

## ПЦР-анализ кодирующего монооксигеназу гена *tbmD* у бактерий – деструкторов хлорароматических производных

С. Н. Стариков<sup>1\*</sup>, А. И. Сагитова<sup>1,4</sup>, Л. И. Якшидавлетова<sup>2</sup>,  
А. П. Чижкова<sup>1,3</sup>, Ю. А. Галяутдинова<sup>1,3</sup>, Т. В. Маркушева<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Уфимский институт биологии УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69.

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

<sup>3</sup>Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы

Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Октябрьской революции, 3-а.

<sup>4</sup>Учебно-научный центр БГПУ им. М. Акмуллы и УИБ УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450008 г. Уфа, улица Октябрьской революции, 3-а.

\*Email: senik0406@gmail.com

В настоящей работе представлены данные сравнительного анализа штаммов-деструкторов хлорароматических соединений, выделенных из популяции почвенных микроорганизмов, подвергавшихся долговременному воздействию нефтехимического производства Республики Башкортостан. ПЦР-анализ деструкторов был проведен с применением праймеров, предложенных В. Гендрикс с соавторами для детекции консервативных регионов гена *tbmD*. Установлено, что в геноме штамма – деструктора хлорароматических производных *Achromobacter* sp. 36P присутствует кодирующий монооксигеназу *tbmD* подобный ген, в то время как его гомологи отсутствуют у представителей родов *Agromyces*, *Cellulosimicrobium*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Результаты работы раскрывают генетическое разнообразие бактерий и расширяют возможности применения микроорганизмов для поддержания качества окружающей среды в техносфере.

**Ключевые слова:** бактерия, монооксигеназа, ген *tbmD*, ПЦР.

### Введение

Известно, что микроорганизмы, обладающие специальными системами акцептирования и превращения молекул загрязнителей в безопасные формы, а также способностью полностью расщеплять токсичные соединения являются ключевыми действующими элементами биотехнологий очистки окружающей среды. В настоящее время микробный катализ считается наиболее перспективным путем утилизации опасных поллютантов стоков химических предприятий, позволяющим осуществить переработ-

ку значительных объемов загрязнителей без образования продуктов вторичной контаминации.

Отмечено, что некоторые почвенные бактерии обладают метаболическим потенциалом для утилизации синтетических ароматических соединений. Катаболические пути разложения ароматики, как правило, направлены на создание ограниченного числа ключевых промежуточных продуктов, таких, как катехол и замещенные катехины.

Важным этапом разработки технологий биоконверсии загрязнителей является генетический скрининг перспективных деструкторов. Несмотря на то, что в последние десятилетия все больше сообщается об особенностях микробного катаболизма, особенности строения систем, контролирующих деградацию ароматических поллютантов остаются во многом неизвестными [1].

Цель настоящей работы – выявление особенностей генетических систем, детерминирующих деградацию ароматических поллютантов у бактерий, в частности, генов первичной атаки, для последующего применения полученных данных в разработках методов очистки окружающей среды.

### Материалы и методы

Объектом исследования являлись деструкторы хлорзамещенных ароматических производных, выделенные из почв зоны нефтехимического производства, а именно, *Achromobacter* sp.36P, *Agromyces* sp. IBRB-34DCP, *Cellulosimicrobium* sp. 38D, *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Rhodococcus rubropertinctus* 5D, *Rhodococcus erythropolis* 17S.

Определение основных физиолого – биохимических признаков штаммов, а также 16S рРНК типирование проведено ранее [2–7]. Рост культур в ходе экспериментальной работы проводили по значениям оптической плотности клеточной суспензии при 590 нм на спектрофотометре СФ – 56 («ЛОМО-спектр», Россия).

Для проведения ПЦР в качестве матрицы использовали ДНК лизатов бактерий, при приготовлении которых клеточную суспензию нагревали до 95°C в течение 5 минут, центрифугировали и применяли супернатант для анализа. При выделении препаратов тотальной ДНК в суспензию микробных клеток вносили лизоцим и инкубировали в течение 30–60 мин при 37 °С. Далее добавляли 0.25 мл 10% SDS, перемешивали, оставляли на 60 мин. В термостате при 37 °С. После этого препараты депротеинизировали смесью фенол/хлороформ/изоамилового спирта (25:24:1) 10–15 мин. После центрифугирования при 4 тыс.об/мин водную фазу отбирали, добавляли 2.5 объема холодного этанола, сформированный осадок растворяли в ТЕ буфере и использовали для ПЦР.

Для ПЦР детекции гена *tbmD* использовали разработанные для консервативных регионов *tbmD* праймеры: F-5'-GCCTGACCATGGATGC(C/G)TACTGG-3' R-5'-GCCAGAACCACTTGTC(A/G)(A/G)TCCA-3' [8]. В реакционную смесь вносили: 2мкл 10x Taq буфера с  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Thermo Scientific), 25 mM  $\text{MgCl}_2$  1.6 мкл, 4 пмоль каждого праймера, 4 mM dNTP – 1 мкл и 0.5 единиц Taq полимеразы, ДНК матрицу – 2мкл,  $\text{H}_2\text{O}$  – до 20 мкл. 1) 95 °C – 5:00, 2) 94 °C – 1:00, 3) 65.5 °C – 1:00, 4) 72 °C – 2:00, 5) 35 циклов 2, 3 и 4 этапа, 6) 72 °C – 10:00. Размер целевого продукта составлял 640 п.н.

Накопление ПЦР-продуктов проводили в амплификаторе TC 2720 (Applied biosystems, США). После амплификации полученные пробы ДНК смешивали с буфером, содержащим 5% глицерина и краситель (0.025% бромфенолового синего или 0.025% ксиленцианола) и фракционировали в 2% горизонтальном агарозном геле при напряжении электрического поля – 6 В/см с маркером длин в диапазоне 100–1000 п.н. По окончании электрофореза фрагменты ДНК окрашивали в растворе бромистого этидиума (в концентрации 0.5 мкг/мл) и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом спектре при 280 нм.

### Результаты и обсуждение

В ряде исследований было показано, что ключевой стадией аэробной биodeградации соединений ароматической природы является катализируемая монооксигеназами первоначальная окислительная атака ароматического кольца [9–10]. В этом контексте монооксигеназная активность клеток микроорганизмов представляют собой эффективный инструмент для борьбы с загрязнением, а гены монооксигеназ представляют непосредственный интерес как объект генетического мониторинга, позволяющего выявить штаммы-деструкторы.

В настоящей работе детекция катаболических генов проводилась с применением предложенных В. Hendrickx с соавторами праймеров гена *tbmD*, контролирующего разрыв ароматического кольца с участием монооксигеназы [8].

Методом ПЦР выявлено отсутствие целевого продукта амплификации генов *tbmD* у штаммов *Agromyces* sp. IBRB-34DCP, *Cellulosimicrobium* sp. 38D, *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Rhodococcus rubropertinctus* 5D и *Rhodococcus erythropolis* 17S. Полученные данные свидетельствуют о том, что в геномах указанных деструкторов отсутствуют последовательности, подобные кодирующим монооксигеназу генам *tbmD*.

Вместе с тем результаты фракционирования ПЦР-продуктов показали, что у одного из штаммов, в частности у *Achromobacter* sp. 36P, обнаруживается целевой амплификат указывающий на присутствие в геноме этого штамма последовательности, подобной гену *tbmD*.

Обсуждая полученные данные, следует принять во внимание то, что по данным GenBank гомологи гена *tbmD* ранее были обнаружены у представителей бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*.

Таким образом, в настоящей работе выявлены свойства нового бактериального деструктора *Achromobacter* sp. 36P, а именно, обнаружены *tbmD* подобные последовательности, кодирующие монооксигеназу, катализирующую первичную атаку ароматического кольца загрязнителей до интермедиатов, доступных для утилизации в цикле Кребса.

Полученные в данной работе результаты, раскрывают особенности генетического разнообразия микроорганизмов и расширяют возможности направленного применения микробов в экотехнологиях нового поколения.

### Литература

1. Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Folkert F., Egli T., Margit M., Schlomann M., Brennerova M., Brenner V., Pieper D., Top E., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site // *Journal of Microbiological Methods*. 2006. Vol. 64, №2. P. 250–265.
2. Kumar A., Trefault N., Olaniran A. O. Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications // *Critical Reviews in Microbiology*. 2014. Vol. 42, №2. P. 194–208.
3. Жарикова Н. В., Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Ясаков Т. Р., Анисимова Л. Г., Маркушева Т. В., Абрамов С. Н. Выделение и анализ биодеградационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus* // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011. Т. 13, №5–2. С. 169–171.
4. Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Маркушева Т. В. Бактериальные гены инициации деградации хлорфеноксиуксусных кислот, кодирующие негемовые железосодержащие оксигеназы с кластером риске-типа // *Генетика*. 2018. Т. 54, №3. С. 292–305.
5. Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Маркушева Т. В. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие  $\alpha$ -кетоглутаратзависимую диоксигеназную активность // *Успехи современной биологии*. 2017. Т. 137, №5. С. 514–528.
6. Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Анисимова Л. Г., Маркушева Т. В. Особенности структуры микробиоты техногенной экосистемы северного промузла рб: бактерии-деструкторы фенола и 2,4-дихлорфенола // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011. Т. 13, №5–2. С. 172–174.
7. Журенко Е. Ю., Маркушева Т. В., Галкин Е. Г., Коробов В. В., Жарикова Н. В., Гафиятова Л. Р. *Glucanobacter ohydans* IBRB-2T – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // *Биотехнология*. 2003. №6. С. 67–71.

8. Коробов В. В., Жарикова Н. В., Анисимова Л. Г., Ясаков Т. Р., Кусова И. В., Журенко Е. Ю., Галкин Е. Г., Маркушева Т. В. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – новый штамм-деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, №3–4. С. 1320–1322.
9. Маркушева Т. В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных: дис. ... д-р биол. наук: 03.02.03. – Уфа, 211. – 296 с.
10. Маркушева Т. В., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Коробов В. В., Ясаков Т. Р., Анисимова Л. Г. Штаммы-деструкторы хлорфеноксикислот гамма – подкласса протеобактерий // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. №5–2. С. 194–195.

## PCR-analysis of the monogizigenase coding *tbmD* gene in bacteria – destructors of chlororomatic derivatives

S. N. Starikov<sup>1\*</sup>, A. I. Sagitova<sup>1,4</sup>, L. I. Yakshidavletova<sup>2</sup>,  
A. P. Chizhkova<sup>1,3</sup>, Y. A. Galyautdinova<sup>1,3</sup>, T. V. Markusheva<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>*Ufa Institute of Biology UFRS RAS*

*69 Prospect Octobrya Street, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>2</sup>*Bashkir State University*

*32 Zaki Validi Street, 450074 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>3</sup>*Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmulla*

*3-a Oktyabr'skoy Revolyutsii Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

<sup>4</sup>*Educational and Scientific Center BSPU named after M. Akmulla and UIB UFRS RAS*

*3-a Oktyabr'skoy Revolyutsii Street, 450008 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: senik0406@gmail.com*

In this study we present the data of a comparative analysis of strains-destructors of chloroaromatic compounds isolated from a population of soil microorganisms exposed to the long-term effects of petrochemical production in the Republic of Bashkortostan. PCR analysis of the destructors was performed using primers proposed by B. Hendrickx et al. to detect the conserved regions of the *tbmD* gene. It has been established that in the genome of *Achromobacter* sp. 36P, there is a similar gene encoding mono-oxygenase *tbmD*, while its homologs are absent in representatives of the genera *Agromyces*, *Cellulosimicrobium*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. The results of the work reveal the genetic diversity of bacteria and expand the possibility of using microorganisms to maintain the quality of the environment in the technosphere.

**Keywords:** bacterium, monooxygenase, *tbmD* gene, PCR.