

УДК 579.25.5:577.121.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КЛАСТЕРОВ КОНВЕРСИИ 2,4,5-Т БАКТЕРИЙ РОДОВ *BURKHOLDERIA* И *RHODOCOCCUS*

© А. И. Сагитова^{1*}, Н. В. Жарикова¹, Т. Р. Ясаков¹, В. В. Коробов¹,
А. С. Ерастов², Е. Г. Галкин², Е. Ю. Журенко¹, Т. В. Маркушева¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 69.

²Институт органической химии Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.

Тел./факс: +7 (347) 284 31 05.

*Email: tvmark@anrb.ru

С использованием системы праймеров к консервативным областям гена *tftA* *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W выявлено сходство генов α -субъединиц 2,4,5-Т-оксигеназы, катализирующей первую реакцию конверсии 2,4,5-Т, приводящую к образованию 2,4,5-трихлорфенола, у штаммов-деструкторов 2,4,5-Т *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W и *Rhodococcus rubropertinctus* 5D.

Ключевые слова: ПЦР, оксигеназа, актиномицеты, хлорфеноксикислоты.

В ряде исследований было показано, что широко распространенные в природных экосистемах бактерии рода *Rhodococcus* характеризуются оригинальными катаболическими возможностями, которые позволяют представителям этого таксона конвертировать разнообразные по химической структуре углеводороды, включая ароматические, поли- и гетероциклические и их производные – галогенированные фенолы, полихлорбифенилы и др. Сочетание уникальных ферментных систем родококков с устойчивостью их клеток к неблагоприятным условиям среды позволяет считать именно актинобактерии одной из перспективных групп, на основе которой могут быть созданы эффективные биопрепараты, направленные на ремедиацию окружающей среды.

Отмечено, что разнообразие метаболических путей у родококков обусловлено большим размером геномов. В последнее время сведения об особенностях организации генетических механизмов конверсии токсичных и труднодоступных соединений у представителей рода *Rhodococcus* все чаще играют роль решающего фактора в отборе культур, пригодных для практики.

Цель настоящей работы – выявить особенности строения генетических кластеров конверсии 2,4,5-трихлорфеноксисукусной кислоты (2,4,5-Т) штамма *Rhodococcus rubropertinctus* 5D.

Объекты исследований

Объектом исследования служил штамм гамма-подкласса протеобактерий *R. rubropertinctus* 5D, выделенный авторами работы в ходе скрининга деструкторов в смешанных популяциях почвенных микроорганизмов промзоны г. Уфы [1]. Для сравнительных экспериментов использовался штамм *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W, предоставленный К. Itoh.

Методы исследований

Препараты геномной ДНК бактерий *R. rubropertinctus* 5D и *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W

получали путем лизиса клеток нагреванием до 95 °С.

При выполнении ПЦР-анализа применялась следующая система праймеров: *tftA_F*: 5' – ACATTCGACGGGAATTGGAA – 3' , *tftA_R*: AGGATTGAAGAAATCCTGATA – 3' [2]. В реакционную смесь при получении ПЦР-продуктов вносили: 67 mM Tris-HCl (pH 8.3), 17 mM (NH₄)₂SO₄, 0.001% Tween 20, 2.5 mM MgCl₂, 25 пмоль каждого праймера, 2 mM dNTP – 1.0 мкл и 1.25 единиц *Taq*-полимеразы (Sigma), ДНК-матрицу – 1 мкл; H₂O – до 10 мкл. Накопление ПЦР-продуктов проводили в амплификаторе TC 2720 (Applied biosystems, США) в следующем режиме: 1) 94.0 °С – 2:00, 2) 94.0 °С – 1:00, 3) 50.0 °С – 1:00, 4) 72.0 °С – 1:00, 5) 30 циклов 2 – 3 – 4 этапов, 6) 72.0 °С – 2:00, 7) конец программы.

Размеры фрагментов ДНК измеряли относительно маркеров (Fermentas, Литва) в формате программы Gel Analysis. Документацию результатов фракционирования амплификатов осуществляли в проходящем световом потоке трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция) при длине волны 260–280 нм.

Результаты исследований

Известно, что способность бактерий рода *Rhodococcus* к деградации разнообразных ароматических соединений обусловлена наличием в их клетках большого набора оксигеназ [3]. Так, с участием 2,4,5-Т оксигеназы происходит реакция образования 2,4,5-трихлорфенола (2,4,5-ТХФ) из 2,4,5-трихлорфеноксисукусной кислоты (2,4,5-Т). Данная реакция является первой и ключевой в описанном типе метаболизме гербицида 2,4,5-Т у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* AC1100 (ATCC 53867) (ранее *Pseudomonas cepacia* AC1100). Реакция осуществляется с участием оксигеназы, образованной α - и β -субъединицами с молекулярными массами 49 кДа и 24 кДа, соответственно. Полипептиды кодируются генами *tftA* и *tftB* (*tftA1* и *tftA2*) и имеют N-

концевые аминокислотные последовательности, обладающие высокой степенью сходства с таковыми у диоксигеназ, гидроксимирующих ароматические кольца [4, 5]. В дополнение к 2,4,5-Т оксигеназе для осуществления реакции необходимо присутствие NADH, O₂ и редуказной системы. В экспериментах *in vitro* отмечено, что данная реакция у *B. phenoliruptrix* AC1100 невозможна без активности фермента, выделяющегося совместно с 2,4,5-Т оксигеназой, и который, по-видимому, является редуктазой [2, 4, 5].

В ходе настоящего исследования проведен ПЦР-анализ генов α -субъединицы 2,4,5-Т оксигеназы штамма-деструктора 2,4,5-Т *R. rubropertinctus* 5D, выявленного авторами в ходе изучения биоразнообразия почвенных микроорганизмов, подвергавшихся комплексному воздействию факторов химического производства феноксигербицидов на территории Уфимского промузла. Сравнение проводилось с применением предложенной Huong N. L. с соавторами системы праймеров к консервативным областям гена *tftA*, принадлежащего кластеру деструкции 2,4,5-Т штамма *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W, выделенного из образцов почв центральной части Вьетнама, подвергнутой широкомасштабному воздействию 2,4-Д и 2,4,5-Т во время военных действий [2].

Результаты фракционирования ПЦР-продуктов, полученных в экспериментах, позволили выявить амплификаты длиной 500 п.н. как в образце исследуемой геномной ДНК *R. rubropertinctus* 5D, так в образце препарата ДНК *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W, примененного в качестве положительного контроля. Приведенное выше свидетельствует в пользу того, что в геноме *R. rubropertinctus* 5D присутствует гомолог гена *tftA* *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W.

Как указано выше, из работы Huong N. L. с соавторами следует, что ген *tftA*, входящий в кластер *tftAB* *Burkholderia* sp. M38 VN3-2W, детерминирует реакцию, определяющую начальные стадии катаболизма молекул 2,4,5-Т, приводящую к образованию 2,4,5-трихлорфенола, окисляющегося в дальнейшем до хлорфенола 4-монооксигеназой, контролируемой генами *tftCD* [2]. Принимая во внимание полученные данные, можно полагать, что такие же этапы конверсии способны выполнять клетки *R. rubropertinctus* 5D.

Оценивая новизну полученных результатов, следует отметить, что ранее генетические особенности штаммов-деструкторов 2,4,5-Т рода *Rhodococcus* не были исследованы. Из 10-ти разнообразных проб почвы, отобранных по всей территории Вьетнама, Huong N. L. с коллегами выделили 353 деструктора 2,4-Д и 2,4,5-Т, при этом авторами отмечено, что большинство штаммов относится к родам *Burkholderia* (43.3%), *Sphingomonas* (40.2%) и *Ralstonia* (15.3%), в то время как штаммы рода *Rhodococcus*, не обнаруживались [2]. При изучении

техногенной экосистемы Уфимского промузла авторами настоящего исследования кроме штамма *R. rubropertinctus* 5D, были обнаружены деструкторы фенола и его хлорированных производных, включая 2,4-Д и 2,4,5-Т, родов *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Raoultella*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* [6–12].

В других работах среди представителей рода *Rhodococcus* были выявлены деструкторы фенола. Установлено, что культура *Rhodococcus* sp. AQ5NOL 2 утилизировала фенол через мета-путь расщепления ароматического кольца. Кроме фенола данный штамм разлагал дизельное топливо, 2,4-динитрофенол и *p*-крезол [13]. Описан штамм *R. erythropolis*, способный расти на феноле [14], а также культура *Rhodococcus* sp. Chr-9, утилизирующая фенол и пиридин [15].

Таким образом, на примере штаммов *R. rubropertinctus* 5D и *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W обнаружено сходство в организации генетического кластера, контролирующего конверсию 2,4,5-Т в клетках грамположительных актиномицетов рода *Rhodococcus* и грамотрицательных бактерий рода *Burkholderia*, относящихся к разным экосистемам.

Полученные данные вносят вклад в понимание особенностей строения геномов бактерий современной биосферы и могут быть использованы в разработках микробиологических методов очистки окружающей среды от загрязнителей ароматического ряда.

Работа выполнена при содействии гранта программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

ЛИТЕРАТУРА

1. 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 хлорфеноксиацетатного рода *Rhodococcus* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. Т. 13. №5(2). С. 169–171.
2. Huong N. L., Itoh K., Suyama K. Diversity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid – Degrading bacteria in Vietnamese Soils // *Microbes Environ.* 2007. V. 22. No. 3. P. 243–256.
3. Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Current Opin. in Biotechnology*, 2005. V. 16. No. 3. P. 282–290.
4. Xun L., Wagon K. Purification and properties of component B of 2,4,5-trichlorophenoxyacetate oxygenase from *Pseudomonas cepacia* AC1100 // *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. V. 61. No. 9. P. 3499–3502.
5. Hübner A., Clyde E., Danganan, Xun L., Chakrabarty A. M., Hendrickson W. Genes for 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: characterization of the *tftC* and *tftD* genes and locations of the *tft* operons on multiple replicons // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V. 64. No. 4. P. 2086–2093.
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. Федорова А. А., Коробов В. В., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Анисимова Л. Г., Маркушева Т. В. Особенности ассимиляции 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты *Bacillus subtilis* 16 // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. №4/1(38). С. 182–183.
8. Коробов В. В., Журенко Е. Ю., Маркушева Т. В. Ремедиация среды от хлорароматических гербицидов культурой *Arthrobacter globiformis* // Известия Оренбургского Государственного Аграрного Университета. 2013. №2(40). С. 218–219.
9. 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 С. 1320–1322.
10. Коробов В. В., Маркушева Т. В., Кусова И. В., Журенко Е. Ю., Галкин Е. Г., Жарикова Н. В., Гафиятова Л. Р. Штамм бактерий *Serratia marcescens* B-6493 – деструктор фенола и 2,4-дихлорфенола // Биотехнология. 2006. №2. С. 63–65.
11. 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.
12. Жарикова Н. В., Журенко Е. Ю., Коробов В. В., Ясаков Т. Р., Анисимова Л. Г., Маркушева Т. В. Биоразнообразии бактерий-деструкторов хлорированных феноксикислот // Вестник оренбургского государственного университета. 2009. №6. С. 121–123.
13. Arif N.M., Ahmad S.A., Syed M.A., Shukor M.Y. Isolation and characterization of a phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain AQ5NOL 2 KCTC 11961BP // J. Basic Microbiol. 2013. No. 53(1). P. 9–19.
14. Kolouchova I, Schreiberova O, Masak J, Sigler K, Rezanka T. Structural analysis of mycolic acids from phenol-degrading strain of *Rhodococcus erythropolis* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Folia Microbiol (Praha). 2012. No. 57(6). P. 473–483.
15. Sun JQ, Xu L, Tang YQ, Chen FM, Liu WQ, Wu XL. Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the presence of chromium (VI) or phenol // J. Hazard Mater. 2011. V. 191. No. 1–3. P. 62–68.

Поступила в редакцию 02.07.2014 г.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF 2,4,5-T CONVERSION GENETIC
CLUSTERS OF *RHODOCOCCUS* AND *BURKHOLDERIA*
BACTERIAL GENERA**

© A. I. Sagitova^{1*}, N. V. Zharikova¹, T. R. Yasakov¹, V. V. Korobov¹, A. S. Erastov²,
E. G. Galkin², E. Yu. Zhurenko¹, T. V. Markusheva¹

¹*Institute of Biology USC RAS
69 Ocyabrya Ave., 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Institute of organic chemistry USC RAS
71 Ocyabrya Ave., 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

Phone: +7 (347) 284 31 05.

**Email: tvmark@anrb.ru*

Many species of wide distributed in natural ecosystems gram-positive *Actinomycetes* are characterized by original catabolic features that allow members of this taxon to convert aromatic hydrocarbons including their halogenated derivatives. The combination in *Rhodococcus* cells unique enzyme systems with resistance to adverse environmental conditions opens the opportunities to offer the members of this bacterial genus as one of the most promising group for the development of effective environment remediation in the technosphere. Unfortunately, the experimental data are scarce for most of actinomycetes destructors. We focused our attention on the features of the *Rhodococcus* genes, determining 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) conversion. The special primers system to the conservative *tftA* gene regions *tftA* F: 5' - CATTTCGACGGGAATTGGAA - 3', *tftA* R: 5' -AGGATTGAAGAAATCCTGATA - 3' had been used for PCR analysis [Huong NL, 2007]. The results revealed the similarity of α -subunits 2,4,5-T oxygenase genes, catalyzing the first reaction of 2,4,5-T conversion in *R. rubropertinctus* 5D and *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W cells. The received data can be applied for the new strains destructors *in vitro* design.

Keywords: *PCR, oxygenase, actinomycetes, chlorophenoxyacetic acid.*

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Zharikova N. V., Zhurenko E. Yu., Korobov V. V., Yasakov T. R., Anisimova L. G., Markusheva T. V., Abramov S. N. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2011. Vol. 13. No. 5(2). Pp. 169–171.
2. Huong N. L., Itoh K., Suyama K. *Microbes Environ*. 2007. Vol. 22. No. 3. Pp. 243–256.
3. Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C. *Current Jpinion in Biotechnology*. 2005. Vol. 16. No. 3. Pp. 282–290.
4. Xun L., Wagnon K. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. Vol. 61. No. 9. Pp. 3499–3502.
5. Hübner A., Clyde E., Danganan, Xun L., Chakrabarty A. M., Hendrickson W. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64. No. 4. Pp. 2086–2093.
6. Zhurenko E. Yu., Korobov V. V., Zharikova N. V., Yasakov T. R., Anisimova L. G., Markusheva T. V. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2011. Vol. 13. No. 5(2). Pp. 172–174.
7. Fedorova A. A., Korobov V. V., Zhurenko E. Yu., Zharikova N. V., Yasakov T. R., Anisimova L. G., Markusheva T. V. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki*. 2011. No. 4/1(38). Pp. 182–183.
8. Korobov V. V., Zhurenko E. Yu., Markusheva T. V. *Izvestiya Orenburgskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta*. 2013. No. 2(40). Pp. 218–219.
9. Korobov V. V., Zharikova N. V., Anisimova L. G., Yasakov T. R., Kusova I. V., Zhurenko E. Yu., Galkin E. G., Markusheva T. V. *Agromyces* sp. IBRB-34DCP – novyi shtamm-destruktor fenola i 2,4-diklorfenola *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2013. Vol. 15. No. 3 Pp. 1320–1322.
10. Korobov V. V., Markusheva T. V., Kusova I. V., Zhurenko E. Yu., Galkin E. G., Zharikova N. V., Gafiyatova L. R. *Biotekhnologiya*. 2006. No. 2. Pp. 63–65.
11. Markusheva T. V., Zhurenko E. Yu., Zharikova N. V., Korobov V. V., Yasakov T. R., Anisimova L. G. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2011. Vol. 13. No. 5(2). Pp. 194–195.
12. Zharikova N. V., Zhurenko E. Yu., Korobov V. V., Yasakov T. R., Anisimova L. G., Markusheva T. V. *Vestnik orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2009. No. 6. Pp. 121–123.
13. Arif N.M., Ahmad S.A., Syed M.A., Shukor M.Y. J. *Basic Microbiol*. 2013. No. 53(1). Pp. 9–19.
14. Kolouchova I, Schreiberova O, Masak J, Sigler K, Rezanka T. *Folia Microbiol (Praha)*. 2012. No. 57(6). Pp. 473–483.
15. Sun JQ, Xu L, Tang YQ, Chen FM, Liu WQ, Wu XL. *J. Hazard Mater*. 2011. Vol. 191. No. 1–3. Pp. 62–68.

Received 02.07.2014.