

УДК 579.25

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РЕАКЦИЮ ДЕГАЛОГЕНИРОВАНИЯ, БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ 4-ХЛОРБЕНЗОАТА

Е. С. Шумкова^а, И. В. Лобова^б, Л. Н. Ананьина^а, Е. Г. Плотникова^{а,б}

^а Институт экологии и генетики микроорганизмов, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

^б Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Методом полимеразной цепной реакции проведен скрининг бактерий-деструкторов 4-хлорбензойной кислоты на наличие *pcb*-генов, контролирующих реакцию дегалогенирования 4-хлорбензоата. Установлено, что *Arthrobacter* sp. H4, H5, *Pseudomonas fluorescens* H2, *Micrococcus* sp. G120 и *Rhodococcus ruber* P25 содержат *pcbA* и *pcbB* гены, кодирующие 4ХБК-СоА-лигазу и 4ХБК-СоА-дегалогеназу, соответственно. Уровень сходства *pcb*-генов штамма *R. ruber* P25 с деструкторами 4ХБК рода *Arthrobacter* *cjcnfdkztn* 95–99%.

К наиболее распространенным и экологически значимым загрязнителям окружающей среды относятся галогенированные ароматические соединения, в том числе полихлорированные бифенилы (ПХБ) и хлорбензойные кислоты (ХБК). Данные ксенобиотики являются высокотоксичными веществами, способными вызывать серьезные нарушения нервной, репродуктивной и иммунной систем животных и человека (Кулинский, 1999). Они характеризуются высокой устойчивостью к физическим и химическим воздействиям, способны накапливаться в значительных количествах в объектах окружающей среды. Известно, что основная роль в трансформации ПХБ и ХБК в природной среде принадлежит микроорганизмам (Dua et al., 1991; Hickey et al., 1993; Abraham et al., 2002). Изучение процессов разложения этих соединений микроорганизмами приобретает все большую актуальность и является основой для разработки методов биоремедиации загрязненных почв и водных объектов.

Микробная деструкция ПХБ в большинстве случаев идет до стадии образования хлорбензойной и пентадиеновой кислот. Полное разложение хлорированных бифенилов осуществляется смешанными культурами бактерий, в состав которых входят деструкторы ХБК (Hickey et al., 1993; Fava et al., 1994; Fava et al. 1996; Abraham et al., 2002). О природных бактериях, способных утилизировать моно- и дихлорированные бифенилы, имеются лишь единичные публикации (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal, 2000). Однако, появляются работы по созданию рекомбинантных штаммов, осуществляющих полную деструкцию хлорбифе-

нилов (Havel, Reineke, 1991; Hrywna et al., 1999; Dua et al., 2002; Rodrigues et al., 2006). При конструировании таких микроорганизмов используются клонированные гены, контролирующие реакцию дегалогенирования ХБК. Отщепление галогена от молекулы хлорбензойной кислоты приводит к резкому снижению ее биологической устойчивости и делает это соединение доступным в качестве источника питания для большинства микроорганизмов (Карасевич, 1982).

Реакция дехлорирования 4ХБК, в результате которой происходит замещение иона хлора в *para*-положении на гидроксильную группу воды и образование *para*-оксибензойной кислоты, катализируется ферментной системой, включающей 3 компонента: 4ХБК-СоА-лигазу (ген *pcbA*), 4ХБК-СоА-дегалогеназу (ген *pcbB*) и *para*-оксибензоат-СоА-тиоэстеразу (ген *pcbC*) (рис. 1). Подобные ферментные системы обнаружены у ряда деструкторов 4ХБК, в том числе у *Arthrobacter globiformis* K3T1 (Tsoi et al., 1991), *Arthrobacter* sp. SU (Schmitz et al., 1992), *Arthrobacter* sp. TM1 (Gartemann, Eichenlaub, 2001), *Pseudomonas* sp. DJ-12 (Chae et al., 2000).

Из почв, загрязненных отходами производства галогенированных соединений (ОАО «Галоген», Пермь), выделены бактериальные штаммы, способные использовать в качестве единственного источника углерода разнообразные ароматические соединения (бифенил, нафталин, толуол, бензол, фенол), а также моно- и дихлорированные бензойные кислоты. Изолированные биодеструкторы отнесены к родам *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Pseudo-*

monas, *Planococcus* и *Rhodococcus* (Рыбкина, 2003; Рыбкина и др., 2005). Наиболее интересный из изолированных бактерий штамм *Rhodococcus ruber* P25 является эффективным деструктором ряда ксенобиотиков, в том числе *орто*- и *пара*-замещенных моно- и полихлорированных бифенилов, и он обладает ферментативными системами, отвечающими за деградацию 2ХБК и 4ХБК (Рыбкина, 2003).

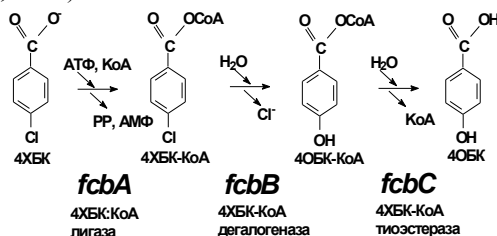


Рис. 1. Схема гидролитического дегалогенирования 4ХБК штаммом *A. globiformis* K3T1 (Tsoi et al., 1991)

Цель настоящей работы – поиск и изучение *fcB*-генов, контролирующих реакцию дегалогенирования, бактерий-деструкторов 4ХБК.

Материалы и методы

Рабочая коллекция. В работе использованы бактериальные штаммы, выделенные ранее из образцов почв, отобранных на территории предприятия ОАО «Галоген» (Пермь): *Arthrobacter* sp. H4, H5, *Micrococcus* sp. G126, G120, *Planococcus* sp. G110, *P. fluorescens* H2, *P. putida* G107, *R. ruber* P25 (Рыбкина, 2003; Рыбкина и др., 2005), а также био-деструктор 4ХБК *A. globiformis* K3T1 (Tsoi et al., 1991).

Среды и условия культивирования. Для культивирования бактериальных культур использовали минеральную среду К1 следующего состава (г/л): K₂HPO₄ × 3H₂O – 4, NaH₂PO₄ × 2H₂O – 0,4, (NH₄)₂SO₄ – 0,5, Ca(NO₃)₂ – 10, MgSO₄ × 7H₂O – 0,15, дополненную раствором витаминов (мкг/л): биотин – 0,02, тиамин – 0,5, рибофлавин – 0,5, инозитол – 0,5, pH среды 7,3 (Zaitsev et al., 1991). В качестве ростового субстрата использовали химически чистую 4ХБК (1 г/л) (Fluka, США), которую добавляли в виде водного раствора. Культивирование микроорганизмов проводили в колбах объемом 250 мл в 100 мл среды при 28°C с аэрацией на шейкере (100 об/мин).

Молекулярно-генетические методы. Выделение тотальной ДНК у исследуемых штаммов проводили по стандартной методике (Ausbel et al., 1995). Плазмидную ДНК выделяли модифицированным методом щелочного лизиса (Marko et al., 1982).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определения нуклеотидных последовательностей исследуемых генов были использованы праймеры, сконструированные на основе известных последовательностей *fcB*-генов штаммов *Arthrobac-*

ter sp. SU и *A. globiformis* K3T1 (GenBank). Праймеры к гену *fcB*A:

f:5'-AACTGATCCCGCCGAGACAACATTC-3',
r:5'-AGGCATTTTTTCGAGACGCTTCA-3';
*fcB*B: f:5'-GGTCCAGCGAGCGAAATCCAGTC-3',
r:5'-CCCCGCACACCCGCATCAAG-3'.

ПЦР осуществляли на приборе MyCycler (BioRad, США) по стандартной методике (Ausbel et al., 1995). Условия проведения ПЦР: 5 мин. при 95°C, далее 30 циклов: 30 сек. при 94°C, 30 сек. при 60°C, 2 мин. 10 сек. при 72°C.

Для обнаружения ДНК и ПЦР-продуктов применяли электрофорез в горизонтальном агарозном геле (1%) при напряжении 60–90 В в трис-ацетатном буфере (89 мМ Трис, 12,5 мМ Na₂ЭДТА, 89 мМ ацетата Na, pH 8,0). Агарозные гели окрашивали раствором бромистого этидия (2 мкг/мл) в течение 20 мин. и фотографировали в УФ-свете с помощью системы гель-документирования Gel Doc™ XR (BioRad, США). В качестве метчиков использовали ДНК λ/HindIII и молекулярный маркер IX (Sigma, Германия). Размер плазмидной ДНК оценивали сравнивая ее электрофоретическую подвижность с подвижностью плазмидной ДНК известного размера. В качестве маркерной плазмиды использовали рK3T1 (110 т.п.н.).

Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) исследуемых участков *fcB*-генов осуществляли с помощью эндонуклеаз рестрикции *HhaI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *PvuII*, *MseI* (Sigma, Германия). Реакцию проводили при 37°C в течение 1–2 часов в объеме реакционной смеси 20 мкл. Построение карт сайтов рестрикции для участков исследуемых генов осуществляли с помощью программы Vector NTI.

Секвенирование продуктов амплификации проводили по методу Сэнгера с помощью набора CEQ Cycle Sequencing kit на автоматическом секвенаторе CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, США) согласно инструкциям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы Chromas 1.45. Нуклеотидные последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями других бактерий-деструкторов с помощью программы CLUSTALX 1.83. Построение дендрограмм сходства исследуемых участков ДНК проводили с помощью метода «neighbor-joining», реализованного в пакете программ TREECONW и PHYLIP. Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев. Для поиска гомологичных нуклеотидных последовательностей в международных базах данных GenBank/EMBL/DBJ использовали программу BLAST.

Результаты и обсуждение

Характеристика штаммов-деструкторов

Для настоящей работы были отобраны восемь штаммов, способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии 4-хлорбензоат: *Arthrobacter* sp. H4, *Arthrobacter* sp. H5, *Micrococcus* sp. G120, *Micrococcus* sp. G126, *Planococcus* sp. G110, *P. fluorescens* H2, *P. putida* G107 и *R. ruber* P25.

Показано, что все бактерии-деструкторы способны к росту на возможных продуктах разложения 4ХБК: *para*-оксибензойной и протокатеховой кислот. Исследуемые штаммы проявляют широкую субстратную специфичность по отношению к различным ароматическим соединениям, способны к росту на феноле, *ortho*-фталате, бензоле и толуоле. Кроме того, изоляты разлагают 2-хлорбензоат (штаммы G120, G126, H2, G107, G110), 3-хлорбензоат и 2,4-дихлорбензоат (штаммы G120, G126, G107, G110) (Рыбкина, 2003; Рыбкина, Гусев, Плотникова, 2005).

Rhodococcus ruber P25 является активным деструктором хлорбифенилов (ХБ): способен утилизировать 2-моноХБ, 4-моноХБ, 2,4-диХБ, 2,2'-диХБ и 4,4'-диХБ, осуществляет 2,3-диоксигенирование ди(*ortho-para*)хлорированного кольца молекулы 2,4,2'-триХБ и окисляет моно(*para*)хлорированное кольцо 2,4,4'-триХБ. Штамм способен к росту на 2ХБК, 4ХБК и 2,4ДХБК, используя данные субстраты в качестве единственного источника углерода и энергии (Рыбкина, 2003).

Известно, что способность к деструкции различных ксенобиотиков, в том числе ХБК, часто определяется генами, расположенными в плаزمиде. Исследуемые нами штаммы были проверены на наличие плазмидной ДНК. Плазмиды большого размера были обнаружены в штаммах *Arthrobacter* sp. H4 (120 т.п.н.) и *P. fluorescens* H2 (100 т.п.н.). Ранее было показано, что штамм *R. ruber* P25 содержит три плазмиды, размеры которых - 110, 90 и 80 т.п.н. Результаты экспериментов по элиминации плазмид позволили предположить, что гены, ответственные за деструкцию 2ХБК и 4ХБК расположены в плазмиде размером 110 т.п.н., гены деструкции бифенила - в плазмиде размером 90 т.п.н., а гены, контролирующие деструкцию нафталина, - в плазмиде размером 80 т.п.н. (Рыбкина, 2003). Таким образом, размер обнаруженных плазмид (100–120 т.п.н.), предположительно содержащих гены деструкции 4ХБК, сопоставим с размером плазмид известных биодеструкторов 4ХБК (Gartemann, Eichenlaub, 2001; Zaitsev et al., 1991). Кроме того, в плазмидных ДНК штаммов *A. globiformis* K3T1, *Arthrobacter* sp. SU были обнаружены *pcb*-гены, контролирующие первый этап разложения 4ХБК до 4-оксибензоата, дальнейшее разложение которого контролируется хромосомальными генами (Zaitsev et al., 1991; Schmitz et al., 1992).

Скрининг штаммов на наличие *pcb*-генов методом полимеразной цепной реакции

На матрице ДНК исследуемых штаммов была проведена амплификация нуклеотидных последовательностей, соответствующих участкам *pcb*-генов, контролирующих первый этап разложения 4ХБК (дегалогенирование) у бактерий. Для выявления генов *pcbA* и *pcbB*, кодирующих 4-хлорбензоат-СоА-лигазу и 4-хлорбензоат-СоА-дегалогеназу соответственно, были использованы праймеры, разработанные на основе известных последовательностей *pcb*-генов штаммов *Arthrobacter* sp. SU и *A. globiformis* K3T1 (GenBank).

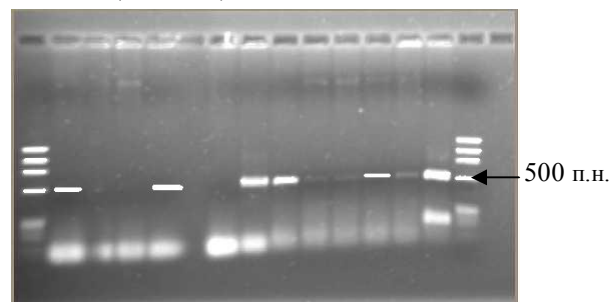


Рис. 2. Гель-электрофорез продуктов ПЦР-амплификации генов *pcb* из препаратов ДНК штаммов: H2 (2 – *pcbA*, 8 – *pcbB*), G107 (3 – *pcbA*, 9 – *pcbB*), G110 (4 – *pcbA*, 10 – *pcbB*), G120 (5 – *pcbA*, 11 – *pcbB*), G126 (6 – *pcbA*, 12 – *pcbB*), K3T1 (7 – *pcbA*, 13 – *pcbB*), маркер IX (1, 14)

У пяти из восьми изучаемых штаммов (H4, H5, H2, G120 и P25) обнаружены ПЦР-продукты длиной около 600 п.н., соответствующие фрагменту гена *pcbA*. Ампликоны такого же размера, соответствующие участку гена *pcbB*, получены для всех исследуемых штаммов (рис. 2, 3). Размер гена *pcbA* у *A. globiformis* K3T1 (GenBank) составляет 1556 п.н. (позиции 277–1833 секвенированной последовательности ДНК), а гена *pcbB* – 830 п.н. (позиции 1843–2673 секвенированной последовательности ДНК). Амплифицируемая область гена *pcbA*, располагающаяся в районе 568–1157 нуклеотидов, соответствует участку около 1/3 длины гена и находится в его центральной части. Амплифицируемый фрагмент гена *pcbB* располагается в районе 2068–2666 нуклеотидов. Этот участок соответствует большей части гена, за исключением первых 200 п.н. Длина амплифицированных фрагментов *pcb*-генов с матриц ДНК исследуемых штаммов совпала с ожидаемой. Полученные данные позволяют предположить наличие у штаммов H4, H5, H2, G120 и P25 генов, контролирующих дегалогенирование 4ХБК.

Более подробно были исследованы нуклеотидные последовательности фрагментов *pcbA* и *pcbB* генов, амплифицированных с матрицы тотальной ДНК *R. ruber* P25 и *Arthrobacter* sp. H4.

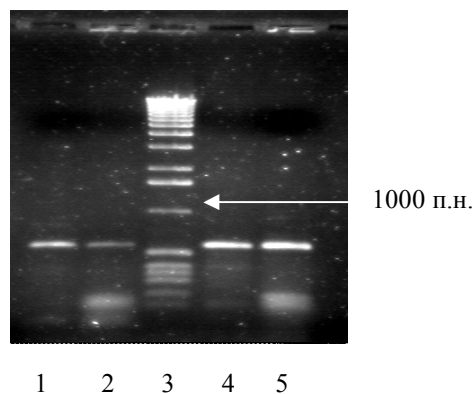


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов ПЦР-амплификации *fcb*-генов штамма КЗТ1 (1, 4) и штамма P25 (2,5): 1,2 – *fcbA*, 4,5 – *fcbB*, 3 – маркер мол. масс 1000 п.н.

ПДРФ-анализ *fcb*-генов штамма *R. ruber* 25

Для подбора эндонуклеаз рестрикции с помощью программы VectorNTI были построены рестрикционные карты генов *fcbA* и *fcbB* штамма *A. globiformis* КЗТ1. ПЦР-продукты *fcb*-генов исследуемого штамма P25 и контрольного штамма КЗТ1 обрабатывали следующими рестриктазами: ДНК *fcbA* – *HhaI*, *HaeIII*, *EcoRV*, *BamHI*, *MseI*, а ДНК *fcbB* – *HhaI*, *HaeIII*, *BamHI*, *PvuII*, *MseI*. Картины гидролиза перечисленными выше ферментами ампликонов *fcb* генов обоих штаммов совпадали (рис. 4, 5) и согласовывались с предполагаемыми результа-

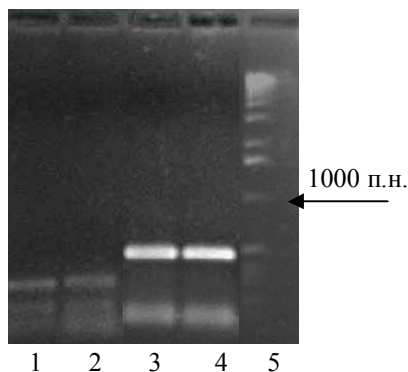


Рис. 4. Электрофореграмма реестрикционных фрагментов, полученных в результате обработки продуктов ПЦР *fcbA* и *fcbB* штамма P25 (1, 3) и штамма КЗТ1 (2, 4) эндонуклеазой *HaeIII*: 1,2 – *fcbA*, 3,4 – *fcbB*; 5 – маркер мол. масс 1000 п.н.

тами построенных рестрикционных карт. Таким образом, полученные результаты говорят о сходстве амплифицированных нуклеотидных последовательностей штаммов, что является дополнительным свидетельством в пользу предположения о сходстве генов/ферментов, осуществляющих де-

галогенирование 4ХБК у штаммов P25 и КЗТ1.

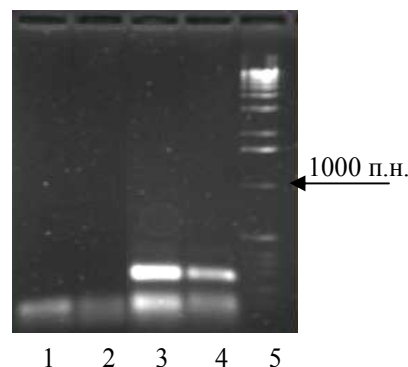


Рис. 5. Электрофореграмма рестрикционных фрагментов, полученных в результате обработки продуктов ПЦР *fcbA* и *fcbB* штамма P25 (1, 3) и штамма КЗТ1 (2, 4) эндонуклеазой *HhaI*: 1, 2 – *fcbA*; 3, 4 – *fcbB*; 5 – маркер мол. масс 1000 п.н.

Анализ нуклеотидных последовательностей *fcb*-генов штаммов-деструкторов 4ХБК

На следующем этапе исследования были определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов *fcbA* и *fcbB* генов штаммов *R. ruber* P25 и *Arthrobacter* sp. Н4. Для проведения сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей с уже имеющимися в международных базах данных GenBank/EMBL/DBJ последовательностями *fcb* генов штаммов-деструкторов 4ХБК была использована программа BLAST. Для участка гена *fcbA* штамма *Arthrobacter* sp. Н4 обнаружено 100% сходство с гомологичными последовательностями штаммов рода *Arthrobacter*: КЗТ1, FG1, SU, TM1. Уровень гомологии секвенированного участка гена *fcbA* штамма *R. ruber* P25 с перечисленными выше штаммами составил 98-99% и 95% – со штаммом *Arthrobacter* sp. FHP1 (рис. 6).

В результате проведения сравнительного анализа гомологичных нуклеотидных последовательностей, соответствующих участку гена *fcbB*, обнаружено 100% сходство штамма *Arthrobacter* sp. Н4 и 98-99% штамма *R. ruber* P25 со всеми исследованными штаммами рода *Arthrobacter* (рис. 6).

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей грамотрицательных штаммов (*Pseudomonas* sp. DJ-12, *Alcaligenes* sp. AL3007) с грамположительными штаммами бактерий-деструкторов 4ХБК составил около 60% для обоих исследуемых *fcb*-генов.

Заключение

Шесть грамположительных и два грамотрицательных штамма-деструктора 4-хлорбензоата были

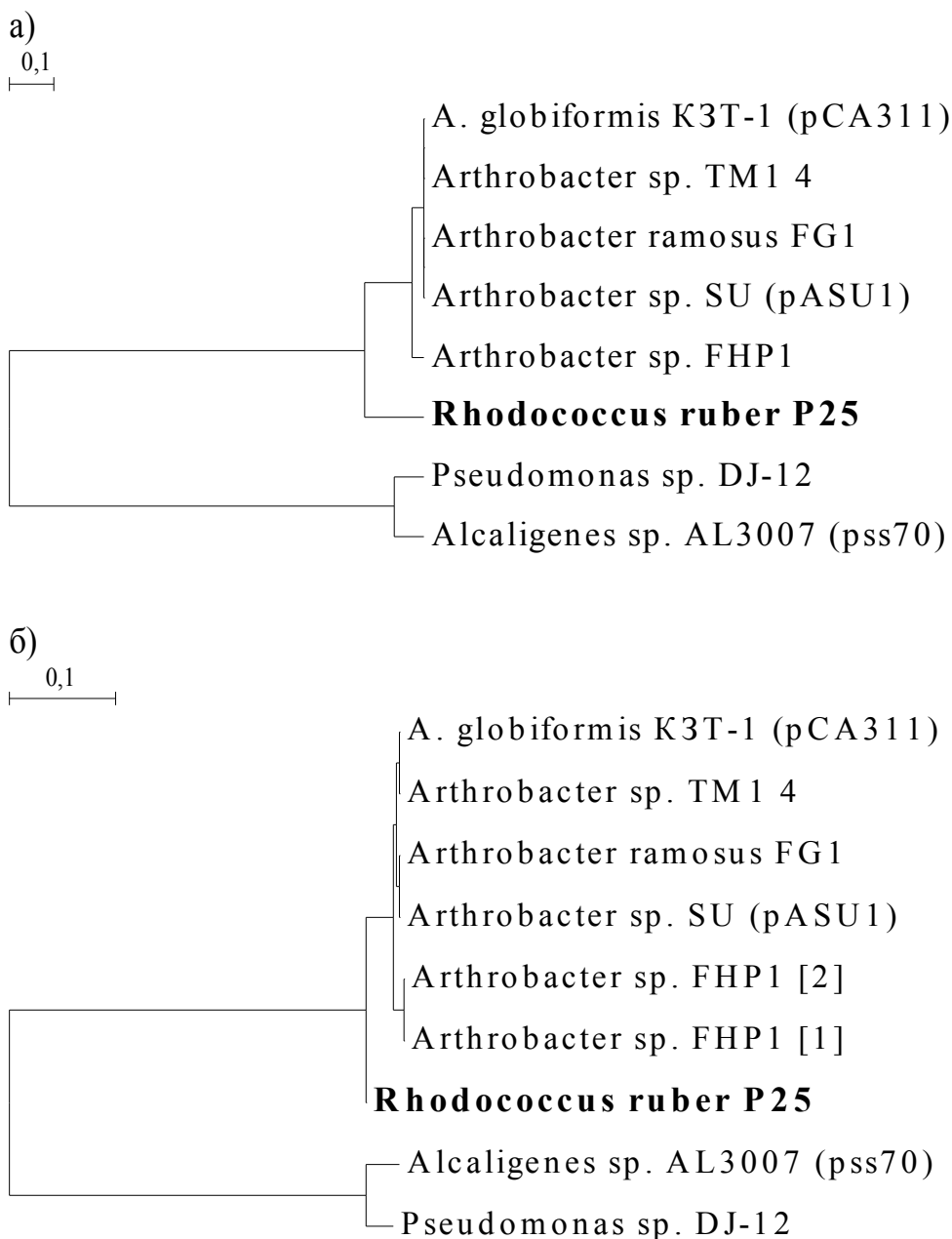


Рис. 6. Древо сходства нуклеотидных последовательностей, гомологичных исследуемым участкам генов *fcbA* (а) и *fcbB* (б) *R. ruber* P25. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. “Bootstrap”-анализ проведен на 100 повторностях

исследованы на наличие генов, контролирующих начальный этап разложения 4ХБК – гидролитическое дегалогенирование. Скрининг исследуемых бактериальных культур методом полимеразной цепной реакции установил наличие у штаммов *Arthrobacter* sp. Н4, Н5, *P. fluorescens* Н2, *Micrococcus* sp. G120 и *R. ruber* P25 генов *fcbA* и *fcbB*, кодирующих 4ХБК-СоА-лигазу и 4ХБК-СоА-дегалогеназу соответственно. Данные белки являются компонентами ферментной системы, осуществляющей реакцию дегалогенирования 4ХБК по гидролитическому пути. У штаммов *P. fluorescens* Н2, *Arthrobacter* sp. Н4 и *R. ruber* P25 гены *fcb*, возможно, локализованы в плазмидах.

ПЦР-анализ ДНК бактериальных культур *Micrococcus* sp. G126, *Planococcus* sp. G110, *P. putida* G107 показал лишь наличие гена *fcbB*. Можно предположить, что нуклеотидные последовательности *fcbA*-генов этих деструкторов отличаются от последовательности генов, на основе которых были синтезированы праймеры. Изучение таких генов представляет интерес и будет продолжено.

Гены *fcbA* и *fcbB* грамположительных штаммов *R. ruber* P25 и *Arthrobacter* sp. Н4 были исследованы более детально. ПДРФ-анализ ПЦР-продуктов и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей *fcb*-генов штамма P25 с гомологичны-

ми последовательностями показали их значительное сходство со штаммами рода *Arthrobacter*.

Таким образом, исследуемые биодеструкторы обладают существенным потенциалом в виде генетических систем деградации *para*-хлорбензоатов, который в перспективе может быть использован в биотехнологиях по очистке почв и водных объектов, загрязненных галогенсодержащими ксенобиотиками.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал №04-04-96042.

Список литературы

- Карасевич Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. М.: Наука, 1982. 144 с.
- Кулинский В.И. Обезвреживание ксенобиотиков. // Соросов. образов. журн. 1999. № 1. С. 8–12.
- Рыбкина Д.О. Исследование аэробных бактерий, разлагающих полихлорированные бифенилы и хлорбензойные кислоты: Дис. ...канд. биол. наук. Пермь, 2003. 181 с.
- Рыбкина Д.О., Гусев В.А., Плотникова Е.Г. Почвенные микроорганизмы, разлагающие ароматические углеводороды и карбоновые кислоты. // Вестн. Перм. ун-та. 2005. № 6. Биология. С. 115–122.
- Abraham W.R. et al. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. // Curr. Opin. Microbiol. 2002. Vol. 5. P. 246–253.
- Arendsdorf J.J., Focht D.D. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. P. 443–447.
- Ausbel F.M. et al. Short protocols in molecular biology. Third edition. 1995. 450 p.
- Chae J.C. et al. Genetic structure and functional implication of the *fcB* gene cluster for hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate from *Pseudomonas* sp. DJ-12. // Gene. 2000. Vol. 258. P. 109–116.
- Dua M. et al. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 59. P. 143–152.
- Fava F. et al. Degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls by a three-membered bacterial co-culture. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. Vol. 41. P. 117–123.
- Fava F. et al. Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed batch bioreactors. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. Vol. 45. P. 562–568.
- Gartemann K.H. and Eichenlaub R. Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1, and development of a system for transposon mutagenesis // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. P. 3729–3736.
- Havel J., Reineke W. Total degradation of various chlorobiphenyls by cocultures and in vivo constructed hybrid pseudomonads. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 78. P. 163–170.
- Hickey W.J., Searles D.B., Focht D.D. Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated with chlorobenzoate-degrading bacteria. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. P. 1194–1200.
- Hrywna Y. et al. Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on *ortho*- and *para*-substituted chlorobiphenyls. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 2163–2169.
- Kim S., Picardal F.W. A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as a growth substrates. // FEMS Microb. Letters. 2000. V.185. P. 225–229.
- Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. // Analit. Biochem. 1982. Vol. 121. P. 382–388.
- Rodrigues J.L. et al. Degradation of aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400 (*ohb*) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1 (*fcB*). // Appl Environ Microbiol. 2006. Vol. 72. P. 2476–2482.
- Schmitz A. et al. Cloning and sequence analysis of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. Vol.58. P. 4068–4071.
- Tsoi T.V. et al. Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* KZT-1 *fcB* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-hydroxylase) in *E. coli*. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 81. P. 165–170.
- Zaitsev G.M. et al. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepeidonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 81. P. 171–176.

Поступила в редакцию 28.06.2006

Study of genes controlling dehalogenation in bacteria-destructors of 4-chlorobenzoate

E.S. Shumkova, I.V. Lobova, L.N. Ananyina, E.G. Plotnikova

Screening of bacteria-destructors of 4-chlorobenzoic acid for *fcB*-genes controlling the initial stage of 4CBA destruction (dehalogenation) has been made by polymerase chain reaction. It was revealed that strains *Arthrobacter* sp. H4, H5, *Pseudomonas fluorescens* H2, *Micrococcus* sp. G120, and *Rhodococcus ruber* P25 comprised *fcB*A and *fcB*B genes encoding 4CBA-CoA-ligase and 4CBA-CoA-dehalogenase, respectively. The analysis of restriction fragment length polymorphism and comparing of sequenced regions of *fcB*-genes of *Rhodococcus ruber* P25 with similar sequences showed 95–99% affinity to *fcB*-genes of strains-destructors of 4CBA from genus *Arthrobacter*.