



УДК 612. 398:577.121.3

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТУ БУТАНОЛУ ПОРІВНЯННЯМ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНА 16S рРНК

С. Г. ПРИЙОМОВ, доктор технічних наук

О. О. ТІГУНОВА, провідний інженер

ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»

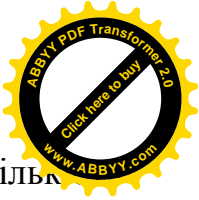
E-mail: innagoriunova@yandex.ua

Анотація. Визначення філогенетичної спорідненості нових штамів-продуцентів є найпершою ланкою в оптимізації умов культивування штаму та інтенсифікації синтезу цільового продукту (бутанолу). Завданням даної роботи було провести аналіз нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК та філогенетичний аналіз штаму з використанням методів поєднання найближчих сусідів та максимальної подібності. В результаті проведених досліджень було підтверджено, що *Clostridium acetobutylicum* IFBG СБН дісно відноситься до роду *Clostridium*. Гомологія нового штаму з існуючими склала 99 %. Враховуючи морфологічні особливості й філогенетичну спорідненість штаму до бактерій роду *Clostridium* можна зробити висновок, що *C. acetobutylicum* IFBG СБН представляє науковий інтерес та потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: *філогенез, бутанол, штами-продуценти*

Бродіння цукрів з утворенням масляної кислоти було відкрито Пастером у 1861 році. Невдовзі було знайдено мікроорганізми, які утворювали масляну кислоту і було виявлено, що такий тип бродіння притаманний деяким видам клостридій. Як правило, тільки облигатні анаероби, до яких відносяться представники 4-х родів *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, в якості основного продукту бродіння утворюють бутират [6].

Механізм утворення бутирату був мало зрозумілим доки не було відкрито ферредоксин. Клострідії використовували фосфотрансферазну систему для споживання цукрів. Розщеплення гексозофосфатів до пірувату проходить шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса. Перетворення пірувату в ацетил-КоА відбувається за участю піруват:ферредоксин-оксидоредуктази [5].



Бактерії, які утворюють у процесі своєї життєдіяльності значну кількість ацетону та бутанолу широко розповсюджені у природі. Як правило, вони в основному знаходяться у ґрунті і можуть бути виділені у вигляді чистих культур [1]. З різноманітних видів мікроорганізмів, які відносяться до роду клостридій, найбільш активним продуцентом розчинників є *C. acetobutylicum* [3].

Правильне визначення видової приналежності штаму відкриває можливості оптимізації умов культивування та генетичних маніпуляцій для збільшення виходу бутанолу. Для ідентифікації виду мікроорганізму потрібно застосовувати комплексний підхід із застосуванням генетичних та фенотипічних методів. Спосіб ідентифікації різних мікроорганізмів за допомогою аналізу нуклеотидної послідовності генів, що кодують рибосомальну РНК, є одним з найбільш точних і універсальних [3,4,7].

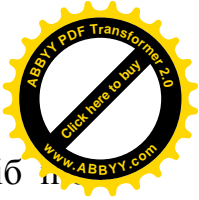
Мета дослідження – ідентифікація нового штаму-продуценту бутанолу.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження був штам *C. acetobutylicum* IFBG С6Н з «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (далі Колекція).

В якості активаційних середовищ використовували середовище Виноградського та скибки картоплі, натерті крейдою; в якості ензиматичного використовували мелясне середовище [1].

В якості селективного середовища використовували середовище [3], яке містило 20 г/л глюкози. В якості синтетичного середовища для вивчення продуктивності штамів на різних джерелах вуглецю використовували середовище [2].

Для забарвлення живих препаратів використовували розчин Люголю, а для вітального – метиленового синього. Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопу “Laboval” (Німеччина). Знімки робили за допомогою фотоапарату “Canon PowerShot A640” (Японія).



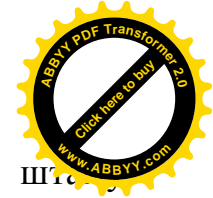
Культивування зразків проводили за методикою [1]. Через 7 діб на початку ферментації клітини осаджали за допомогою ультрацентрифуги “Labofuge 400R” (Німеччина) протягом 30 хв за 13000 об/хв. Культивування проводили у колбах об’ємом 500 мл з використанням 250 мл середовища. Колби зважували і термостатували за температури 35 °С. Після ферментації з культуральної рідини відганяли продукти бродіння.

Виділення ДНК проводили згідно [7]. Для більш ефективного лізису клітин додавали 1 % розчин лізоциму (10 мг/мл). Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в трис-ацетатній буферній системі.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі “Mastercycler personal 5332” (Eppendorf) в пробірках. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази, 2,0 мМ хлориду магнію, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об’єм реакційної суміші дорівнював 20 мкл. Умови ампліфікації: початкова денатурація: 94 °С– 3 хв; 94 °С– 30 с, 57 °С– 45 с, 72 °С – 30 с; кількість циклів – 32. Кінцева елонгація: 72 °С– 5 хв. Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ампліфікації проводили в трис-ацетатній буферній системі. Отриманий фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору Macherey-Nagel NucleoSpin Extract згідно інструкції фірми-виробника.

Послідовності сиквенували на автоматичному сиквенаторі “ABI PRISM 310 Genetic Analyser” (Applied Biosystems). Результуючий контиг сиквенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньо-комплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Аналіз сиквенсу проводили за допомогою програмного забезпечення MEGA5, включаючи алгоритм ClustalW. Гомологічні послідовності підбирали з бази даних «GenBank». Філогенетична діаграма була створена з використанням методу поєднання найближчих сусідів [3].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в трьох повтореннях.



Результати дослідження та їх обговорення. Для порівняння штампів продуценту бутанолу з Колекції зі спорідненими штамми було виділено ДНК бактерії і визначено нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК. Чистоту виділеного фрагмента ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу (рис. 1).

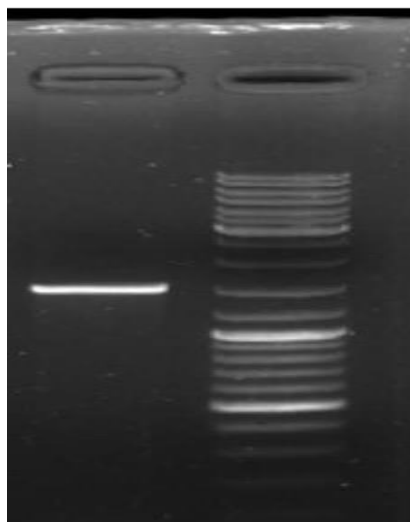
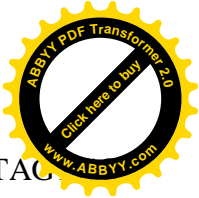


Рис. 1. Електрофореграма фрагмента гена 16S рРНК

Ампліфікацію гена 16S рРНК здійснювали з використанням універсальних бактеріальних праймерів 27f та 1492 г з подальшим сиквенуванням. Вирівнювання гена 16S рРНК штаму *C. acetobutylicum* IFBG СБН проводили в програмі ClustalW. Отримана послідовність наведена нижче.

```
GGGGAGTGCGGGTCTTACACATGCAGTCGAGCGAGAAACCTTCGGGTTTCTAGCGGCG  
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAAAGAGGGGAATAGCCTCCCGAAAG  
GGAGATTAATACCGCATAATATTAAGTTTCACATGGAGCTTTAATTAAGGAGTAAT  
CCGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGAGAGGTAACGGCTCACCAAG  
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTACGACACGGT  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGAT  
GCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTGGGAC  
GATAATGACGGTACCAAAGGAGGAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTACTGGGCGTAAAGGATGTGTAGGCGGA  
TACTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGGACTGCATTTCAAAGTGGG  
TATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATTAGGAAGAACATCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGGC  
ATGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCGTAAACGATG
```



AGTACTAGTGTAGGAGGTATCGACCTCCTTTCTGGTGCCGCAAGTTACACAACCTAG
TAGGCGGGGTGGAAATGCCGTAGAAGATTAGGAAGAACATCAGTGGCGAGCGCTTTCT
GACTGTACTGACGCTGAGGCATGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA
GTCCACGCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTAGGAGGTATCGACTCATCTGTGCCGCAG
TTAACACAATAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCTAGACTTGACATCTCCTGAATAGCGTAGAGATACGTGAAGCCCTTCGGG
GCAGGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCATTAGTTGCTACCATTAAGTTGAGCACTCTAGT
GAGACTGCCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGTCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGAGAACAACGAGATGCAATACCGTGA
GGTGGAGCTAAACTTGAAAACCTCATCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGAAATTCGCCTGC
ATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTTCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGCTGGTAACACCCGAAGTCCGTGAGG
TAACSTTTATGGGGCCAGCGGCCGAAGGTGGGATACGTGG

Для встановлення родинних зв'язків здійснено філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево. Мірою відповідності набору вирівняних послідовностей даної топології дерева вважають міру (критерій), що ґрунтується на принципі найбільшої правдоподібності. Було досліджено дендрограму філогенетичних зв'язків штаму із Колекції і філогенетично близьких представників роду *Clostridium* з бази даних «GenBank».

Нижче наведено філогенетичне дерево, побудоване одним із статистичних методів – приєднання сусідів. Філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифма подібності для оцінювання еволюційної відстані мало таку саму топологію.

Результати свідчать про філогенетичну гетерогенність досліджуваного штаму і підтверджують належність *C. acetobutylicum* IFBG С6Н до роду *Clostridium*. Показано, що подібність сиквенованих фрагментів 16S рРНК штаму *C. acetobutylicum* IFBG С6Н з фрагментами *C. pasterianum* ATCC 6013 складала 99 %.

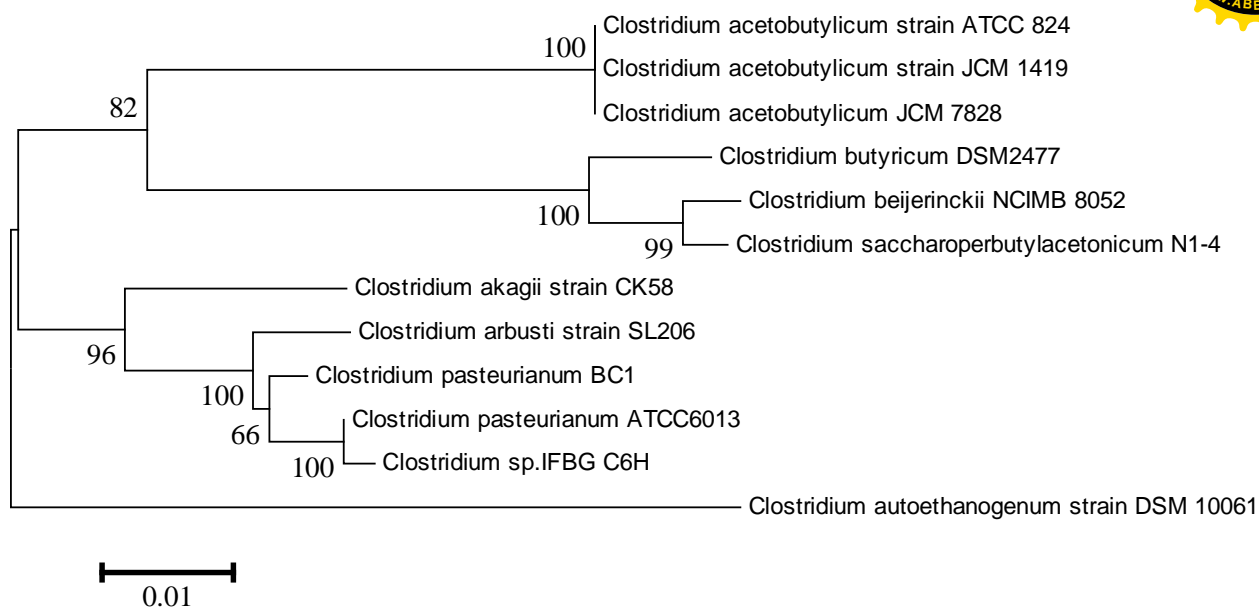


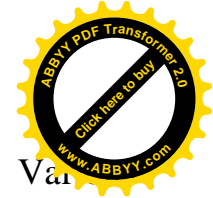
Рис. 2 Дендродіаграма філогенетичних зв'язків деяких представників роду *Clostridium*

Висновки

Таким чином, за допомогою молекулярно-філогенетичного аналізу послідовності гена 16S рРНК штаму *C. acetobutylicum* IFBG С6Н підтверджено належність його до роду *Clostridium* і встановлено філогенетичні зв'язки зі спорідненими штамми з бази даних «GenBank», подібність з якими становила 99 %. Враховуючи морфологічні особливості і філогенетичну спорідненість штаму до бактерій роду *Clostridium* можна зробити висновок, що *C. acetobutylicum* IFBG С6Н представляє науковий інтерес та потребує подальшого вивчення.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шульга С. М. Нові штамми-продуценти біобутанолу. І. Виділення та ідентифікація / С. М.Шульга, О. О.Тігунова // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V 6, No 1. – С. 97-104.
2. Al-Shorgani N. K.N. The effect of different carbone sources on biobutanol production using *C. saccharoperbutylacetonicum* N 1-4 / Al-Shorgani N. K.N, Kalil N. S., Yusoff W. M.W.// *Biotechnology*. – 2011. – 10(3). – P. 280-285.



3. Jonson L. J. Cultures of “Clostridium acetobutylicum” from Various Collections Comprise Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, and two other Distinct Types Based on DNA-DNA Reassociation / Jonson L. J., Toth J., Santiwatanakul S., Chen J. S. // Int. J. of System. Bact. – 1997. – V. 47, No. 2. – P. 420-424.
4. Keis S. Taxonomy and Phylogeny of industrial solvent-producing clostridia / Keis S., Bennett C. F., Ward K. V., Jones D. T // J. of System. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45, No. 4. – P. 693-705.
5. Tigunova O. Biobutanol as an Alternative Type of Fuel / Tigunova O. Shulga S., and Blume Y. // Cytology and Genetics. – 2013. – Vol. 47, No. 6. – P. 51-71.
6. Tigunova O. Obtaining of new butanol producers / Tigunova O., Shulga S // Abst. 15th Eur. Congr. Biotechnol., Istanbul, Turkey, 23-29 September 2012. – V. 29, Issue S. – P. S 43.
7. Wilkinson S. R. Phenotypic and genotypic differences between certain strains of Clostridium acetobutylicum / Wilkinson S. R. ,Young M., Goodacre R., Morris J.G., Farrow J. A. E., Collins M. D. / FEMS Microbiology letters. – 1995. – 125. – P. 199-204.
8. Wilson K. Preparation of Genomic DNA from bacteria / Wilson K. // Current protocol in Molecular biology. – 1997. – Unit 2.4.1.

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА
БУТАНОЛА СРАВНЕНИЕМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ГЕНА 16S рРНК**

С. Г. Приёмов, Е. А. Тигунова

Аннотация. Определение филогенетического сродства новых штаммов-продуцентов является первой ступенью в оптимизации условий культивирования штамма и интенсификации синтеза целевого продукта (бутанола). Задачей данной работы было провести анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и филогенетический анализ штамма с использованием методов соединения ближайших соседей и максимальной подобности. В результате проведённых исследований было подтверждено,



что *Clostridium acetobutylicum* IFBG C6H действительно относится к р. *Clostridium*. Гомология нового штамма с существующими составила 99 %. Учитывая морфологические особенности и филогенетическое родство штамма к бактериальному роду *Clostridium* можно сделать вывод, что *C. acetobutylicum* IFBG C6H представляет научный интерес и требует дальнейшего изучения. Выходя из морфологических особенностей и филогенетического родства штамма можно сделать вывод, что *C. acetobutylicum* IFBG C6H требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: филогенез, бутанол, штамм-продуцент

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BUTANOL PRODUCING STRAINS COMPARED 16S RRNA GENE SEQUENCE

S. Priyomov, O. Tiginova

Abstract. *Determination of a phylogenetic relatedness new producer strains is the first step in optimizing the conditions for cultivation of the strain and stimulation of synthesis of the title product (butanol. The task of this work was to analyze the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene and phylogenetic analysis of a strain using the methods of the compound of the nearest neighbors and the maximum similarity. As a result of investigations it was confirmed that Clostridium acetobutylicum IFBG C6H really belongs to the genus Clostridium. Homology of the novel strain existing is 99 %. Coming out of the morphological characteristics and phylogenetic relationships of the strain it can be concluded that the C. acetobutylicum IFBG C6H requires further study.*

Key words: phylogeny, butanol, producing strain