

УДК 579.25

СКРИНИНГ И ИЗУЧЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ КАТАБОЛИЗМА БИФЕНИЛА И ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ У АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Е. С. Шумкова^a, Л. Н. Ананьина^a, Е. Г. Плотникова^{a,b}

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

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

Методом полимеразной цепной реакции проведен скрининг бактерий-деструкторов бифенила на наличие гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил диоксигеназы, ключевого фермента разложения бифенила и полихлорированных бифенилов (ПХБ). Анализ нуклеотидных последовательностей показал высокий уровень сходства (98%) участка гена *bphA1* длиной около 500 п.н. исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* и известных бактерий-деструкторов того же рода. Показан высокий уровень сходства гена *bphA1* грамотрицательных штаммов родов *Pseudomonas* и *Comamonas* и активных деструкторов ПХБ рода *Pseudomonas* (99–100%). Выявлены бактерии, у которых нуклеотидные последовательности, кодирующие α -субъединицу бифенил диоксигеназы, существенно отличаются от описанных в литературе.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) – синтетические соединения, широко используемые в электрохимической и электротехнической промышленности. Благодаря исключительной устойчивости к химическим, физическим воздействиям и к биодеструкции они входят в число наиболее распространенных и опасных загрязнителей окружающей среды. Известно, что, несмотря на низкую биодоступность ПХБ, основная роль их трансформации в природной среде принадлежит микроорганизмам (Dua et al., 2002; Hickey et al., 1993; Abraham et al., 2002). Многочисленные грамположительные и грамотрицательные бактерии-деструкторы ПХБ, принадлежащие к различным систематическим группам, были выделены из почв и донных осадков (Furukava et al., 1986; Bedard et al., 1986; Seto et al., 1995; Sakai et al., 2002).

Изучение организации биохимических путей деструкции этих соединений и генетических систем, кодирующих ферменты деградации ПХБ, приобретает все большую актуальность. Работы в этом направлении важны как в теоретическом плане, так и для решения практических задач, таких как разработка методов биоремедиации загрязненных почв и водных объектов (Suenaga et al., 2002).

Происхождение генов, позволяющих бактериям использовать ПХБ в качестве субстрата, до сих пор остается неясным и является источником дискуссий (Abraham et al., 2002). Знания о путях их эволюции, в свою очередь, позволят более эффективно решать прикладные проблемы, такие, как искусственное конструирование путей деструкции

тех или иных ксенобиотиков и создание ферментов с заданными свойствами.

На первом этапе разложения бифенил и ПХБ окисляются до (хлор)бифенил-дигидродиола бифенил 2,3-диоксигеназой (БДО). Бифенил 2,3-диоксигеназа относится к семейству негеминовых бифенил/толуольных оксигеназ, содержащих железо-серный кластер Риске (Gibson, Parales, 2000). Это мультикомпонентный фермент, состоящий из большой (α) и малой (β) субъединиц терминальной диоксигеназы (кодируются генами *bphA1* и *bphA2* соответственно), ферредоксина (*bphA3*) и ферредоксин-редуктазы (*bphA4*). *BphA1* и *BphA2* ассоциированы в гетерогексамер $\alpha_3\beta_3$ и катализируют внедрение двух атомов кислорода в ароматическое кольцо (хлор)бифенила. В значительной степени спектр окисляемых бактерией ПХБ определяется субстратной специфичностью ее БДО. α -Субъединица отвечает за распознавание субстрата и связывание с ним (Pieret, 2005).

Ранее из почв, загрязненных отходами производства галогенированных соединений (г. Пермь, г. Березники, Пермский край), были выделены аэробные бактерии, способные осуществлять разложение бифенила и его хлорированных производных (Плотникова и др., 2006; Плотникова и др., 2007; Рыбкина, 2003).

Целью настоящей работы является поиск и изучение генов, кодирующих большую субъединицу БДО, у бактерий-деструкторов бифенила и ПХБ, выделенных из техногенных почв.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы. В работе использованы бактериальные штаммы, выделенные из образцов почв, отобранных на территории предприятия ОАО «Галоген» (г. Пермь) и из почв района солеразработок г. Березники (Пермский край): *Cellulomonas* (P27, P28), *Rhodococcus* (P1, P2, P2(51), P12, P13, P20, P25, P9, G10), *Microbacterium* (P26), *Pseudomonas* (B7, B106a, G12, G13, P22, P23a, P24a, S9, S13), *Comamonas* (S210, S211, S212), *Alcaligenes* (P39), *Flavimonas* (S214) (Плотникова и др., 2006; Плотникова и др., 2007; Рыбкина, 2003).

Среды и условия культивирования. Культивирование бактерий проводили в колбах объемом 250 мл в 100 мл минеральной среды K1 (Zaitsev et al., 1991) при 28°C с аэрацией на шейкере (100 об/мин). В качестве ростового субстрата использовали бифенил в концентрации 1 г/л.

Молекулярно-генетические методы. Выделение тотальной ДНК исследуемых штаммов проводили по стандартной методике (Ausbel et al., 1995).

ПЦР осуществляли на приборе MyCycler (BioRad, США) с вырожденными праймерами, подобранными к консервативным участкам гена *bphA1* при условиях, предложенных R. Witzig (2006).

Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) амплифицированных участков генов *bphA1* осуществляли с использованием эндонуклеаз рестрикции *HhaI*, *HaeIII* (Sigma, Германия). Реакцию проводили при 37°C в течение 2 часов в объеме реакционной смеси 20 мкл. Построение карт сайтов рестрикции для участков исследуемых генов *bphA1* осуществляли с помощью программы Vector NTI 9.1.0 на основе гомологичных нуклеотидных последовательностей известных деструкторов ПХБ *Burkholderia xenovorans* LB400 (GenBank 86348) и *Rhodococcus globerulus* P6 (GenBank X80041).

Секвенирование продуктов амплификации проводили с помощью набора реактивов DYEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBASE 1000 (JSC GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), TREECON (van de Peer, DeWachter, 1994), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты исследования и их обсуждение

Скрининг штаммов на наличие гена *bphA1*

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был проведен скрининг 26 штаммов на наличие в геноме нуклеотидных последовательностей, гомо-

логичных участку гена *bphA1*. С матриц ДНК четырнадцати штаммов (P1, P9, P12, P13, P20, P24a, P27, P28, S9, S13, S210, S211, S212, G10) прошла специфичная амплификация. Размер ПЦР-продукта составлял около 500 п.н. Протяженность гена *bphA1* у *Rhodococcus globerulus* P6 и *Burkholderia xenovorans* LB400 составляет 1375 и 1378 п.н. соответственно. Амплифицируемая область гена *bphA1*, располагающаяся в районе 668 – 1152 п.н., охватывает область около 500 п.н. Таким образом, длина амплифицированных фрагментов *bphA1*-гена с матриц ДНК исследуемых штаммов совпала с ожидаемой.

Полученные данные позволили нам предположить наличие *bphA1*-гена, кодирующего большую субъединицу БДО, у скринируемых бактерий в тех случаях, когда прошла специфичная амплификация.

ПДРФ-анализ амплифицированных участков гена *bphA1*

Для выявления сходства и различий между амплифицированными участками гена *bphA1* был проведен анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ-анализ) полученных ампликонов.

По результатам гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции *HhaI* и *HaeIII* исследуемые штаммы можно подразделить на три группы. К первой группе относятся штаммы рода *Rhodococcus* (P1, P12, P13, P20), набор рестриционных фрагментов амплифицированного участка гена *bphA1* которых был сходен с таковым известных бактерий-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*. При гидролизе ДНК грамтрицательных штаммов родов *Comamonas* (S210, S211, S212) и *Pseudomonas* (S9, S13) эндонуклеазой рестрикции *HaeIII* были получены фрагменты других размеров. Расположение сайтов рестрикции на участке гена *bphA1* было сходно с таковым известных бактерий рода *Pseudomonas* и *Burkholderia*. Эти штаммы составляют вторую группу. В третью группу по результатам гидролиза амплифицированной ДНК эндонуклеазами *HhaI* и *HaeIII* можно включить штаммы *Pseudomonas* sp. P24a, *Rhodococcus* sp. P9 и *Cellulomonas* spp. P27, P28.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена *bphA1*

Для определения нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов *bphA1* представителей каждой из трех групп, выявленных в результате ПДРФ-анализа, были выбраны штаммы P12, P13, G10, S13, S212, S9, S210, P27, P24a, P9.

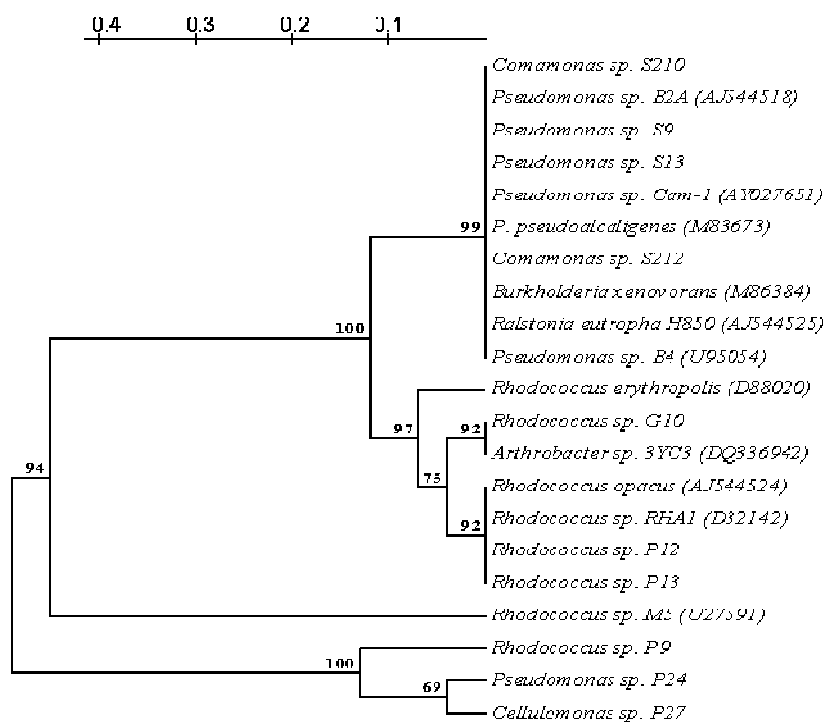
С помощью программ BLAST и CLUSTALW нуклеотидные последовательности фрагментов гена *bphA1* сравнивали с аналогичными последовательностями, имеющимися в международных базах данных GenBank/EMBL/DBJ. Идентичность нуклеотидных последовательностей *bphA1* штаммов *Rhodococcus*

spp. P12 и P13 с *Rhodococcus opacus* BIE-20 (GenBank AJ544524) составляет 98%. Уровень гомологии гена *bphA1* граммотрицательных штаммов *Pseudomonas* spp. S9 и S13, *Comamonas* spp. S210, S212 с *Pseudomonas* sp. B2A (GenBank AJ544518) составляет 99–100%, с *Pseudomonas* sp. B4 (GenBank PSU95054) – 99%; с *Ralstonia eutropha* H850 (GenBank AJ544525) и с *Burkholderia xenovorans* LB400 (GenBank M86348) – 97%. Участок гена *bphA1* штамма *Rhodococcus* sp. G10 на 98% сходен с гомологичной нуклеотидной последовательностью штамма *Arthrobacter* sp. 3YC3 (GenBank DQ336942).

Построена дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей, кодирующих α -субъединицы бифенил диоксигеназ, известных штаммов-деструкторов ПХБ и исследуемых бактерий (рисунок). Кластерный анализ показал, что граммотрицательные и

грамположительные штаммы образуют две разные группы. Штаммы *Rhodococcus* spp. P12 и P13 группируются с представителями рода *Rhodococcus*, а штаммы *Pseudomonas* spp. S9, S13 и *Comamonas* spp. S210, S212 попадают в один кластер с граммотрицательными деструкторами ПХБ, принадлежащими к родам *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Ralstonia* (рисунок).

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *bphA1* штаммов *Rhodococcus* sp. P9, *Pseudomonas* sp. P24 и *Cellulomonas* sp. P27 значительно отличаются от имеющихся в базах данных. Перекрытие их с гомологичными последовательностями известных деструкторов ПХБ составляет всего 20–30% от длины полученных ампликонов. Штаммы P9, P24 и P27 образуют самостоятельную группу на дендрограмме.



Древо сходства нуклеотидных последовательностей, гомологичных исследуемым участкам генов *bphA1*, построенное методом UPGMA. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank.

Заключение

Двадцать шесть штаммов бактерий-деструкторов бифенила были исследованы на наличие гена большой субъединицы БДО, фермента, осуществляющего первый этап разложения бифенила и ПХБ – внедрение двух атомов кислорода в ароматическое кольцо. Скрининг исследуемых бактериальных культур методом полимеразной цепной реакции позволил предположить функционирование у ряда исследованных штаммов бифенил диоксигеназ, сходных с описанными в научной литературе (Erickson., Mondello, 1992; Kah., Hofer, 2003; Masai et al., 1995; Master., Mohn, 2001; Taira et al.,

1992). В то же время отрицательный результат ПЦР-скрининга у других двенадцати штаммов-деструкторов бифенила может свидетельствовать о существенных отличиях нуклеотидных последовательностей их гена *bphA1* от аналогичных последовательностей известных бактерий-деструкторов.

На основании ПДРФ-анализа амплифицированных фрагментов гена *bphA1* можно говорить о значительном сходстве амплифицированных участков *bphA1* у исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* и их отличии от граммотрицательных бактерий.

Анализ нуклеотидных последовательностей участка гена *bphA1* показал высокий уровень сходства (98%) исследуемых штаммов рода *Rhodococcus*

с известными деструкторами ПХБ того же рода. Выявлен высокий уровень сходства грамтрицательных штаммов родов *Pseudomonas* и *Comamonas* с представителями рода *Pseudomonas* (99–100%). В то же время в результате ПДРФ-анализа и анализа нуклеотидных последовательностей у нескольких исследуемых штаммов (P9, P24a, P27) были установлены существенные различия в структуре ключевого гена катаболизма бифенила и ПХБ (*bphA1*), что позволяет предположить наличие у данных штаммов бифенил диоксигеназ, отличающихся от описанных в литературе.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал_офи 07-04-97625.

Библиографический список

- Плотникова, Е.Г. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина, Л.Н. Ананьина, О.В. Ястребова, В.А. Демаков // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
- Плотникова, Е.Г. Бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов, перспективные для биоремедиации загрязненных почв / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы конгресса. Ч. 2. М., 2005. С. 135.
- Рыбкина, Д.О. Исследование аэробных бактерий, разлагающих полихлорированные бифенилы и хлорбензойные кислоты: дис. ... канд. биол. наук / Д.О. Рыбкина. Пермь, 2003. 181 с.
- Abraham, W.R. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments / W.R. Abraham, B. Nogales, P.N. Golyshin, D.H. Pieper, K.N. Timmis // Curr. Opin. Microbiol. 2002. Vol. 5. P. 246–253.
- Bedard, D.L. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls / D.L. Bedard, R. Unterman, N. Ropp, M.I. Brennan, M.L. Haber, C. Jonson // Appl. Environ. Microbiol. 1986. Vol. 51. P. 761–768.
- Dua, M. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations / M. Dua, A. Singh, N. Ssethuthan, A.K. Johri // Appl. Microbiol. Biothechnol. 2002. Vol. 59. P. 143–152.
- Erickson, B.D. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400 / B.D. Erickson, F.J. Mondello // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174 (9). P. 2903–2912.
- Furukawa, K. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. Strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 / K. Furukawa, N. Tomizuka, A. Kamibayashi // J. Bacteriol. 1979. Vol. 175. P. 4561–4564.
- Gibson, D.T. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology / D.T. Gibson, R.E. Parales // Curr. Opin. Biotechnol. 2000. Vol. 11. P. 236–243.
- Hickey, W.J. Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated with chlorobenzoate-degrading bacteria / W.J. Hickey, D.B. Searles, D.D. Focht // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. P. 1194–1200.
- Kah, S. A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase activities / S. Kah, B. Hofer // Microbiology. 2003. Vol. 149 (PT 6). P. 1475–1481.
- Masai, E. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E. Masai, A. Yamada, J.M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61 (6). P. 2079–2085.
- Master, E.R. Induction of *bphA*, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and mesophilic *Burkholderia* strain LB400 / E.R. Master, W.W. Mohn // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67 (6). P. 2669–2676.
- Pieper, D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 67. P. 170–191.
- Sakai, M. Diversity of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / M. Sakai, E. Masai, H. Asami, K. Sugiyama, K. Kimbara, M. Fukuda // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2002. Vol. 93. P. 421–427.
- Seto, M. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / M. Seto, K. Kimbara, M. Shimura, T. Hatta, M. Fukuda // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. P. 3353–3358.
- Ausubel. Short protocols in molecular biology / Ausubel et al.. Third edition. 1995. 450 p.
- Suenaga, H. Alteration of regioselectivity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering / H. Suenaga, T. Watanabe, M. Sato, Ngadiman, K. Furukawa // J. Bacteriol. 2002. Vol. 184. P. 3682–3688.
- Taira, K. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 / K. Taira, J. Hirose, S. Hayashida, K. Furukawa // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267 (7). P. 4844–4853.
- Thompson, J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- van de Peer Y. TREECON for Windows a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environ-

- ment / Y. van de Peer, R. DeWachter // Comput. Appl. Biosci. 1994. Vol. 10. P. 569–570.
- Witzig, R. Benzene-Polluted Soils : Links between Benzene Biodegradation and Genes Similar to Those Encoding Isopropylbenzene Dioxygenases / R. Witzig, J. Howard, H-J. Heht, D.H. Pieper // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72. No. 5. P. 3504–3514.
- Zaitsev, G.M. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains / G.M. Zaitsev, T.V. Tsoi, V.G. Grischenkov, E.G. Plotnikova, A.M. Boronin // FEMS Microbiol. Lett. 1991. Vol. 81. P. 171–176.

Поступила в редакцию 14.06.2008

Screening and study of key genes accomplishing biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in aerobic bacteria

E.S. Shumkova, L.N. Ananyina, E.G. Plotnikova

Screening of biphenyl-utilising bacteria for *bphA1* gene encoding large subunit of biphenyl dioxygenase (BDO), controlling the initial step of biphenyl and PCB destruction (dioxygenation) has been made by polymerase chain reaction (PCR). The analysis of DNA fragments (their length was about 500 b.p.) has shown that *Rhodococcus bphA1* genes were closely related (98% identity) to those of well known strains belonging to the same genus. High identity of DNA segments of Gram-negative strains (*Pseudomonas* and *Comamonas*) to well known *Pseudomonas bphA1* genes (99–100% identity) was revealed. It was shown that some bacteria possessed DNA sequences encoding α -subunit of BDO that significantly differed from similar nucleic sequences of well known bacteria.