



УДК 579.252

Способность пресноводных нитчатых серобактерий семейства *Beggiatoaceae* к ассимиляции молекулярного азота: молекулярная детекция и экспрессия маркерного гена азотфиксации *nifH*

Орлова М.В., Шацкий Н.Д., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 22.05.2016 г.

При помощи сорбирующих микроколонок выделена РНК из трех штаммов серобактерий из семейства *Beggiatoaceae*. Показано значительное увеличение экспрессии маркерного гена азотфиксации *nifH* при культивировании на среде без источников азота по сравнению с полной средой. В геномах *Beggiatoa leptomitiformis* D-402 и «*Thioflexothrix psekupsi*» D3 gen. nov., sp. nov. выявлены гены, необходимые для функционирования нитрогеназного комплекса. Все это подтверждает способность исследуемых штаммов к фиксации молекулярного азота.

Ключевые слова: *Beggiatoaceae*, нитрогеназа, азотфиксация, *nifH*

The ability of freshwater filamentous sulfur bacteria from the family *Beggiatoaceae* to assimilate molecular nitrogen: molecular detection and expression of *nifH* - the marker gene of nitrogen fixation

Orlova M.V., Shatsky N.D., Belousova E.V., Grabovich M.Yu.

Voronezh State University, Voronezh

The purpose of this work was to prove the ability of three representatives from the family *Beggiatoaceae* - *Beggiatoa leptomitiformis* D-401 and D-402 and «*Thioflexothrix psekupsi*» gen. nov., sp. nov. – for nitrogen fixation with the help of nitrogenase complex. We used the next methods to achieve this purpose: the cultivation of bacteria on nutrient media with nitrogen and without it, RNA extraction with the help of sorbent microcolumns, reverse transcription, qPCR and genome annotation with the help of an automatical annotator RAST. It was shown that bacteria were able to sustain five passages on the nutrient medium without nitrogen, the whole set of genes of nitrogenase complex was present in the analyzed genomes and there was a significant increase in the expression of the gene *nifH* in all three strains after cultivation on the medium without nitrogen. All of it demonstrate the ability of the investigated bacteria for molecular nitrogen fixation.

Keywords: *Beggiatoaceae*, nitrogenase, nitrogen fixation, *nifH*.

Введение

Фиксация азота может вносить существенный вклад в потребление азота хемотротрофами [1-3]. Этот процесс заключается в превращении атмосферного азота в аммиак при помощи фермента нитрогеназы. Он функционирует у определенных

групп бактерий / архей (дiazотрофы), обитающих в различных средах с недостатком азота, от открытого океана [4] до кишечника термитов [5]. Фиксация азота была показана ранее для видов *Beggiatoa* [6]. Гены, участвующие в этом процессе, были идентифицированы в геномах *Beggiatoa alba* B18LD и *Thioploca ingrica* [7].

Нитрогеназа – высококонсервативный комплекс ферментов, состоящий из динитрогеназы (MoFe-белок) и редуктазы динитрогеназы (Fe-белок), которые кодируются *nifDK* и *nifH*-генами, соответственно [8]. Наиболее удобным способом оценки способности к азотфиксации у различных прокариот является амплификация структурных генов нитрогеназы (*nif*-генов) в полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9].

В качестве маркера азотфиксации чаще всего используют *nifH*-ген, и на настоящий момент сформирована представительная база данных, содержащая последовательности *nifH*-генов бактерий из различных мест обитания [10]. В нашей работе также использовали *nifH*-ген в качестве маркера азотфиксации. Для последующей проверки экспрессии гена *nifH* экстрагировали тотальную РНК из клеток бактерий при помощи набора для выделения РНК из культур клеток с сорбирующими микроколонками.

Эксперимент

Объектами исследования служили 3 штамма бесцветных нитчатых серобактерий семейства *Beggiatoaceae*: *Beggiatoa leptomitiformis* D-401 и D-402 и «*Thioflexothrix pseupsii*» gen. nov., sp. nov. D3. Для культивирования бактерий рода *Beggiatoa* и *Thioflexothrix* использовали среды ранее описанного состава [11; 12]. В среду перед посевом вносили набор витаминов и микроэлементов [13]. Для проверки экспрессии генов *nifH* из сред культивирования исключались все источники азота: NaNO_3 и пептон из среды для *Beggiatoa* и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из среды для «*Thioflexothrix*». Общая схема эксперимента по экспрессии гена *nifH* показана на рис. 1.



Рис. 1. Общая схема эксперимента по экспрессии гена *nifH*.

Выделение РНК. РНК экстрагировали при помощи набора для выделения РНК из культур клеток (BioSilica, Россия) с сорбирующими микроколонками. Для этого клетки из культуральной среды (рН 7.0) осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 250 мкл лизис-буфера и инкубировали на льду 15 мин. Затем центрифугировали 15 мин при 13000 об/мин и отбирали супернатант. К супернатанту добавляли равный объем буфера и 1, перемешивали. На колонку наносили 200 мкл буфера 2, центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и удаляли фильтрат. Далее на-

носили на колонку подготовленный образец, центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и удаляли фильтрат. Наносили на фильтр 300 мкл буфера 2, центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и удаляли фильтрат. Дважды наносили на фильтр 500 мкл раствора для промывки 2, центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и удаляли фильтрат. Затем выливали содержимое пробирки и центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин и удаляли фильтрат. Переносили колонку в новую 1.5 см³ пробирку, наносили на фильтр 150 мкл дистиллированной воды и инкубировали микроколонку 1-3 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали 1 мин при 13000 об/мин. Полученный раствор содержал очищенную РНК (рН 7.0) [14].

Качество выделенной тотальной РНК оценивали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле [15]. Концентрацию РНК определяли при помощи The Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флюориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Обратная транскрипция РНК осуществлялась на приборе «Eppendorf Mastercycler personal» при помощи M-MuLV обратной транскриптазы (SybEnzyme, Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Количественный ПЦР-анализ (кПЦР) проводили на приборе «Bio-Rad CFX96TM Real-Time System» (Bio-Rad, США). Подбор оптимальной температуры отжига праймеров осуществляли с помощью кПЦР с температурным градиентом. Для гена *nifH* подобрали праймеры при помощи primerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>): Primer_Forward2 (5'-TGACGTGTTAGGTGACGTGG-3') и Primer_Reverse2 (5'-TCTTCACGGTCGGTGTACG-3'). Праймеры подбирали к гену *nifH* *Beggiatoa leptomitiformis* B2, последовательность этого гена была помещена нами в GenBank и ей был присвоен порядковый номер WP_002685515.1. Ожидаемая длина продукта составляла 237 пар нуклеотидов (п.н.). кПЦР проводили в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I согласно следующему протоколу. Общую денатурацию проводили при 95°C 3 мин; денатурация в начале цикла 95°C 20 с; отжиг праймеров 59°C 20 с, элонгация 72°C 30 с; кол-во циклов 39. Первичное аннотирование генома проводили при помощи интернет-платформы RAST с использованием технологии подсистем (<http://rast.nmpdr.org/>).

Обсуждение результатов

Для всех трех исследуемых штаммов была показана способность выдерживать пятикратный пассаж на среде без источников азота, что является одним из доказательств способности к азотфиксации. Еще одним доказательством азотфиксации служит наличие в геноме всех генов нитрогеназного комплекса.

На данный момент полный геномный сиквенс описан только для одного представителя семейства *Beggiatoaceae* - *B. leptomitiformis* D-402 [16]. Для «*T. psekupsii*» D3 получен драфт-геном, который удалось собрать в 34 контига (неопубликованные данные). Организация генов нитрогеназного комплекса в двух геномах сходна (рис. 2). У *T. psekupsii* D3 и у *B. leptomitiformis* D-402 имеются кластеры генов *nifHDKT*, *nifSU*, *nifVWZ*, *nifBBOQ*. Ген *nifE* лежит отдельно от остальных генов нитрогеназного комплекса. Так как штаммы D-401 и D-402 относятся к одному виду – *B. leptomitiformis*, на основании сиквенса генома *B. leptomitiformis* D-402, предположили, что такие же гены есть и в геноме *B. leptomitiformis* D-401.

Для дополнительного подтверждения способности исследуемых штаммов к азотфиксации изучали экспрессию маркерного гена азотфиксации *nifH* при культивировании бактерий на полной питательной среде и на среде без источников азота.

Полученные в результате кПЦР продукты по длине соответствовали ожидаемым, что подтверждено результатами горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле (рис. 3).

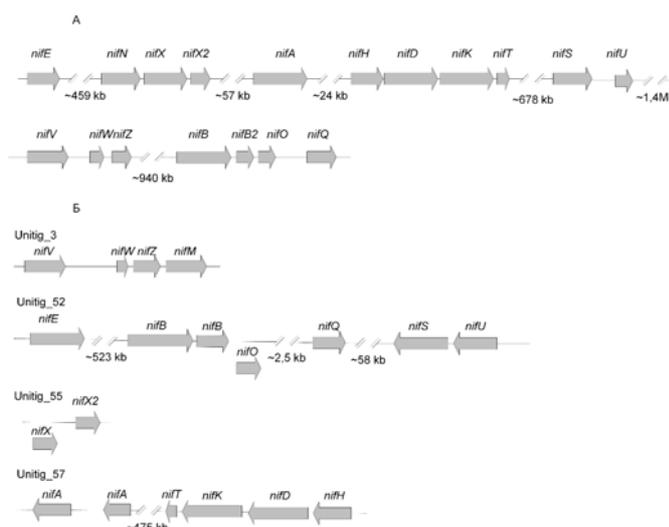


Рис. 2. Организация генов нитрогеназного комплекса у *B. leptomitiformis* D-402 (А) и «*T. pseudopsii*» D3 (Б)

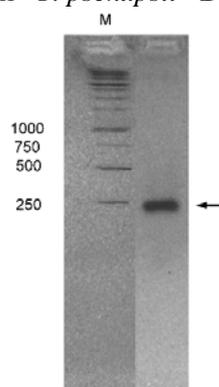


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена *nifH* с парой праймеров Primer_Forward2 и Primer_Reverse2 (ожидаемая длина продукта 237 п.н.). Стрелкой показан целевой продукт у *Beggiatoa leptomitiformis* D-402.

В ходе эксперимента установлено, что у *B. leptomitiformis* D-401 экспрессия гена *nifH* на среде без азота в 151.4 раз выше, чем на среде с азотом, у *B. leptomitiformis* D-402 - в 22.7, а у *T. pseudopsii* D3 - в 153.5 раз выше (рис. 4).

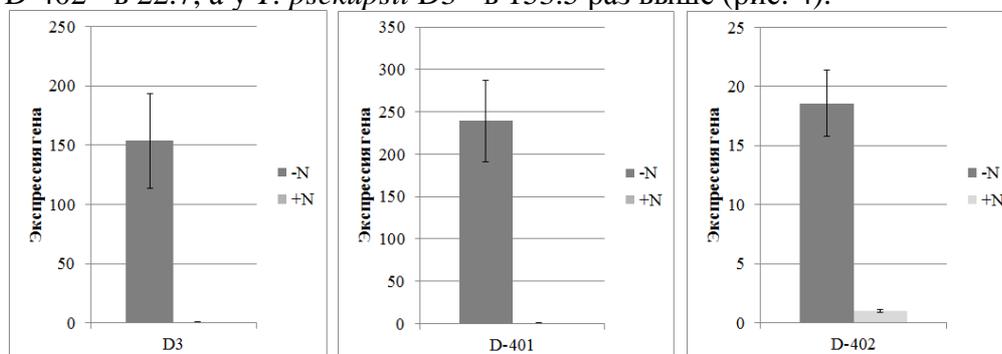


Рис. 4. Уровень экспрессии гена *nifH* у представителей семейства *Beggiatoaceae* в разных условиях культивирования. +N – полная питательная среда, -N – питательная среда без источников азота.

Таким образом, у всех трех штаммов семейства *Beggiatoaceae* на среде без источников азота значительно увеличивается экспрессия гена *nifH*. Это свидетельствует о способности данных штаммов к фиксации молекулярного азота.

Заключение

Было доказано, что исследуемые штаммы бактерий семейства *Beggiatoaceae* способны фиксировать молекулярный азот. Это подтверждается их способностью выдерживать пятикратный пассаж на средах без источников азота, значительным увеличением экспрессии гена *nifH* после культивирования на безазотной среде, а также наличием в геномах *T. psekupsii* D3 и *B. leptomitiformis* D-402 всех генов нитрогеназного комплекса.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-34-01097

Список литературы

1. Rau G.H. // *Nature*. 1981. Vol. 289. pp. 484-485.
2. Brooks J.M., Kennicutt M.C., Fisher C.R. et al. // *Science*. 1987. Vol. 238. pp.1138-1142.
3. Sarbu S., Kane T., Kinkle B. // *Science*. 1996. Vol. 272, pp. 1953-1955.
4. Zehr J.P., Waterbury J.B., Turner P.J. et al. // *Nature*. 2001. Vol. 412. pp. 635-638.
5. Desai M.S., Brune A. // *ISME J*. 2012. Vol. 6. pp. 1302-1313.
6. Nelson D.C., Waterbury J.B., Jannasch H.W. // *Arch. Microbiol*. 1982. Vol. 133. pp. 172-177.
7. Kojima H., Ogura Y., Yamamoto N. et al. // *ISME J*. 2015. Vol. 9. pp. 1166-1176.
8. Martinez-Romero E., Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. The Prokaryotes, 3rd edn et al., 2006. Vol. 2. pp. 793-817.
9. Федоров Д.Н., Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Микробиология*. 2008. Т. 77. № 2. С. 286-288.
10. Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. // *Environ Microbiol*. 2003. Vol. 5. pp. 539-54.
11. Grabovich M.Y., Patrinskaya V.Y., Muntyan M.S., Dubinina G.A. // *FEMS Microbiol Lett*. 2001. Vol. 204. pp. 341-345.
12. Орлова М.В., Федоненко Ю.П., Евстигнеева С.С. и др. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2015. Т. 15. № 4. С. 578-585.
13. Pfenning N.D., Lippert K.D. // *Arch. Microbiol*. 1966. Vol. 55. pp. 245-256.
14. Селеменев В.Ф., Славинская Г.В., Хохлов В.Ю., Чикин Г.А. Практикум по ионному обмену. Воронеж. 1999. 160 с.
15. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Е., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. Пигменты пищевых производств (меланоидины). М. ДеЛи принт. 2008. 246 с.
16. Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M.Y. et al. // *Genome Announcement*. 2015. Vol. 3. e01436-15. doi:10.1128/genomeA.01436-15.

References

1. Rau G.H., *Nature*, 1981, Vol. 289, pp. 484-485.
2. Brooks J.M., Kennicutt M.C., Fisher C.R. et al. *Science*, 1987, Vol. 238, pp.1138-1142.
3. Sarbu S., Kane T., Kinkle B., *Science*, 1996, Vol. 272, pp. 1953-1955.
4. Zehr J.P., Waterbury J.B., Turner P.J. et al., *Nature*, 2001 Vol. 412, pp. 635-638.
5. Desai M.S., Brune A., *ISME J*, 2012, Vol. 6, pp. 1302-1313.
6. Nelson D.C., Waterbury J.B., Jannasch H.W., *Arch. Microbiol.*, 1982, Vol. 133, pp. 172-177.
7. Kojima H., Ogura Y., Yamamoto N. et al., *ISME J*, 2015, Vol. 9, pp. 1166-1176.

8. Martinez-Romero E., Dinitrogen-Fixing Prokaryotes, *The Prokaryotes*, 3rd edn et al., 2006, Vol. 2, pp. 793-817.

9. Fedorov D.N., Ivanova E.G., Doronina N.V., Trocenko Ju.A., *Mikrobiologija*, 2008, Vol. 77, pp. 286-288.

10. Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F., *Environ Microbiol.*, 2003, Vol. 5, pp. 539-54.

11. Grabovich M.Y., Patrinskaya V.Y., Muntyan M.S., Dubinina G.A., *FEMS Microbiol Lett.*, 2001, Vol. 204, pp. 341-345.

12. Orlova M.V., Fedonenko Ju.P., Evstigneeva S.S. et al., *Sorbtsionnye i*

khromatograficheskie protsessy, 2015, Vol. 15, No 4, pp. 578-585.

13. Pfenning N.D., Lippert K.D., *Arch. Microbiol.*, 1966, Vol. 55, pp. 245-256.

14. Selemenev V.F., Slavinskaja G.V., Hohlov V.Ju., Chikin G.A., *Praktikum po ionnomu obmenu*, Voronezh, 1999, 160 p.

15. Selemenev V.F., Rudakov O.E., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V., *Pigmenty pishhevyh proizvodstv (melanoidiny)*, M., DeLi print, 2008, 246 p.

16. Fomenkov A., Vincze T., Grabovich M.Y. et al., *Genome Announcement*, 2015, Vol. 3. e01436-15. doi:10.1128/genomeA.01436-15.

Орлова Мария Валерьевна – аспирант Воронежского государственного университета, Воронеж

Шацкий Николай Дмитриевич - студент Воронежского государственного университета, Воронеж

Белюсова Елена Васильевна – к.б.н., ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета, Воронеж

Грабович Маргарита Юрьевна – д.б.н., профессор кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежского государственного университета, Воронеж

Orlova Maria Valerievna – PhD student in Voronezh State University, Voronezh, e-mail: maryorl@mail.ru

Shatskiy Nikolay Dmitrievich - student in Voronezh State University, Voronezh

Belousova Elena Vasilevna – PhD, assistant in the Department of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Grabovich Margarita Yurievna – professor in the Department of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh State University, Voronezh