KC108991)	99	Gamma-proteobacteria	+
03-Lb11	<i>Herminiimonas fonticola</i> Costa S-94 (AB512142)	99	Beta-proteobacteria	+
04-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gamma-proteobacteria	+
06-Lb11	<i>Micromonospora</i> sp. PVA_117-19 (JX503979)	99	Actinobacteria	+
07-Lb11	<i>Herminiimonas aquatilis</i> CCUG 36956 (NR_042431)	99	Beta-proteobacteria	+
08-Lb11	<i>Bacillus</i> sp. 16S-228 (JX103463)	100	Firmicutes	+
10-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0617 (KC108991)	100	Gammaproteobacteria	+
11-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gammaproteobacteria	+
13-Lb11	<i>Bacillus simplex</i> R11 (KJ534532)	99	Firmicutes	+
14-Lb11	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 9-1 (KJ571062)	99	Actinobacteria	+
17-Lb11	<i>Bacillus simplex</i> R11 (KJ534532)	99	Firmicutes	-
21-Lb11	<i>Bacillus simplex</i> R11 (KJ534532)	99	Firmicutes	-
22-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gamma-proteobacteria	-
24-Lb11	<i>Yersinia kristensenii</i> b311 (EU434489)	94	Gamma-proteobacteria	-
25-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. Es10 (JQ977432)	93	Gamma-proteobacteria	-
26-Lb11	<i>Streptomyces paradoxus</i> HBUM174056 (EU841653)	99	Actinobacteria	+
28-Lb11	<i>Micromonospora chokoriensis</i> TM-33 (JN411273)	99	Actinobacteria	+
29-Lb11	<i>Sphingomonas mucosissima</i> A4-7 (JF496349)	99	Alpha-proteobacteria	-
31-Lb11	<i>Bacillus muralis</i> 4B2 (KJ589461)	99	Firmicutes	-
32-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gamma-proteobacteria	-
33-Lb11	<i>Moraxella</i> sp. P75 (KJ604946)	99	Gamma-proteobacteria	-
34-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gamma-proteobacteria	-
35-Lb11	<i>Dietzia maris</i> A1-8 (JN627164)	99	Actinobacteria	+
37-Lb11	<i>Bacillus toyonensis</i> DB13184 (KJ721162)	99	Firmicutes	-
38-Lb11	<i>Yersinia</i> sp. UA-JF0918 (KC108992)	99	Gamma-proteobacteria	-

Продолжение таблицы				
1	2	3	4	5
39-Lb11	<i>Pseudomonas</i> sp. TA_FJ (HG942147)	100	Gamma-proteobacteria	-
40-Lb11	<i>Sphingomonas aerolata</i> R-36940 (FR691420)	99	Alpha-proteobacteria	+
41-Lb11	<i>Streptosporangium vulgare</i> XMU139 (HM368597)	99	Actinobacteria	+
42-Lb11	<i>Paenibacillus</i> sp. D27 (KF479657)	95	Firmicutes	-
45-Lb11	<i>Paenibacillus borealis</i> 15 (JX122146)	91	Firmicutes	-

Определение потенциальной способности бактериальных культур продуцировать вторичные метаболиты осуществлялось с помощью ПЦР-скрининга генов синтеза БАВ в геномах исследуемых штаммов. Для этого были использованы праймеры, гомологичные консервативным участкам KS-домена PKS бактерий разных систематических групп. При анализе учитывался размер амплифицируемого участка гена PKS в агарозном геле (700 п.н.). В результате скрининга в 15 из 30 штаммов бактерий был отмечен положительный ПЦР-сигнал (табл.). При этом продукты амплификации ожидаемого размера присутствовали во всех штаммах филы *Actinobacteria*. Важно отметить, что актинобактерии – один из наиболее изученных таксонов прокариот, широко распространенных в водных сообществах. Многие актинобактерии, известные как продуценты разнообразных биологически-активных метаболитов, являются симбионтами как морских [8], так и пресноводных [5, 7] губок.

В нашей работе ПКС-сигнал выявлен у следующих штаммов актинобактерий: 26-Lb1210 (*Streptomyces paradoxus*), 28-Lb1210, 14-Lb1210 (*Micromonospora chokoriensis*), 06-Lb1210 35-Lb1210 (*Dietzia maris*), 41-Lb1210 (*Streptosporangium vulgare*). Эти бактериальные культуры интересны для дальнейших исследований, поскольку целый ряд близкородственных им штаммов проявляет способность продуцировать вторичные метаболиты, значимые для медицины и биотехнологии. Например, известно, что две трети продуцируемых антибиотиков, антиопухолевых агентов и иммуносупрессоров, используемых в медицине, продуцируются представителями рода *Streptomyces* [9, 10]. Многие из этих БАВ являются поликетидами и синтезируются генными кластерами PKS. Так, с помощью геномного секвенирования в штаммах *Streptomyces coelicolor* и *S. avermitilis* обнаружены 20 генных кластеров PKS [10]. Часто именно в симбиотических сообществах можно обна-

ружить микроорганизмы-продуценты биоактивных метаболитов. Например, штаммы *Streptomyces* и *Micromonospora*, выделенные из симбиотической ассоциации морского коралла *Scleronephthya*, обладали генами PKS, отвечающими за синтез ароматических поликетидов [11]. Секвенирование генома *Dietzia maris* P4 также показало наличие десяти генов поликетидсинтаз и регуляторов экспрессии PKS, в том числе отвечающих за синтез антибиотиков авиламицина и нафтоциклинона, а также антиопухолевого агента азиномицина [12]. Актинобактерии рода *Streptosporangium* также могут обладать способностью синтезировать БАВ, а наличие у многих из них генов PKS продемонстрировано в ряде работ [13, 14].

В двух из шести штаммов, гомологичных представителям рода *Bacillus* (фила Firmicutes) (08-Lb1210, 13-Lb1210), был отмечен положительный ПЦР-сингал на наличие генов БАВ. Известно, что некоторые штаммы *Bacillus* являются продуцентами биоактивных метаболитов, в том числе антибиотиков и токсинов. В их числе липопептид микосубтилилин, итурин А, бацилломицин. По результатам ряда работ установлено, что 4% генома *B. subtilis* составляют кластеры синтеза поликетидов и нерибосомных пептидов. Штаммы *B. subtilis* являются продуцентами бактериоцинов, пептидаз, лигаз и разнообразных антибиотиков, а в геноме *B. amyloliquefaciens* обнаружены генные кластеры PKS, участвующие в синтезе диффицидина, макролактоина и маццилена [15]

Штаммы родов *Herminiimonas* и *Yersinia*, отнесенные к филе *Proteobacteria*, в которых детектировались ПЦР-фрагменты PKS ожидаемого размера, могут встречаться в разнообразных водных сообществах. Представители рода *Herminiimonas* ранее обнаружены в ручьях и минеральных водах, ледниках Антарктики и Гренландии, морских осадках. Известны нитрат-редуцирующие изоляты данного рода [16]. Однако для представителей *Herminiimonas* способность продуцировать биоактивные вещества поликетидной природы ранее не была показана.

Для нескольких бактериальных культур (01-Lb1210, 04-Lb1210, 1-Lb1210, 22-Lb1210), выделенных из байкальской губки, ближайшими гомологами явились деградирующие биополимеры штаммы *Yersinia*, изолированные из ледниковых рек Исландии. Известно, что 9 из 12 видов рода *Yersinia* являются непатогенными и могут быть обнаружены в разнообразных природных сообществах [17]. Например, вид *Yersinia kristensenii*, обладающий генами синтеза БАВ, был выделен из сообщества морской губки *Aplysina aerophoba*

[18]. Наиболее известное биоактивное соединение, выделенное из бактерий рода *Yersinia* – сидерофор иерсиниобактин, который синтезируется гибридными комплексами нерибосомных пептидсинтаз и поликетидсинтаз [19].

Заключение

В настоящей работе идентифицированы 30 бактериальных штаммов, изолированных из симбиотического сообщества пресноводной губки *L. baicalensis*. Проведен их ПЦР-скрининг для отбора культур, потенциально способных вырабатывать вторичные метаболиты поликетидной природы.

В дальнейшем биологическая активность штаммов, демонстрирующих положительный ПЦР-сигнал, может быть исследована с помощью микробиологических, биохимических и аналитических методов. Данная работа вносит вклад в изучение разнообразия и биотехнологического потенциала культивируемых микроорганизмов байкальских губок.

(Работа выполнена в рамках госбюджетной темы № VI.50.1.4. «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии на примере рыб, губок и ассоциированной с ними микрофлоры», при частичной поддержке проектов РФФИ № 11-04-00323-а, № 15-04-00527-а.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Webster N.S., Taylor M.W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Envir. Microbiol.* 2012. 14(2): 335–346.
2. Nikolouli K., Mossialos D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnol. Lett.* 2012. 34(8): 1393–1403.
3. Ефремова С.М. Губки (Porifera). В кн. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / Под ред. О.А., Тимошкина, Т.Я. Ситниковой, О.Т. Русинек и др. Новосибирск: Наука, 2001. 1: 177–190.
4. Парфенова В.В., Теркина И.А., Косторнова Т.Я. и др. Микробное сообщество пресноводных губок озера Байкал. *Изв. РАН. Серия биол.* 2008. 4: 435–441.
5. Калюжная О.В., Кривич А.А., Ицкович В.Б. Разнообразие генов 16S рРНК в метагеномном сообществе пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis*. *Генетика.* 2012. 48(8): 851–854.
6. Ehrenreich I., Waterbury J., Webb E. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl. Envir. Microb.* 2005. 71(11): 7401–7413.
7. Калюжная О.В, Ицкович В.Б. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с глубоководной губкой *Baikalospongia intermedia*. *Генетика.* 2014. 50(7): 765–776.
8. Schneemann I., Nagel K., Kajahn I. et al. Comprehensive investigation of marine Actinobacteria associated with the sponge *Halichondria panacea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. 76. (11): 3702–3714.
9. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat. Prod.* 2007. 70: 461–477.
10. Arias A., Craig M., Fickers P. Gram-positive antibiotic biosynthetic clusters: a review. In: Méndez-Vilas A., ed. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Badajoz, Spain: Formatex Research Center. 2011. 1: 977-986.

11. Sun W., Peng C., Zhao Y., Li Z. Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp. *PLoS One*. 2012. 7(8): e42847.
12. Procopio L., Alvarez V.M., Jurelevicius D.A. et al. Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamomea* P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012. 101: 289–302.
13. Ayuso-Sacido A., Genilloud O. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microb. Ecol.* 2005. 49(1): 10-24.
14. Nolan M., Sikorski J., Jando M. et al. Complete genome sequence of *Streptosporangium roseum* type strain (NI 9100). *Stand Genomic Sci.* 2010. 2(1): 29-37.
15. Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 2012. 8(2): 40–46.
16. Canion A., Prakash O., Green S.J. et al. Isolation and physiological characterization of psychrophilic denitrifying bacteria from permanently cold Arctic fjord sediments (Svalbard, Norway). *Envir. Microb.* 2013. 15(5): 1606–1618.
17. Chen P.E., Cook C., Stewart A.C. et al. Genomic characterization of the *Yersinia* genus. *Genome Biology*. 2010. 11: R1.
18. Pimentel-Elardo S.M., Grozdanov L., Proksch S. et al. Diversity of nonribosomal peptide synthetase genes in the microbial metagenomes of marine sponges. *Mar. Drugs*. 2012. 10(6): 1192–1202.
19. Perry R.D., Jacqueline D. Fetherston yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes and Infection*. 2011. 13: 808-817.

Поступила 28.07.2014

(Контактная информация: Калюжная Оксана Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории аналитической биоорганической химии ЛИ СО РАН; адрес: 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; Тел. 8(3952)511874, 89025686919; e-mail: x-sun77@rambler.ru)