

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ СТРЕССОВЫХ ГЕНОВ В БИОПЛЕНКАХ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УГЛЕВОДОРОДОВ

Лицевич А. Р., аспирант,  
тел. 8(961)416-78-04, licevich@sfnu.ru,  
Сазыкин И. С., доктор биологических наук,  
Хмелевцова Л. Е., кандидат биологических наук, старший  
научный сотрудник,  
Сазыкина М. А., доктор биологических наук, доцент,  
ФГБОУ ВО ЮФУ

**Ключевые слова:** окислительный стресс, экспрессия, супероксиддисмутаза, каталаза, SOS-ответ, биопленки

*Работа посвящена адаптивному ответу Rhodococcus erythropolis в составе бактериальных биопленок на воздействие углеводов различных структурных классов. В ходе работы было выяснено, что бактериальные биопленки менее подвержены окислительному стрессу, возникающему в процессе деградации углеводов.*

**Введение.** Биоремедиация является широко развивающимся направлением биотехнологии в связи с неугасающей потребностью в очистке загрязненных объектов окружающей среды. Наиболее целесообразным для биоремедиации почвы представляется использование почвенной микробиоты, способной к деградации поллютантов [1]. Данных о способности микроорганизмов к деградации различных соединений довольно много и становится больше с каждым годом, но большая часть этих данных касается непосредственно путей разложения и эффективности тех или иных штаммов для этого процесса.

Однако известно, что процесс деградации сопровождается генерацией активных форм кислорода в клетке, а значит и окислительным стрессом, который неизбежно приводит к повреждению

значимых структур [2]. Молекулярные механизмы адаптивного ответа клетки на стрессовое воздействие углеводов являются до сих пор слепым пятном, особенно в отношении грамположительных представителей нефтедеструкторов. Понимание молекулярных механизмов адаптивного ответа грамположительных микроорганизмов на воздействие углеводов является необходимым для дальнейшего эффективного их использования в целях биоремедиации.

Так как биопленки являются морфологически и физиологически отличной формой жизни [3], и при этом одним из наиболее распространенных и успешных способов жизни бактерий [4,5], их изучение представляет особый интерес, как с практической, так и с фундаментальной точки зрения.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследования являлся штамм *Rhodococcus erythropolis*, выделенный из почвы импактной зоны Новочеркасской ГРЭС в 2014 году. Штамм сохранялся в музее культур лаборатории экологии и молекулярной биологии ЮФУ.

Культивирование проводилось с использованием питательной среды Диановой-Ворошиловой для нефтедеструкторов в 24-луночных культуральных планшетах. К среде добавляли 0,5% дрожжевого экстракта, а также 7 различных углеводов: декан, гексадекан, циклогексан, бензол, нафталин, антрацен и дизельное топливо.

Определение изменения экспрессии стрессовых генов проводилось с использованием методов молекулярной биологии.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В ходе исследования было отмечено увеличение экспрессии гена *soxR*, кодирующего редокс-чувствительный транскрипционный фактор, относящийся к регулону SoxRS, в присутствии декана, бензола и антрацена примерно в равной степени (в  $2,92 \pm 0,34$ ,  $2,89 \pm 0,22$  и  $2,92 \pm 0,63$  раз, соответственно). Некоторое увеличение экспрессии отмечалось также в присутствии нафталина – в  $1,40 \pm 0,85$  раз. Небольшое снижение экспрессии гена отмечалось в присутствии гексадекана – до  $0,82 \pm 0,05$  раз. Добавление к среде циклогексана и дизельного топлива вызывало более существенное снижение экспрессии гена *soxR* – до  $0,36 \pm 0,06$  и  $0,39 \pm 0,03$  раз, соответственно.

По результатам оценки изменения экспрессии гена *oxyR*, кодирующего транскрипционный фактор, относящийся к регулону

OxyR, было отмечено увеличение экспрессии в присутствии декана, гексадекана, циклогексана и антрацена – в  $3,24 \pm 0,11$ ,  $2,63 \pm 0,24$ ,  $2,07 \pm 0,13$  и  $2,77 \pm 0,10$  раз, соответственно. Несколько меньше экспрессию увеличивало присутствие бензола и нафталина – в  $1,84 \pm 0,15$  и  $1,30 \pm 0,10$  раз, соответственно. Только дизельное топливо подавляло экспрессию гена *oxyR* до  $0,36 \pm 0,03$  раз.

Были исследованы также гены SOS-ответа, представленные геном раннего SOS-ответа – *recA*, кодирующим рекомбиназу, а также геном позднего SOS-ответа – *dinB*, кодирующим склонную к ошибкам транслезионную ДНК-полимеразу IV и, вероятно, не находящимся под контролем *recA* у *R. erythropolis* [6]. Увеличивали экспрессию гена *recA* бензол, нафталин и антрацен – в  $2,01 \pm 0,17$ ,  $1,62 \pm 0,16$  и  $3,42 \pm 0,29$  раз, соответственно. Декан, гексадекан и циклогексан подавляли экспрессию гена *recA* до  $0,55 \pm 0,03$ ,  $0,54 \pm 0,04$  и  $0,53 \pm 0,06$  раз, соответственно. Наиболее сильное подавление экспрессии отмечалось в присутствии дизельного топлива – до  $0,32 \pm 0,04$  раза.

Экспрессию гена *dinB* подавляли все исследованные углеводороды. Сильнее всего подавление отмечалось в присутствии дизельного топлива, как и для гена *recA*, – до  $0,08 \pm 0,03$  раз. Декан, циклогексан и антрацен подавляли экспрессию до  $0,38 \pm 0,06$ ,  $0,30 \pm 0,05$  и  $0,25 \pm 0,04$  раза, соответственно. Наименьшее подавление отмечалось для гексадекана, бензола и нафталина – до  $0,52 \pm 0,09$ ,  $0,58 \pm 0,09$  и  $0,53 \pm 0,08$  раз, соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о повышенной устойчивости биопленок к воздействию углеводородов, что согласуется с литературными данными об устойчивости бактериальных биопленок к внешнему воздействию [7, 8, 9, 10]. Несмотря на формирующиеся в ходе деградации углеводородов активные формы кислорода, адаптивный стресс-ответ выражен слабо, что можно увидеть по довольно низкому увеличению экспрессии стрессовых генов, которое не превышает увеличения в 4 раза по сравнению с контролем. Отмечено также, что сильнее всего активировались SoxRS и OxyR регулоны, тогда как SOS-ответ был менее выражен. При этом сильнее всего исследованные углеводороды усиливали экспрессию гена *oxyR*, что может указывать на повышенное образование перекиси водорода, которая и является триггером для OxyR регулона. Накопление

супероксида отмечается в меньшей степени, что можно заметить по изменению экспрессии гена *soxR*, который кодирует белок SoxR, который реагирует на присутствие супероксида в клетке. Вероятно, имеют место специфические для биопленок механизмы, усиливающие переработку супероксида в перекись водорода, что приводит к таким изменениям в экспрессии.

SOS-ответ, как упоминалось выше, выражен слабо, отмечается только для ароматических углеводов и ограничивается увеличением экспрессии гена *recA*, кодирующего белок RecA. Белок RecA реагирует на участки одноцепочечной ДНК, образовавшиеся в результате разрывов. Эти результаты указывают на то, что только присутствие ароматических углеводов приводит к таким повреждениям, тогда как алифатические углеводороды, циклогексан и дизельное топливо не оказывают такого воздействия. Повреждающее ДНК действие углеводов связано с образованием гидроксильного аниона радикала, который непосредственно повреждает нуклеиновые кислоты. При этом повреждение, вероятно, слабое, так как не происходит активации гена *dinB*, кодирующего транслезионную ДНК-полимеразу IV. Транслезионные ДНК-полимеразы активируются и включаются в работу тогда, когда повреждений ДНК слишком много и они обширные, так что другие ДНК-полимеразы не справляются с ними. Отсутствие активности гена *dinB* указывает на то, что обширных повреждений ДНК в бактериальных биопленках *R. erythropolis* не образуется.

**Заключение.** Результаты исследования указывают на преобладание пероксидного стресса над супероксидным при деградации углеводов биопленками *R. erythropolis*. Также продемонстрирована высокая устойчивость биопленок к воздействию углеводов и активных форм кислорода, образующихся в результате их деградации.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке  
Министерства науки и высшего образования РФ в рамках  
государственного задания в сфере научной деятельности  
№ FENW-2024-0026.*

### Библиографический список:

1. Varjani S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons// Bioresour Technol. – 2017. – N. 223. – P. 277-286
2. Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains// Biotechnol Adv. – 2021. – N. 53:107698.
3. Lewis K. Persister cells // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 64. – P. 357–372
4. Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. Biofilms as complex differentiated communities // Annu. Rev. Microbiol. – 2002. – V. 56. – P. 187–209
5. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 2675–2679
6. Sazykin I., Litsevich A., Khmelevtsova L., Azhogina T., Klimova M., Karchava S., Khammami M., Chernyshenko E., Naumova E., Sazykina M. Expression of *Rhodococcus erythropolis* stress genes in planctonic culture supplemented with various hydrocabons // Microbiol Res. – 2024. – V. 289:127920.
7. De Carvalho C. C. C. R. Biofilms: Microbial strategies for surviving UV exposure // Adv. Exp. Med. Biol. – 2017. – V. 996. – P. 233–239
8. Hou J., Veeregowda D.H., van de Belt-Gritter B., Busscher H.J., van der Mei H.C. Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in *Staphylococcus aureus* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – V. 84:e01516-17
9. Marsden A. E., Grudzinski K., Ondrey J. M., DeLoney-Marino C. R., Visick K. L. Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri* // PLoS ONE. – 2017. – V. 12:e0169521
10. Hathroubi S., Mekni M.A., Domenico P., Nguyen D., Jacques M. Biofilms: Microbial shelters against antibiotics // Microb. Drug Resist. – 2017. – V. 23. – P. 147–156

**STUDY OF STRESS GENES EXPRESSION IN RHODOCOCCLUS  
ERYTHROPOLIS BIOFILMS UNDER SUPPLEMENTED WITH  
HYDROCARBONS**

**Litsevich A.R., Sazykin I. S., Khmelevtsova L. E., Sazykina M. A.  
FSBEI HE Southern Federal University**

**Keywords:** *oxidative stress, gene expression, superoxide dismutase, catalase, SOS-response, biofilm.*

*This work is devoted to the adaptive stress response of Rhodococcus erythropolis bacterial biofilms to the influence of hydrocarbons of various structural classes. It is pointed out that bacterial biofilms are less susceptible to damage by reactive oxygen species formed during the degradation of hydrocarbons.*