ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

СКРИНИНГ ГЕНА *tod C1* У БАКТЕРИЙ ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Адельгареева А.Ю., Стариков С.Н.,
Маркушева Т.В.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа

*E-mail: tmarkusheva@gmail.com

В настоящем исследовании проведен скрининг гена *todC1* у микроорганизмов промышленных экотопов Республики Башкортостан. В ходе ПЦР-анализа в геномах бактерий родов *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodococcus* и *Serratia* не были обнаружены последовательности, подобные гену *todC1*, в то время как ген *todC1* детектировался у представителя рода *Paenibacillus*.

Ключевые слова: ПЦР ♦ ген *tod C1* ♦ бактерия ♦ техногенный экотоп

SCREENING OF *tod C1* GENE IN THE BACTERIA OF TECHNOGENIC ECOTOPES

Adelgareeva A. Yu., Starikov S.N.,
Markusheva T.V.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa

*E-mail: tmarkusheva@gmail.com

The *todC1* gene was screened in microorganisms of the Republic of Bashkortostan industrial ecotopes. The *todC1*-like sequences were not found in the bacteria of the *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodococcus* and *Serratia* genera. The *todC1* gene was detected by PCR in the bacteria of *Paenibacillus* genus.

Keywords: PCR ♦ *tod C1* gene ♦ bacteria ♦ technogenic ecotope

Поступила в редакцию: 13.12.2021

DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-4-310-315](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-4-310-315)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что ароматические соединения составляют группу широко распространенных загрязнителей окружающей среды из-за производственной деятельности человека, а также от природных явлений [Gibson et al., 2000].

В связи с исследованием проблемы круговорота ароматического углерода значительные усилия были направлены на изучение потенциала ароматической деградации у микроорганизмов с учетом перспективы их применения для ремедиации окружающей среды [Gibson et al., 2000]. Отмечено, что ключевыми в бактериальной конверсии ароматических производных являются ферменты, катализирующие реакции инициации расщепления ароматического кольца. Обнаружено существенное разнообразие таких ферментов, однако при этом они имеют общую структуру, главную в переносе электронов и катализе.

В этом контексте изучение новых культур, способных метаболизировать ароматические соединения, представляется важным не только в плане практического использования деструкторов для конверсии загрязнителей, но и для понимания вопросов организации молекулярно-генетических систем прокариот, контролирующих процессы ассимиляции ксенобиотиков в техносфере.

Цель настоящего исследования – скрининг кодирующей ферментативную реакцию инициации атаки ароматического кольца гена *todC1* у выделенных из техногенных экотопов бактерий, принадлежащих различным таксономическим группам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись штаммы бактерий, выделенные из популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся долговременному воздействию нефтехимического производства Республики Башкортостан.

Идентификация штаммов была проведена ранее по совокупности физиолого-биохимических, культурально-морфологических признаков и генетического типирования по последовательности гена 16S рРНК [Zharikova et al., 2018; Korobov и др., 2017; Коробов и др., 2013; Жарикова и др., 2011; Markusheva et al., 2004; Zhurenko et al., 2003].

Посевной материал получали инокуляцией бактерий в разбавленный мясопептонный бульон (1МПБ:5Н₂O). Полученный материал засевали в количестве 0.01% от объема в жидкую базовую солевую питательную среду следующего состава, г/л: NH₄Cl – 1; K₂HPO₄ – 5; MgSO₄·7H₂O – 0.05; FeSO₄·7H₂O – 0.005; CuSO₄·5H₂O – 0,001; ZnSO₄ – 0.0008; pH 6.8–7.0. Культивирование бактерий проводили в термостатированных установках УВМТ-12-250 (115-120 об/мин) при оптимальных температурах. В процессе экспериментальных исследований чистые культуры бактерий поддерживались на агаризованных и жидких средах LB и МПБ. Рост культур осуществлялся в термостатированных условиях при оптимальных температурах в течение 18–24 ч.

Для приготовления препаратов ДНК-матриц использовали свежую биомассу культур, выросших в оптимальных условиях на агаризованной среде в чашках Петри. Клетки суспендировали в 50 мкл стерильной деионизированной воды и затем инкубировали в течение 10 мин при 95°C. После отделения клеточного дебриса путем центрифугирования в течение 6 мин при 12000 об/мин супернатант, содержащий геномную ДНК бактерий, использовали в реакциях ПЦР.

Подбор олигонуклеотидных праймеров гена *todC1* (Табл. 1) и условий его амплификации, включая состав реакционной смеси и режим накопления ПЦР-продуктов (Табл. 2), проводился с учетом исследований, проведенных ранее [Iwai et al., 2007; Hendrickx et al., 2006].

Таблица 1. Характеристика праймеров

Ген	Последовательность нуклеотидов и размер праймера 5' – 3'			Размер амплификатов, п.н.
<i>todC1</i>	<i>todC1</i> -F	5'-CAGTGCCGCCA(C/T)CGTGG(C/T)ATG-3'	21 н	510
	<i>todC1</i> -R	5'-GCCACTTCCATG(C/T)CC(A/G)CCCCA-3'		

При проведении ПЦР в реакционную смесь вносили 75 мМ Tris-HCl, 20мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween, 1,1 мкл 2 мМ MgCl₂ (Thermo Scientific), 2 мкл каждого из dNTP (2 мМ), 4 пМ F / R - праймера, 0,5 ед. Taq-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия), 2 мкл – ДНК-матрицы. Общий объем реакционной смеси доводили до 20 мкл деионизированной водой.

Амплификацию гена *todC1* проводили с использованием термоциклера TC 2720 (Applied biosystems, США) в оптимальных условиях.

Таблица 2. Режим проведения полимеразной цепной реакции

Стадия амплификации	Температура инкубации	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95 °С	5 мин	1
Денатурация	94 °С	1 мин	35
Отжиг	66 °С	1 мин	
Элонгация	72 °С	2 мин	
Финальная элонгация	72 °С	5 мин	1

Сравнительный анализ амплификатов осуществлялся после смешивания образцов с раствором, содержащим 5% глицерина и краситель (0,025% бромфенолового синего или 0,025% ксиленианола) и последующего их фракционирования путем электрофореза в 1--2%-м агарозном геле. Гель-электрофорез осуществляли в камере Bio-Rad Widemini – sub Cell GT с напряжением электрического поля 6 В/см (Bio-Rad Power PC Basic) в течение 25-50 мин в присутствии ДНК-маркера длин в диапазоне от 1000 до 100 п.н. По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидиума (в концентрации 0,5 мкг/мл) и документировали в проходящем ультрафиолетовом свете при 280 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде работ было показано, что главными элементами ферментативных систем метаболических путей разложения ароматических производных являются монооксигеназы и диоксигеназы [Zharikova et al., 2018]. Действие монооксигеназ направлено на метил- или этил- ароматические производные, которые превращаются в соответствующие замещенные пирокатехины или фенилглиоксаль. Диоксигеназы способны преобразовывать ароматические кольца в гидроксизамещенные соединения. При этом на последней стадии катализируемое диоксигеназами разложение субстрата может происходить между гидроксильными группами (орто-расщепление) или по соседству с одним из гидроксильных (мета-расщепление). Модифицированный орто-путь расщепления хлоркатехола является центральным звеном в деградации хлорированных ароматических соединений у бактерий. Путь мета-расщепления больше характерен для конверсии метилированных катехольных субстратов, он играет главную роль в утилизации метилароматических углеводородов, таких как толуол и ксилолы [Zharikova et al., 2018].

Важным этапом микробной конверсии соединений ароматической природы является катализируемая оксигеназами первоначальная окислительная атака ароматического кольца, происходящая в аэробных условиях. В каждой из больших субъединиц оксигеназ была обнаружена область, напоминающая двудерный лиганд железа. Этот мотив также обнаруживался в ферментах, катализирующих реакции, вовлекающие активированный кислород.

Отмечено, что ароматическое соединение становится полностью экологически безопасным только после раскрытия ароматического кольца, происходящего с образованием

низкомолекулярных соединений, таких как пируват и ацетальдегид, которые могут быть далее преобразованы через цикл Кребса [Zharikova et al., 2018]. .

Для изучения метаболического потенциала отдельных микроорганизмов и их сообществ сегодня используются подходы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением праймеров генов, кодирующих ферменты ключевых этапов катаболических путей, вовлекающих производные ароматического ряда в круговорот веществ [Bharagava R. et al., 2019; Stralis-Pavese et al., 2011; He et al., 2007; He et al., 2010; Iwai et al., 2007; Hendrickx et al., 2006].

В ходе настоящих исследований был осуществлен ПЦР-скрининг кодирующего ферментативную реакцию инициации атаки ароматического кольца гена *todC1* у вновь выделенных из техногенных экотопов (ООО «Газпром нефтехим Салават», ОАО «Дубитель» и ОАО «Уфхимпром») бактериальных штаммов, принадлежащих трем филумам: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

В таблице 3 приведены результаты фракционирования амплификатов ПЦР, полученных при использовании специфичных для гена *todC1* праймеров на матрицах геномной ДНК природных штаммов, выделенных из образцов почв и грунтов техногенных экотопов, в том числе: *Bacillus subtilis* №9, *Cellulosimicrobium* sp. 2Т, *Citrobacter* sp. 36-4CPA, *Enterobacter* sp. 38P, *Gordonia alkanivorans* 5D, *Lysinibacillus xylaniticus* №1, *Paenibacillus lautus* №10, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Raoultella planticola* 36D, *Rhodococcus erythropolis* 17S и *Serratia marcescens* 22S.

Таблица 3. Характеристика штаммов бактерий техногенных экосистем

№	ШТАММ	СЕМЕЙСТВО	ОБОЗНАЧЕНИЕ ЭКОТОПА	ГЕНОТИП <i>tod C1</i>
1.	<i>Bacillus subtilis</i> № 9	<i>Bacillaceae</i>	ООО «Газпром нефтехим Салават»	–
2.	<i>Lysinibacillus xylaniticus</i> № 1	<i>Bacillaceae</i>	ООО «Газпром нефтехим Салават»	–
3.	<i>Paenibacillus lautus</i> № 10	<i>Paenibacillaceae</i>	ООО «Газпром нефтехим Салават»	+
4.	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. 2Т	<i>Promicromonosporaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
5.	<i>Gordonia alkanivorans</i> 5D	<i>Gordoniaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
6.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 34DCP	<i>Pseudomonadaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
7.	<i>Raoultella planticola</i> 36D	<i>Enterobacteriaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
8.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 17S	<i>Nocardiaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
9.	<i>Serratia marcescens</i> 22S	<i>Yersiniaceae</i>	ОАО «Уфхимпром»	–
10.	<i>Citrobacter</i> sp. 36-4CPA	<i>Enterobacterales</i>	ОАО «Дубитель» г. Уфа	–
11.	<i>Enterobacter</i> sp. 38P	<i>Enterobacterales</i>	ОАО «Дубитель» г. Уфа	–

Сравнительный анализ электрофореграмм амплификатов, визуализированных в ультрафиолетовом свете относительно маркера длин фрагментов ДНК (100 bp) показал, что на ДНК-матрицах геномов штаммов *Bacillus subtilis* №9, *Cellulosimicrobium* sp. 2Т,

Citrobacter sp. 36-4CPA, *Enterobacter* sp. 38P, *Gordonia alkanivorans* 5D, *Lysinibacillus xylaniticus* №1, *Pseudomonas fluorescens* 34DCP, *Raoultella planticola* 36D, *Rhodococcus erythropolis* 17S, *Serratia marcescens* 22S не происходило накопление целевых фрагментов ДНК с ожидаемым размером 510 п.н., что указывало на отсутствие в геномах изучаемых бактерий последовательностей, подобных гену *todC1* (Табл. 3).

Вместе с тем дифференцирующая детекция фракционирования ПЦР-продуктов, полученных с применением праймеров к гену *todC1*, показала, что в присутствии матриц геномной ДНК изолята *Paenibacillus lautus* №10, выделенного из образца почвогрунта ООО «Газпром нефтехим Салават», обнаруживался целевой амплификат, размером 510 п.н., указывающий на присутствие в геноме этого штамма последовательности, подобной гену *todC1* (Табл. 3).

Проведенный анализ позволил определить в одном из изучаемых экотопов ООО «Газпром нефтехим Салават» целевой генотип, обеспечивающий возможность проведения атаки ароматических углеводородов, что позволяет положительно охарактеризовать вероятные ответы бактериального сообщества этого техногенного экотопа на ксенобиотики ароматического ряда.

Раскрытые геномные характеристики также дают представление об особенностях метаболического потенциала других техногенных экотопов, местом обитания которых являются изучаемые штаммы, а именно, ОАО «Дубитель» и бывшей территории ОАО «Уфахимпром».

Полученные данные раскрывают особенности организации генетических систем, контролирующих процессы аэробной конверсии ароматических производных у подвергавшихся долговременному воздействию крупнотоннажного нефтехимического производства бактерий, принадлежащих различным таксономическим группам, в частности, родам *Bacillus*, *Cellulosimicrobium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodococcus* и *Serratia*.

Результаты исследований могут быть применены для решения проблемы управления производственными химплощадками, включая вопросы их мониторинга и ремедиации в современных условиях.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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. Gibson D.T. and Parales R.E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology // Current Opinion in Biotechnology. 2000. V.11.P. 236–243. DOI: 10.1016/s0958-1669(00)00090-2
2. 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. V. 25. № 4. P. 660–671. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014
3. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17s, for

- treatment of industrial wastewater // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2017. V. 72. № 4. С. 201–205. DOI: [10.3103/S0096392517040083](https://doi.org/10.3103/S0096392517040083)
4. 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.
 5. 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.
 6. Markusheva T.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R., Galkin E.G. Identification and characterization of a plasmid in strain *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4CPA carrying genes for catabolism of chlorophenoxyacetic acids // Russian Journal of Genetics. 2004. V. 40. № 11. P. 1210–1214.
 7. Zhurenko E.Yu., Markusheva T.V., Galkin E.G., Korobov V.V., Zharikova N.V., Gafiyatova L.R. *Gluconobacter oxydans* IBRB-2T degrades 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid // Biotechnology in Russia. 2003. № 6. P. 75–80.
 8. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Markusheva T.V. Bacterial genes of non-heme iron oxygenases, which have a rieske-type cluster, catalyzing initial stages of degradation of chlorophenoxyacetic acids // Russian Journal of Genetics. 2018. Т. 54. № 3. P. 284–295. DOI: [10.1134/S1022795418030171](https://doi.org/10.1134/S1022795418030171)
 9. Iwai, S., Kurisu, F., Urakawa, H., Yagi, O., and Furumai, H. Development of a 60-mer oligonucleotide microarray on the basis of benzene monooxygenase gene diversity // Applied Microbiology and Biotechnology 2007.V75 P. 929–939. DOI: [10.1007/s00253-007-0877-0](https://doi.org/10.1007/s00253-007-0877-0)
 10. 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)
 11. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Markusheva T.V. Bacterial genes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation encoding α -ketoglutarate-dependent dioxygenase activity // Biology Bulletin Reviews. 2018. Т. 8. № 2. P. 155–167. DOI: [10.1134/S2079086418020081](https://doi.org/10.1134/S2079086418020081)
 12. Bharagava R., Purchase D., Saxena, G., Mulla S. Applications of Metagenomics in Microbial Bioremediation of Pollutants: From Genomics to Environmental Cleanup // Microbial Diversity in the Genomic Era. Ed. 1. Ch.26. 2019. P. 459–477. DOI: [10.1016/B978-0-12-814849-5.00026-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00026-5)
 13. Stralis-Pavese N., Abell G., Sessitsch A. and Bodrossy, L. Analysis of methanotroph community composition using a pmoA-based microbial diagnostic microarray // Nature Protocols. 2011. V. 6.P.609–624. DOI: [10.1038/nprot.2010.191](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.191)
 14. He Z., Gentry T., Schadt C., Wu L., Liebich J., Chong, S., et al. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes // ISME Journal. 2007. V. 1. P.67–77. DOI: [10.1038/ismej.2007.2](https://doi.org/10.1038/ismej.2007.2)
 15. He Z., Deng Y., Van Nostrand J.D., Tu Q., Xu M., Hemme C.L., et al. GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity // ISME Journal. 2010. V.4. P. 1167–1179. DOI: [10.1038/ismej.2010.46](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.46)