



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ПЦР АНАЛИЗ КОДИРУЮЩЕГО МОНООКСИГЕНАЗУ ГЕНА *tbmD* У БАКТЕРИЙ - ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Стариков С.Н.<sup>1</sup>, Сагитова А.И.<sup>1,4</sup>,  
Якшидавлетова Л.И.<sup>2</sup>, Дмитриев М.Н.<sup>1,3</sup>,  
Чиждкова А.П.<sup>1,3</sup>, Галаяутдинова Ю.А.<sup>1,3</sup>,  
Маркушева Т.В.<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Уфимский институт биологии Уфимского  
федерального исследовательского центра РАН, Уфа

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, Уфа

<sup>3</sup>Башкирский государственный педагогический  
университет, Уфа

<sup>4</sup>Учебно-научный центр БГПУ и УИБ, Уфа

E-mail: [tmarkusheva@gmail.com](mailto:tmarkusheva@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 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 очистки окружающей среды в техносфере.

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

## PCR ANALYSIS OF *tbmD* GENE ENCODING MONOOXYGENASE IN CHLOROAROMATIC DERIVATIVES BACTERIA - DESTRUCTORS

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

<sup>1</sup>Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research  
Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa

<sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa

<sup>3</sup>Bashkir State Pedagogical University, Ufa

<sup>4</sup>Educational and Scientific Center of Bashkir State  
Pedagogical University and Ufa Institute of Biology

E-mail: [tmarkusheva@gmail.com](mailto:tmarkusheva@gmail.com)

This paper presents the results of comparative analysis of chloroaromatic compounds strains-destructors, isolated from a population of soil microorganisms, exposed to the long-term effects of petrochemical production in the Republic of Bashkortostan. PCR analysis was carried out by a set of primers proposed for the *tbmD* gene conservative regions detection. It has been established that the genome of chloroaromatic derivatives strain - destructor *Achromobacter* sp. 36P contains a monooxygenase-encoding *tbmD*-like gene, while its homologs are absent in representatives of the *Agromyces*, *Cellulosimicrobium*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera.

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

Поступила в редакцию: 4.12.2018

DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-4-186-190](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-4-186-190)

## ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы, обладающие не только способностью превращения молекул загрязнителей в безопасные формы, но и полного их расщепления, рассматриваются в настоящее время в качестве центральных действующих элементов биотехнологий очистки окружающей среды. Микробный катализ считается наиболее перспективным путем утилизации опасных поллютантов в стоках химических предприятий, позволяющим

осуществить переработку значительных объемов загрязнителей без образования продуктов вторичной контаминации.

Отмечено, что у почвенных бактерий, обладающих метаболическим потенциалом для утилизации синтетических ароматических соединений, катаболические пути разложения ароматики, как правило, направлены на создание ключевых промежуточных продуктов, в частности, катехола и замещенных катехинов.

Важным этапом разработки технологий биологической конверсии загрязнителей является скрининг перспективных деструкторов. Несмотря на то, что в последние десятилетия все больше сообщается об особенностях микробного катаболизма, системы, контролирующие деградацию ароматических поллютантов, остаются во многом неизвестными [Kumar et al., 2014; Жарикова и др., 2017, 2018].

Цель настоящей работы – выявление особенностей строения генетических систем, детерминирующих деградацию фенольных поллютантов у бактерий, в частности, первичную атаку ароматического кольца, 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, *Citrobacter* sp. 36-4CPA, *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Rhodococcus rubropertinctus* 5D и *Rhodococcus erythropolis* 17S.

Определение основных физиолого-биохимических признаков штаммов, а также их типирование по последовательности гена 16S рРНК проведено ранее [Жарикова и др., 2011; Коробов и др., 2013 а, 2013 б; Журенко и др., 2003; Zharikova et al., 2018]. Рост культур в ходе экспериментальной работы анализировали по значениям оптической плотности клеточной суспензии при 590 нм на спектрофотометре СФ – 56 («ЛОМО-спектр», Россия).

Для проведения ПЦР в качестве матрицы использовали препараты лизатов бактерий, приготовленные путем нагревания клеточной суспензии до 95°C в течение 5 минут, с последующим центрифугированием. При выделении препаратов тотальной ДНК в суспензию микробных клеток вносили лизоцим и инкубировали в течение 30-60 минут при 37°C. Далее добавляли 0,25 мл 10% SDS, перемешивали, оставляли на 60 минут в термостате при 37°C. После этого препараты обрабатывали смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) в течение 10-15 минут. После центрифугирования при 4 тыс.об/мин водную фазу отбирали, добавляли 2,5 объема холодного этанола, сформированный осадок растворяли в ТЕ буфере и применяли для анализа.

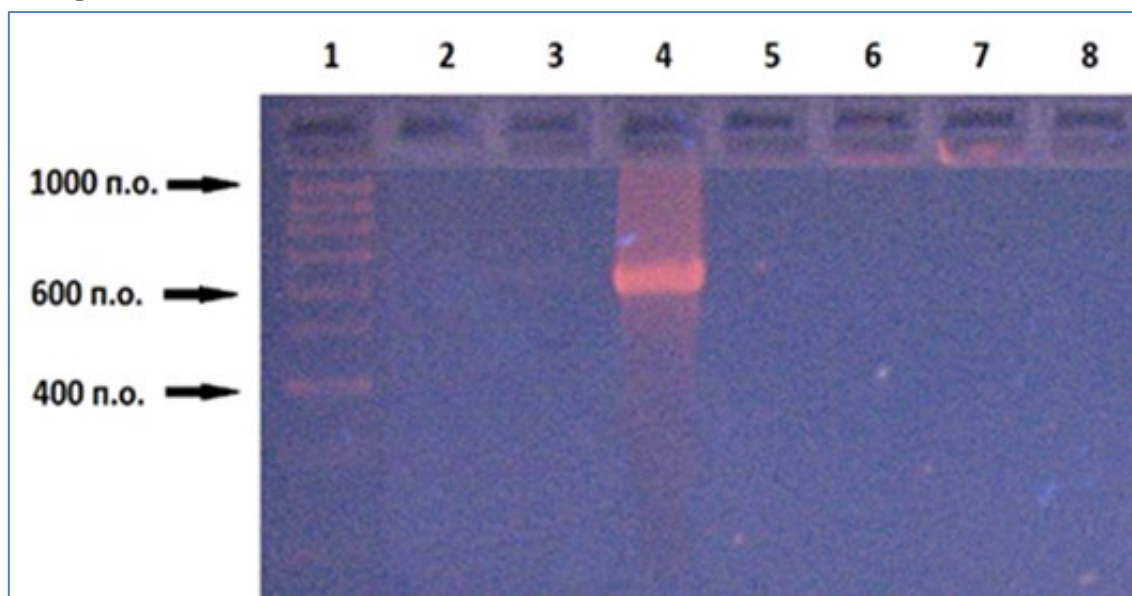
Для ПЦР детекции гена *tbmD* использовали праймеры, разработанные для консервативных регионов гена *tbmD*: F-5'-GCCTGACCATGGATGC(C/G)TACTGG-3' R-5'-GCCAGAACCACTTGTC(A/G)(A/G)TCCA-3' [8]. Реакцию проводили в 20 мкл смеси: 2мкл 10<sup>x</sup> Taq буфера (Thermo Scientific) с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 мМ MgCl<sub>2</sub> 1,6 мкл 4 пМ праймера, 1 мкл 4 мМ dNTP, 0,5 единиц Taq полимеразы и 2мкл ДНК матрицы. Режим амплификации 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.

Накопление целевых ПЦР-продуктов размером 640 п.н. проводили в амплификаторе TC 2720 (Applied biosystems, США). По окончании амплификации пробы ДНК смешивали с буфером, содержащим 5% глицерина и 0,025% бромфенолового синего. Фракционирование амплификатов проводили в 2% агарозном геле при напряжении электрического поля 6 В/см с маркером длин фрагментов ДНК в диапазоне 100-1000 п.н. По окончании электрофореза ДНК окрашивали в растворе бромистого этидиума (в концентрации 0,5 мкг/мл) и затем 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. В этом контексте оксигеназная активность микроорганизмов представляет собой эффективный инструмент в борьбе с загрязнением, а гены оксигеназ могут представлять интерес как объекты мониторинга свойств деструкторов.

В настоящей работе детекция катаболических генов проводилась с применением предложенных В. Hendrickx с соавторами праймеров к консервативному району гена *tbmD*, контролирующего разрыв ароматического кольца с участием монооксигеназы [Hendrickx et al., 2006].



**Рис. 1. Результаты электрофоретического фракционирования ПЦР - амплификатов, полученных с помощью праймеров к консервативным районам гена *tbmD*.**

Условные обозначения: 1 - маркер длин ДНК, 2 - отрицательный контроль, 3 - *Agromyces sp.* IBRB-34DCP, 4 - *Achromobacter sp.* 36P, 5 - *Citrobacter sp.* 36-4CPA, 6 - *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T, 7 - *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, 8 - *Rhodococcus rubropertinctus* 5D.

Результаты электрофоретического фракционирования полученных с помощью праймеров к консервативным районам гена *tbmD* фрагментов ДНК бактерий родов *Agromyces*, *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus* представлены на рис.1.

Электрофореграмма обнаруживает отсутствие целевого продукта амплификации гена *tbmD* у штаммов *Agromyces sp.* IBRB-34DCP, *Cellulosimicrobium sp.* 38D, *Gluconobacter*

*oxydans* IBRB-2T, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Rhodococcus rubropertinctus* 5D и *Rhodococcus erythropolis* 17S. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в геномах указанных деструкторов отсутствуют последовательности, подобные кодирующему монооксигеназу гену *tbmD*.

Вместе с тем фракционирование ПЦР-продуктов показало, 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 приведенное выше, следует принять во внимание то, что ген *tbmD* впервые обнаружили Johnson G. R. и Olsen R. H. в 1997 году в составе оперона *Tb2m Burkholderia* sp. JS150 [Johnson, Olsen, 1997]. По данным NCBI гомологи гена *tbmD* в дальнейшем встречались у бактерий родов *Ralstonia* и *Pseudomonas* [Kahng et al., 2001; Watanabe et al., 1998].

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

Полученные результаты раскрывают особенности генетического разнообразия микроорганизмов техносферы и расширяют возможности применения микробов в экотехнологиях нового поколения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. DOI: [10.3109/1040841X.2014.917068](https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068)
2. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Ясаков Т.Р., Анисимова Л.Г., Маркушева Т.В., Абрамов С.Н. Выделение и анализ биodeградационного потенциала нового природного штамма-деструктора хлорфеноксикислот рода *Rhodococcus* // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011. Т. 13, № 5-2. С. 169–171.
3. 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. DOI: [10.7868/S0016675818030025](https://doi.org/10.7868/S0016675818030025)
4. 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. DOI: [10.7868/S0042132417050076](https://doi.org/10.7868/S0042132417050076)
5. Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T – деструктор 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты // *Биотехнология*. 2003. № 6. С. 67–71.
6. 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 а. Т. 15, № 3-4. С. 1320–1322.
7. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Маркушева Т.В. Ремедиация среды от хлорароматических гербицидов культурой *Arthrobacter globiformis* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013 б. № 2 (40). С. 218–219.
  8. 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. V. 64. № 2. P. 250–265. DOI: [10.1016/j.mimet.2005.04.018](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018)
  9. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. Isolation and sequence analysis of PCS36-4CPA, a small plasmid from *Citrobacter* SP. 36-4CPA Saudi Journal of Biological Sciences. 2018. T. 25. № 4. С. 660–671. DOI: [10.1016/j.sjbs.2016.02.014](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.014)
  10. Johnson G R, Olsen R. H. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150 // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 10. P. 4047–4052.
  11. Kahng H.-Y., Malinverni J.C., Majko M.M., Kukor J. J. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 63. № 10. P. 4805–4816.
  12. Watanabe K., Teramoto M., Futamata H., Harayama S. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 11. P. 4396–4402.