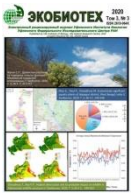
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ КАТАБОЛИЗМА ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ ШТАММА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG

Жарикова Н.В.[1*], Ясаков Т.Р.[1], Коробов В.В.[1], Журенко Е.Ю.[1], Маркушева Т.В.[1], Абрамов С.Н.[2]

[1] Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
[2] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа (Россия)
*E-mail: puzzle111@yandex.ru

У штамма-деструктора хлорфеноксиуксусных кислот *Pseudomonas aeruginosa* 21SG была выделена малая плазмида pPA21SG, размером 6.2 т.п.н. Путем элиминации плазмиды под действием бромистого этидиума (500 мкг/мл), была определена хромосомная локализация генов катаболизма 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т. ПЦР-анализ показал отсутствие в геноме изучаемого штамма *tfdA* и *tftA*, генов инициации путей деградации 2,4-Д и 2,4,5-Т, штаммов *Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4) и *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100.

Ключевые слова: биодеградация, 4-хлорфеноксиуксусная кислота (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т), *tfdA*, *tftA*

THE CHROMOSOMAL LOCATION OF THE CHLOROPHENOXYACETIC ACIDS-DEGRADING GENES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* 21SG STRAIN

Zharikova N.V.[1], Iasakov T.R.[1], Korobov V.V.[1], Zhurenko E.I.[1], Markusheva T.V.[1], Abramov S.N.[2]

[1] Ufa Institute of Biology of the UFRC RAS,
[2] Bashkir State Pedagogical University n. a. M. Akmulla, Ufa (Russia)
*E-mail: puzzle111@yandex.ru

A small plasmid pPA21SG with a size of 6.2 kb was isolated from chlorophenoxyacetic acids-degrading strain *Pseudomonas aeruginosa* 21SG. The chromosomal location of the 4-CPA, 2,4-D and 2,4,5-T degradation genes was determined by the elimination of plasmid from 21SG strain with ethidium bromide (500 μg/ml). A PCR-based analysis revealed the absence in genome of 21SG strain the *tfdA* and *tftA* genes, that responsible for the initiation steps of 2,4-D and 2,4,5-T degradation by strains *Cupriavidus necator* JMP134 (pJP4) и *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100.

Keywords: biodegradation, 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T),), *tfdA*, *tftA*

Поступила в редакцию: 9.07.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-3-305-310

ВВЕДЕНИЕ

4-Хлорфеноксиуксусная (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т) кислоты относятся к группе синтетических ауксинов, которые давно и широко используются для повышения урожайности томатов, подавления двухдольных широколистных сорных растений в посевах кукурузы и зерновых, а также против древесных растений для так называемой очистки в лесном хозяйстве. Повсеместное применение хлорфеноксигербицидов привело к адаптации и селекции части бактериальных штаммов, способных использовать эти соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Такие микроэволюционные процессы идут, как правило, на уровне генов реакций первичного окисления субстратов, которые, в свою очередь, часто локализуются на плазмидах и/или транспозонных элементах, что объясняет механизмы распространения детерминант конверсии среди бактериальных популяций [Phale et al., 2019; Arora and Bae, 2014].

Известно, что у группы бактерий, относящихся к β- и γ-подклассам *Proteobacteria,* детерминанты деградации хлорфеноксиуксусных кислот часто располагаются на плазмидах [обзор: Жарикова и др., 2017]. Например, у штаммов-деструкторов 2,4-Д *Cupriavidus necator* JMP134, *Burkholderia cepacia* 2a и *Achromobacter xylosoxidans* EST4002 гены конверсии располагаются на плазмидах pJP4, pIJB1 и pEST4011, соответственно [Don et al., 1985, Xia et al., 1996; Vedler et al., 2000]. У этой группы стадию инициации катализирует α-кГ-зависимая диоксигеназа, кодируемая геном *tfdA* [Kumar et al., 2016]. В то же время путь деградации 2,4,5-Т у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 имеет хромосомную локализацию, а за стадию инициации отвечает 2,4,5-Т-оксигеназа, α-субъединицу которой кодирует ген *tftA* [Danganan et al 1994].

Цель работы – исследование плазмиды штамма *Pseudomonas aeruginosa* 21SG и локализация генов катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот в его геноме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил природный бактериальный штамм 21SG, изолированный из образца почвы, загрязненной отходами химического производства (г. Уфа, Республика Башкортостан). На основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик, а также последовательности гена 16S рРНК, штамм 21SG был определен как принадлежащий к роду *Pseudomonas* виду *aeruginosa* [Коробов и др., 2018]. Установлено, что культура *P. aeruginosa* 21SG способна осуществлять конверсию 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т [Маркушева и др., 2011].

Чистую бактериальную культуру наращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде М9 (г/л): Na_2HPO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; NaCl – 0.5; NH_4Cl – 1.0, содержащей в качестве единственного источника углерода 4-ХФУК/2,4-Д/2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Методы выделения плазмидной ДНК, ее рестрикционный анализ и элиминации плазмид из клеток штамма под действием бромистого этидия были опубликованы ранее [Маркушева и др. 2004].

Для выделение ДНК-матриц для ПЦР-реакций бактериальные клетки 7 мин нагревали до 95^{o}C, а затем клеточный лизат осветляли 5 мин на центрифуге MiniSpin с ускорением 9840 g (Eppendorf, США).

ПЦР проводили с использованием амплификатора Thermal Cycler (Applied Biosysteme, США) в объеме 25 мкл, содержащем 67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 17 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.001% Tween 20, 2.5 mM $MgCl_2$, 25 пмоль каждого праймера, 2 мМ dNTP – 1.0 мкл и 1.25 единиц Taq-полимеразы (Sigma-Aldrich, США), ДНК-матрица – 1 мкл осветленного клеточного лизата с концентрацией геномной ДНК ~25 ng.

Для амплификации гена *tftA* использовали праймеры: *tftA*_F – 5’ – ACATTCGACGGGAATTGGAA – 3’, *tftA*_R – 5’ – AGGATTGAAGAAATCCTGATA – 3’, реакцию проводили по схеме: 1) 94^{o}C – 2 мин; 2) 94^{o}C – 1мин; 3) 50^{o}C – 1мин; 4) 72^{o}C – 1мин; 5) повтор 2, 3, 4 – 30 циклов; 6) 72^{o}C – 2 мин. В качестве положительного контроля служила ДНК штамма *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W [Huong et al., 2007].

Амплификации гена *tfdA* проводили по следующей программе: 1) 95^{o}C – 6 мин; 2) 94^{o}C – 45с; 3) 64^{o}C – 30с; 4) 72^{o}C – 2мин; 5) повтор 2, 3, 4 50 циклов; 6) 72^{o}C – 2 мин, использовали праймеры *tfdA*_F, 5’ – GAGCACTACGCACTGAACTCCCG – 3’, *tfdA*_R, 5’ – CTTCGGCCACCGGAAGGCCT – 3’ [Bælum et al., 2006]. В качестве положительного контроля служила pJP4 – плазмида деградации 2,4-Д.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом щелочного лизиса из клеток штамма *P. aeruginosa* 21SG была выделена плазмида, получившая обозначение pPA21SG. Обработка плазмиды pPA21SG рестриктазой *BamH*I с дальнейшим фракционированием в 1% агарозном геле выявила два *BamH*I-сайта, которые делили плазмиду на два неравных фрагмента длиной 2.1 и 4.1 т.п.н. (рис.1А). В то же время воздействие на препарат плазмиды рестриктазой *Hind*III показало отсутствие на pPA21SG *Hind*III-сайтов. На основании проведенного анализа был установлен размер плазмиды pPA21SG (6.2 т.п.н.) и составлена ее рестрикционная карта (рис.1В).

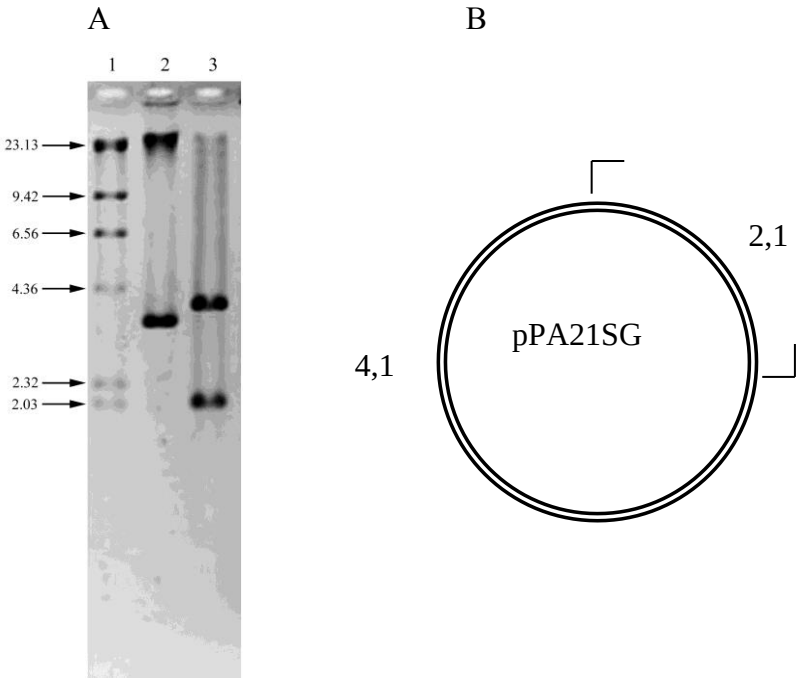


Рис.1 Электрофореграмма рестрикции (А) и схема (В) плазмиды pPA21SG по BamH I-сайтам, где 1 – λ *Hind* III (ДНК маркер); 2 – нативный препарат pPA21SG; 3 – pPA21SG – *BamH* I. Условные обозначения: стрелками показаны размеры фрагментов ДНК маркера

Для локализации детерминант катаболизма 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в геноме штамма *P. aeruginosa* 21SG был использован метод элиминации плазмид. Под действием бромистого этидиума в концентрации 500 мкг/мл были получены бесплазмидные клетки культуры, при этом факт элиминации подтверждался отсутствием плазмид в препаратах внехромосомной ДНК.

Затем бесплазмидные клетки *P. aeruginosa* 21SG высевались на агаризированную минимальную среду М9 с добавлением хлорфеноксиуксусной кислоты (4-ХФУК/2,4-Д/2,4,5-Т) в качестве единственного источника углерода и энергии. Контролем в эксперименте служил рост исходного штамма на такой же минимальной среде (М9 с 4-ХФУК/2,4-Д/2,4,5-Т) и бесплазмидной культуры на богатой среде (МПА) (табл.1).

Таблица 1. Оценка катаболической активности штамма *P. aeruginosa* 21SG к 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т до и после элиминации плазмиды

Штамм	Оценка роста штаммов на средах			
	МПА	М9 с добавлением		
		4-ХФУК	2,4-Д	2,4,5-Т
21SG (pPA21SG –)	+	+	+	+
21SG (pPA21SG +) контроль	+	+	+	+

Из таблицы 1 следует, что исследуемый штамм не потерял способности к конверсии 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т после элиминации плазмиды pPA21SG.

На следующем этапе работы был проведен ПЦР-скрининг генома *P. aeruginosa* 21SG на известные гены *tfdA* и *tftA*, ответственные за стадию инициации конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т штаммов *C. necator* JMP134 (pJP4) и *B. phenoliruptrix* AC1100, соответственно [Don, Weightman, 1985, Danganan et al 1994]. Однако ПЦР-анализ с использованием праймеров, разработанных J.Bælum с соавторами (2006) и N.L. Huong с соавторами (2007), показал отсутствие генов *tfdA* и *tftA* в геноме исследуемого штамма. В то же время обе праймерные системы отжигались корректно, что показало присутствие целевых ПЦР-продуктов в положительных контролях (ДНК плазмиды pJP4 и ДНК штамма *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W).

ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде исследований было показано, что активность бактерий по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам может быть детерминирована внехромосомными элементами, поэтому был осуществлен поиск плазмид у штамма *P. aeruginosa* 21SG. В результате из клеток исследуемого штамма была выделена плазмида pPA21SG. Рестрикционный анализ показал, что она имеет два *BamH*I-сайта рестрикции, а ее длина составляет 6.2 т.п.н. Стоит отметить, что известные плазмиды деградации β- и γ-подклассов протеобактерий обладали гораздо большими размерами, например pJP4 штамма *C. necator* JMP134 – 88т.п.н., pIJB1 штамма *Burkholderia cepacia* 2a – 102 т.п.н. и pEST4011 штамма *Achromobacter xylosoxidans* EST4002 – 70т.п.н. [Don et al., 1985, Xia et al., 1996; Vedler et al., 2000].

На следующем этапе работы с использованием метода дискриминации признака был проведен поиск детерминант катаболизма 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в геноме штамма *P. aeruginosa* 21SG. Одним из доказательств внехромосомной локализации генетических детерминант бактерий служит исключение из их клеток плазмид, на которых могут располагаться такие гены. Если последствием такой дискриминации является необратимая утрата исследуемых свойств, полагают, что детерминанты последних расположены вне хромосомы. Утрата плазмид может быть достигнута обработкой клеток микроорганизмов соединениями, обладающими избирательной ДНК-тропностью. Одним из таких соединений является бромистый этидиум [Zaman et al., 2010].

Под действием бромистого этидиума в концентрации 500 мкг/мл на культуру *P. aeruginosa* 21SG были получены бесплазмидные клетки, которые затем были испытаны на способность использовать 4-ХФУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Так как после потери плазмиды pPA21SG исследуемый штамм не утратил способность к конверсии хлорфеноксиуксусных кислот, следовательно, гены деградации таких субстратов у штамма *P. aeruginosa* 21SG имеют хромосомную локализацию.

Проведенный далее ПЦР-анализ показал отсутствие в геноме изучаемого штамма *tfdA*- и *tftA*-генов, контролирующих, соответственно, стадии инициации двух известных путей конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т культур *C. necator* JMP134 (pJP4) и *B. phenoliruptrix* AC1100.

Данный факт свидетельствует в пользу оригинальности пути конверсии хлорфеноксиуксусных кислот, реализуемого штаммом *P. aeruginosa* 21SG.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 с использованием оборудования центра коллективного пользования УФИЦ РАН «Агидель».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю. Коробов В.В., Маркушева Т.В. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие α-кетоглутаратзависимую диоксигеназную активность // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 5. С. 514–528. https://doi.org/10.7868/S0042132417050076
2. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Применение штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG для очистки промышленных сточных вод // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2018. Т. 73. № 3. С. 185–190.
3. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. Идентификация и характеристика плазмиды штамма *Aeronomas hydrophila* IBRB-36 4cpa, несущей гены катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот // Генетика. 2004. Т. 40. №11. С. 1469–1476.
4. 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.
5. Arora P.K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 13. № 31. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31
6. Bælum J., Henriksen T., Hansen H.C.B., Jacobsen C.S. Degradation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in top- and subsoil is quantitatively linked to the class III *tfdA* gene // Appl Environ Microbiol. 2006. V. 72. No. 2. P. 1476–1486. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1476-1486.2006
7. Danganan C.E., Ye R.W., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M. Nucleotide sequence and functional analysis of the genes encoding 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase in *Pseudomonas cepacia* AC1100 // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 4100–4106.
8. Don R.H., Weightman A.J., Knackmuss H.J, Timmis K.N. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2.4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 (pJP4) // J. Bacteriol. 1985. V. 161. P. 85–90.
9. Huong N.L., Itoh K., Suyama K. Diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)–degrading bacteria in Vietnamese soils // Microbes Environ. 2007. V. 22. P. 243–256. https://doi.org/10.1264/jsme2.22.243
10. 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. 2016. V. 42. № 2. P. 194–208. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068

11. Phale P.S., Shah B.A., Malhotra H. Variability in assembly of degradation operons for naphthalene and its derivative, carbaryl, suggests mobilization through horizontal gene transfer // Genes. 2019. V. 10. № 569. https://doi.org/10.3390/genes10080569
12. Van der Meer J.R, de Vos WM, Harayama S, Zehnder A.J.B. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds // Microbiol. Rev. 1992. V. 56. P. 677–694.
13. Vedler E., Koiv V., Heinaru A. Analysis of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid–degradative plasmid pEST4011 of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* strain EST4002 // Gene. 2000. V. 255. P. 281–288.
14. Xia X.S., Smith A.R., Bruce I.J. Identification and sequencing of a novel insertion sequence, IS1471 in *Burkholderia cepacia* strain 2a // FEMS Microbiol. Lett. 1996. V. 144. No. 2–3. P. 203–206.
15. Zaman M.A., Pasha M.H., Akhter M.Z. Plasmid curing of *Escherichia coli* cells with ethidium bromide, sodium dodecyl sulfate and acridine orange // Bangladesh J Microbiol 2010. V. 27. P. 28–31. https://doi.org/10.3329/bjm.v27i1.9165