

# Полногеномное секвенирование термофильного штамма *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup>, перспективного для биотехнологии стероидов

<sup>1</sup>Фокина В.В., <sup>1</sup>Лобастова Т.Г., <sup>1</sup>Брагин Е.Ю., <sup>2,3</sup>Штратникова В.Ю.,  
<sup>1</sup>Стародумова И.П., <sup>1,4</sup>Тарлачков С.В., <sup>1</sup>Донова М.В.

<sup>1</sup>ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
г. Пушкино; [vvfokina@rambler.ru](mailto:vvfokina@rambler.ru)

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, г. Москва

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва

<sup>4</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, г. Пушкино

Ферменты термофильных микроорганизмов благодаря их уникальной способности противостоять воздействию самых разнообразных агрессивных внешних факторов в настоящее время находят широкое применение при производстве моющих средств, пищевых продуктов, кормов, в целлюлозно-бумажной, текстильной и горнодобывающей промышленности, а также – переработке различных отходов (1,2). Однако сообщения об использовании термофильных бактерий, способных специфически модифицировать стероидные соединения, крайне редки (3). Сообщалось о способности лишь некоторых термофильных микроорганизмов модифицировать стероиды (4-9). Умеренно термофильный актинобактериальный штамм *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *hirsuta* исходно был выделен из спонтанно разогревающихся волокнистых остатков сахарного тростника, остающихся после процесса экстракции сахара (10). Недавно нами было показано, что штамм *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup> способен трансформировать литохолевую кислоту (11) и некоторые другие стероидные субстраты (12,13). В данной работе впервые было проведено определение нуклеотидной последовательности и выполнен биоинформатический анализ полного генома типового штамма *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>Т</sup>.

Штамм культивировали на среде, содержащей (г/л): глюкозу – 7, крахмал – 10 и соевый пептон - 7 (рН 7,0-7,2) в аэробных условиях (200 об/мин) при 45°C в течение 48 часов. Полученную культуру использовали в качестве инокулята (10 %) для засева свежей среды того же состава, продолжительность второго этапа культивирования составляла 18 часов. Выделение ДНК проводили, как описано ранее (14).

Фрагментацию геномной ДНК проводили ультразвуком с помощью устройства Covaris S220. Библиотека фрагментов ДНК длиной от 300 до 400 п.н. была подготовлена с помощью набора реагентов NEBNext Ultra II для Illumina в соответствии с инструкцией производителя. Библиотека была секвенирована дважды: на платформе Illumina HiSeq 4000 с наборами реагентов HiSeq 3000/4000 PE cluster kit и HiSeq 3000/4000 SBS kit (300 циклов), а затем на платформе Illumina HiSeq 2500 с наборами HiSeq rapid PE cluster kit v2 и HiSeq rapid SBS kit v2 (500 циклов) в соответствии с инструкцией производителя.

Предварительную обработку чтений, сборку и анализ генома проводили, как описано (14), со следующими модификациями. Удаление адаптеров проводили при значении параметров: ktrim, r; k, 23; mink, 11; hdist, 1; tpe; minlen, 20; и ref, adapters. Удаление частей ридов, имеющих низкое качество, было проведено при значении параметров: qtrim, r; trimq, 15; и minlen, 20. Полученные контиги отбрасывали, если их длина составляла <500 п.н. Парное сходство между последовательностями гена 16S рРНК определяли с использованием программы TaxonDC 1.3 (15).

В результате секвенирования было получено  $5,5 \times 10^6$  парноконцевых чтений длиной 251 п.н. (2,7 млрд. п.н.) и  $2,2 \times 10^6$  парноконцевых чтений длиной 151 п.н. (0,66 млрд. п.н.), 88% оснований имеют показатель качества более Q30. Полученные после предварительной

обработки  $7,6 \times 10^6$  (3,26 млрд. п.н.) парноконцевые чтения были собраны в 46 контигов с 433-кратным покрытием. N50 составляет 504440 п.н., а длина самого длинного контига – 688257 п.н. Размер генома составляет 7,55 млн. п.н. со средним содержанием G+C пар 71,4%. Всего было предсказано 6658 белок-кодирующих генов (1062 из которых являются гипотетическими белками), 53 тРНК, 13 полных или частичных рРНК, 3 нкРНК и 2 массива CRISPR. Как и ожидалось, в геноме штамма ВКМ Ас-666<sup>T</sup> были обнаружены гены катаболизма стероидов.

В настоящее время вид *S. hirsuta* включает подвиды *hirsuta* и *kobensis* (<http://www.bacterio.net/>). В то же время штамм *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>T</sup> (MN515057.1) имеет только 98,59% сходства с последовательностью гена 16S рРНК штамма *S. hirsuta* subsp. *kobensis* JCM 9109T (EU267029.1). Значения ANI и dDDH, рассчитанные для последовательностей генома штаммов ВКМ Ас-666<sup>T</sup> (VWPH01000000) и DSM 44795T (QBKV01000000), составили 89,47% и 39,9%, соответственно, что значительно ниже пороговых значений (95–96% ANI и 70% dDDH) для разграничения видов (16-18). Эти данные, а также различия на фенотипическом уровне (19, 20) указывают, что подвиды *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* и *S. hirsuta* subsp. *kobensis* следует повысить до уровня видов *S. hirsuta* и *S. kobensis*, соответственно.

Данные биоинформатического анализа полного генома *S. hirsuta* subsp. *hirsuta* ВКМ Ас-666<sup>T</sup> являются основой для дальнейшего изучения функционирования генов, продуктов экспрессии генов, регуляции метаболизма стероидов у термофильных актинобактерий, а также открывают перспективы для модификации метаболических путей и создания эффективных биокатализаторов, способных производить ценные биоактивные стероиды.

#### БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 18-14-00361).

#### Литература

1. Afzal M, Al-Awadhi S, and Oommen S. 2013. Br Biotechnol 3(4):581–591. [http://www.journalrepository.org/media/journals/BBJ\\_11/2013/Sep/1378361318-Afzal342013BBJ4516.pdf](http://www.journalrepository.org/media/journals/BBJ_11/2013/Sep/1378361318-Afzal342013BBJ4516.pdf)
2. Littlechild J, Novak H, James P, and Sayer C. 2013. in: Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. 481–507. DOI: 10.1007/978-94-007-5899-5\_19
3. Wiegel J, Ljungdahl LG, Demain AL. 1985. Crit Rev Biotechnol 3(1):39–108. DOI: 10.3109/07388558509150780
4. Smith KE, Williams RAD, Sideso O. 1992. FEMS Microbiol Lett 92(1):29–34. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05229.x
5. Sideso O, Williams RA, Welch SG, Smith KE. 1998. Steroid Biochem Mol Biol 67:163–169. DOI: 10.1016/s0960-0760(98)00101-0
6. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. 2007. Biocatal Biotrans 25(1):43–50. DOI: 10.1080/10242420600906330
7. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. 2005. Steroids 70(4):327–333. DOI: 10.1016/j.steroids.2004.12.003
8. Al-Tamimi S, Al-Awadi S, Oommen S, Afzal M. 2010. Int J Food Sci Nutr 61(1):78–86. DOI: 10.3109/09637480903292619
9. Sodano G, Trabucco A, DeRosa M, Gambacorta A 1982. Experientia 38(11):1311–1312. DOI: 10.1007/BF01954920
10. Lacey J, and Goodfellow MJ. 1975. J Gen Microbiol 88(1):75–85. DOI: 10.1099/00221287-88-1-75
11. Kollerov VV, Monti D, Deshcherevskaya NO, et al. 2013. Steroids 78:370–378. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.12.010
12. Lobastova TG, Khomutov SM, Shutov AA, et al. 2019. Appl Microbiol Biotechnol 103(12):4967–4976. DOI: 10.1007/s00253-019-09828-6

13. Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Шутов А.А., с соавт. Сб тез IV Пушинской школы-конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. 2017. С. 77.
14. Poshekhontseva VY, Bragin EY, Fokina VV, et al., 2019. *Microbiol Resour Announc* 8(24): pii:e00510-19. DOI: 10.1128/MRA.00510-19
15. Tarlachkov SV, Starodumova IP. 2017. *JBG* 3:1–4. DOI: 10.18454/jbg.2017.3.5.1
16. Richter M, Rossello-Mora R. 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126–19131. DOI: 10.1073/pnas.0906412106
17. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, et al. 2013. *BMC Bioinformatics* 14:60. DOI: 10.1186/1471-2105-14-60
18. Chun J, Oren A, Ventosa A, et al. 2018. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:461–466. DOI: 10.1099/ijsem.0.002516
19. Iwasaki A, Itoh H, Mori T. 1979. *J Antibiot (Tokyo)* 32:180–186. DOI: 10.7164/antibiotics.32.180
20. Kim SB, Goodfellow M. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology, the Actinobacteria, part B, vol 5*. Springer, New York, pp. 1392–1410.