

<https://doi.org/10.17816/ecogen17313-22>

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНА БЕНЗОАТ ДИОКСИГЕНАЗЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ АССОЦИАЦИЯХ, СФОРМИРОВАВШИХСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ХЛОРООРГАНИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

© Э.А. Назарова¹, Т.Д. Кирьянова², Д.О. Егорова^{1,2}¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь;²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь

Для цитирования: Назарова Э.А., Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О. Разнообразие гена бензоат диоксигеназы в бактериальных ассоциациях, сформировавшихся под давлением хлороорганического загрязнения // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 13–22. <https://doi.org/10.17816/ecogen17313-22>.

Поступила: 21.11.2018

Одобрена: 20.05.2019

Принята: 23.09.2019

Из образцов грунта, отобранных на территории, длительное время загрязненной хлороорганическими соединениями, в результате селекции получены 12 ассоциаций аэробных бактерий. В качестве фактора отбора при накопительном культивировании использовали 4-хлорбензойную кислоту и хлорбензол. В результате скрининга установлено, что в ДНК шести бактериальных ассоциаций, селектированных на хлорбензоле, и в ДНК трех бактериальных ассоциаций, селектированных на 4-хлорбензоате, присутствует ген *benA* (α -субъединица бензоат 1,2-диоксигеназы). Из *benA*-положительных ассоциаций выделены чистые культуры аэробных бактериальных штаммов, использующих бензойную кислоту в качестве источника углерода. Установлено, что амплифицированные фрагменты с ДНК штаммов ассоциаций А1, А4, А5, В1, В2, В3, В4 и В6 формируют единый филогенетический кластер с геном α -субъединицы бензоат диоксигеназы штамма *Pseudomonas putida* KT2440 (уровень сходства 96–98 %), тогда как амплифицированный фрагмент с ДНК штамма В5-170 ассоциация В5 формирует кластер с геном α -субъединицы бензоат диоксигеназы штамма *Pseudomonas* sp. VLB120 (уровень сходства 93 %).

Ключевые слова: бензоат диоксигеназа; ген; штамм; бактериальные ассоциации; хлороароматические соединения.

DIVERSITY OF THE GENE OF BENZOATE DIOXYGENASE IN BACTERIAL ASSOCIATIONS ISOLATED FROM LONG TERM ORGANOCHLORINE-CONTAMINATED SOILS

© E.A. Nazarova¹, T.D. Kiryanova², D.O. Egorova^{1,2}¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia;²Perm State University, Perm, Russia

Cite this article as: Nazarova EA, Kiryanova TD, Egorova DO.

Diversity of the gene of benzoate dioxygenase in bacterial associations isolated from long term organochlorine-contaminated soils.

Ecological genetics. 2019;17(3):13-22. <https://doi.org/10.17816/ecogen17313-22>.

Received: 21.11.2018

Revised: 20.05.2019

Accepted: 23.09.2019

Background. Communities of bacteria with specific enzymes are formed in the soil with long-term organochlorine contamination. **The aim** of this study was to analyze the diversity of the *benA* gene encoding the α -subunit of the benzoate 1,2-dioxygenase in aerobic bacterial associations isolated from the soils of the Chapayevsk-city (Samara region, Russia). **Materials and methods.** The soil samples were taken on the territory, contaminated with organochlorine compounds for a long time. As a selection factor in the enrichment cultures were used 4-chlorobenzoic acid and chlorobenzene, in the pure cultures – benzoic acid. The isolation of total DNA from bacterial associations was performed using a commercial FastDNA Spin Kit for Soil kit (USA). Amplification was performed on a MyCycler instrument (USA). Determination of the nucleotide sequence was performed on an automatic sequencer Genetic Analyzer 3500XL (USA). The search and analysis for *benA* gene homologs was carried out using international GenBank databases and BLAST system (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). **Results.** As a result of selection, 12 associations of aerobic bacteria were obtained. Fragments of the *benA* gene (α -subunit of benzoate dioxygenase) were obtained with the total DNA of six bacterial associations selected on chlorobenzene and with the total DNA of three bacterial associations selected on 4-chlorobenzoate. Pure cultures of aerobic bacterial strains using benzoic acid as a carbon source were isolated from *benA*-positive associations. It was established that the amplified fragments with the DNA of the A1, A4, A5, B1, B2, B3, B4 and B6 association strains form a single phylogenetic cluster with the α -subunit gene of the benzoate dioxygenase of the *Pseudomonas putida* strain KT2440 (level of similarity is 96–98%). The amplified fragment with the DNA of strain B5-170 (association B5) forms a cluster with the gene of the α -subunit of the benzoate dioxygenase of the strain *Pseudomonas* sp. VLB120 (93% similarity).

Keywords: benzoate dioxygenase; gene; strain; bacterial associations; chloroaromatic compounds.

ВВЕДЕНИЕ

В результате масштабного производства и применения в промышленности искусственно синтезированных замещенных и незамещенных ароматических соединений в XX в. значительная часть данных поллютантов попала в окружающую среду. Основными накопительными депо стали почвы и донные отложения в промышленных районах [1]. К таким территориям относится и г. Чапаевск (Самарская обл., Россия) с расположенным в нем ОАО «Средне-Волжский завод химикатов» (ОАО «СВЗХ»). В 1967–1987 гг. на СВЗХ производили хлорорганические соединения, включенные в настоящий момент в список Стойких органических загрязнителей (Стокгольмская конвенция, 2001) [2–4]. Данные соединения обладают высокой химической и физической стабильностью, что привело к их длительной персистенции в почвах [4].

Присутствие в окружающей среде стойких органических загрязнителей активирует адаптационные процессы в биотопах и, в частности, инициирует изменения в составе микробиоценозов загрязненных почв. Преимущество в развитии получают микроорганизмы, способные разлагать поллютанты и использовать их в качестве источника углерода и энергии. Такие свойства характерны для аэробных бактерий, обладающих ферментами начальной атаки ароматического кольца с широкой субстратной специфичностью [5–7]. Бактериальные диоксигеназы осуществляют первый этап трансформации стойких органических загрязнителей (СОЗ) и других ароматических соединений, катализируя внедрение гидроксигрупп в химически стабильное ароматическое кольцо молекулы [8]. К данной группе ферментов принадлежит бензоат 1,2-диоксигеназа [5, 8].

Бензоат диоксигеназа (БДО; КФ 1.14.12.10) изучена у широкого спектра представителей грамположительных и грамотрицательных аэробных бактерий, разлагающих широкий спектр ароматических соединений [6, 9–11]. Бензоат 1,2-диоксигеназа — двухкомпонентная система, один из компонентов которой представлен оксидазой, состоящей из α - и β -субъединиц [5, 6]. По мнению ряда авторов, за субстратную специфичность БДО отвечает α -субъединица [8]. Анализ генов, детерминирующих α -субъединицу БДО, показал, что они формируют отдельный кластер (подсемейство) на филогенетическом дереве бактериальных диоксигеназ, окисляющих ароматическое кольцо [8].

Изучение разнообразия гена α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы в бактериальных ассоциациях, сформировавшихся в результате длительного воздействия хлорорганических соединений в естественных и искусственных условиях, может дать информацию об эволюционных процессах, протекающих в микробных сообществах под давлением негативных факторов окружающей среды (химического загрязнения).

Целью данной работы было изучение разнообразия гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, в аэробных бактериальных ассоциациях, изолированных из почв г. Чапаевска (Самарская обл., Россия). Данные ассоциации бактерий были сформированы в результате адаптации к длительному давлению высоких концентраций соединений группы СОЗ в естественных условиях с последующим селективным культивированием в присутствии хлорароматических соединений в искусственных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика и отбор образцов грунта. Образцы грунта были отобраны на территории промплощадки ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, Россия). Проведенные ранее исследования показали, что грунт загрязнен хлорорганическими соединениями, в том числе входящими в группу СОЗ. Концентрация загрязнителя превышает установленные нормы предельно допустимых концентраций в 3,5–17,8 раза [2, 3].

Накопительное культивирование. Бактериальные ассоциации были получены путем накопительного культивирования 1 г грунта каждого образца в 100 мл минеральной среды К1 следующего состава (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 3,2, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,4, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,15, $Ca(NO_3)_2$ — 0,01 с внесением в качестве селективного фактора 4-хлорбензойной кислоты (4-ХБК) (0,5 г/л) или хлорбензола (0,5 г/л) [12]. Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в течение 30 дней на термостатируемом шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (BioSan, Латвия) со скоростью 120 об/мин и при +28 °С. В результате были получены 12 бактериальных ассоциаций (табл. 1).

Выделение чистых культур бактерий. Бактериальные ассоциации, полученные в результате культивирования на хлорбензоле и 4-ХБК, высевали на агаризованную среду К1 с внесением бензоата натрия

Таблица 1

Бактериальные ассоциации, полученные при накопительном культивировании

Субстрат культивирования	Номер почвенного образца					
	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6
4-Хлорбензойная кислота	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Хлорбензол	B1	B2	B3	B4	B5	B6

в качестве источника углерода в концентрации 0,3 г/л в пересчете на кислоту. Культивирование осуществляли в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия) при +28 °С до появления колоний. Чистоту культур проверяли при выращивании на богатой среде LB следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт — 0,5, триптон — 1,0, хлорид натрия — 1,0, агар-агар — 1,5.

Тотальная ДНК. Тотальную ДНК из бактериальных ассоциаций выделяли с использованием коммерческого набора реактивов FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом [13]. Концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием реактивов производителя.

Идентификация изолированных штаммов. Морфологические и физиологические признаки изолированных бактериальных штаммов изучали по общепринятым методикам [14]. Бактерии идентифицировали при амплификации гена 16S рРНК с использованием стандартных бактериальных праймеров 27F 5'-AGAGTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3' и 1492R 5'-ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3' [15] с последующим определением и анализом нуклеотидных последовательностей амплифицированных генов 16S рРНК (см. ниже). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Амплификация гена бензоат диоксигеназы. Ген *benA* амплифицировали с помощью бактериальных праймеров прямого *benA-F* [5'-GCCACGAGAGCCAGATCCC-3'] и обратного *benA-R* [5'-GGTGGCGGCGTAGTCCAGTG-3'] [16]. Праймеры подобраны к консервативному участку гена *benA* штамма *Acinetobacter baylyi* ADP1, амплифицируемая область — с нуклеотида 175 до нуклеотида 712 (размер фрагмента — 521 пн) [16]. ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей ×1 буфер для *Taq*-полимеразы с $MgCl_2$ («Синтол», Россия), 0,25 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия) и 2 мкл ДНК-матрицы. В качестве ДНК-матрицы использовали тотальную ДНК чистых культур и бактериальных ассоциаций. Амплификацию осуществляли на приборе MyCycler (Bio-Rad Laboratories, США) при следующих условиях: начальный денатурирующий шаг при 95 °С в течение 5 мин, далее 30 циклов: 40 с при 94 °С, 50 с при 60 °С с понижением при каждом шаге на 0,4 °С, 1 мин при 72 °С, завершающий шаг — 7 мин при 72 °С.

Рестрикционный анализ. ПДРФ-анализ ампликонов, полученных с ДНК штаммов, изолированных из ассоциаций А5, В3 и В5, выполняли согласно рекомендациям производителя с применением эндонуклеаз рестрикции *HhaI* и *HaeIII* (Fermentas, Литва).

Визуализация ДНК. Электрофорез был выполнен в горизонтальном агарозном геле (концентрация агарозы 0,8 %) в ×1 Трис-боратном буфере (Thermo scientific, Литва) при напряжении 10 В/см. Визуали-

зацию ДНК проводили UV-транслюминацией после окрашивания в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и документировали в системе Gel Doc™ XR (BioRad, США). Для определения размера амплифицированного фрагмента использовали маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, США). Ожидаемый размер фрагмента — 520 пн.

Секвенирование амплифицированных фрагментов. Нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов ДНК определяли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя в молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена бензоат диоксигеназы. Поиск гомологов гена *benA* проводили по международным базам данных GenBank и анализировали с помощью системы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программы ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk>). Для построения дерева сходства применяли алгоритм UPGMA, реализованный в пакете программ CLC Sequence Viewer 6 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer>). Филогенетический и кластерный анализ и визуализацию дерева выполняли в программе MEGA7. Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали на основе 1000 альтернативных деревьев. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *benA*, полученных в настоящем исследовании, зарегистрированы в базе данных GenBank (см. табл. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В итоге длительной селекции в естественных условиях в загрязненных грунтах, находящихся на территории ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, Россия), сформировались микробные сообщества, способные разлагать сложные хлорорганические соединения [2].

В настоящем исследовании в качестве селективного фактора были выбраны хлорбензол и хлорбензойная кислота, как потенциальные метаболиты хлорорганических веществ, длительное время присутствовавших в грунте. В результате селекции в искусственных условиях под влиянием высокой концентрации данных соединений были получены ассоциации аэробных бактерий, обозначенные как А1–А6 и В1–В6 (см. табл. 1).

Проведен скрининг тотальной ДНК 12 бактериальных ассоциаций на наличие нуклеотидных последовательностей, кодирующих α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы. С тотальной ДНК девяти ассоциаций получен ПЦР-продукт ожидаемого размера —

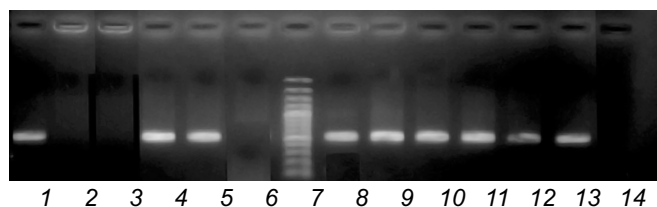


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат диоксигеназы, с ДНК бактериальных ассоциаций. 1 — A1, 2 — A2, 3 — A3, 4 — A4, 5 — A5, 6 — A6, 7 — маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва), 8 — B1, 9 — B2, 10 — B3, 11 — B4, 12 — B5, 13 — B6, 14 — отрицательный контроль

500 п. н. (рис. 1). Однако не наблюдалось специфичной амплификации с ДНК ассоциаций A2, A3 и A6. Вероятно, в данных ассоциациях при культивировании на 4-ХБК произошла элиминация из микробного сообщества штаммов, несущих ген *benA*. Данное явление может быть обусловлено тем, что преимущество получили штаммы, осуществляющие гидролитическое дегалогенирование 4-ХБК до расщепления ароматического кольца молекулы [6, 12]. Для ряда штаммов родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter* и *Pseudomonas* описаны гены и ферментативные системы, обуславливающие трансформацию 4-ХБК путем

гидроксилирования молекулы с последовательным образованием в качестве метаболитов 4-гидроксибензойной и 3,4-дигидроксибензойной кислот [6, 12, 17, 18].

В результате селекции из накопительных культур, давших положительную амплификацию гена *benA*, были получены чистые культуры бактериальных штаммов, способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии бензойную кислоту (натриевую соль бензойной кислоты). На основании морфобиологических признаков изолированных штаммов установлено, что в ассоциациях A1, A4, B1, B2, B4 и B6 присутствует по одному штамму-деструктору бензоата: штаммы A1-69, A4-72, B1-169, B2-174, B4-172, B6-173 соответственно. В составе ассоциации A5 описано три штамма-деструктора бензоата (A5-67, A5-68, A5-70), в составе ассоциации B3 — пять штаммов, использующих бензоат натрия в качестве ростового субстрата (B3-162, B3-163, B3-164, B3-165 и B3-166), а в составе ассоциации B5 — четыре штамма-деструктора бензоата (B5-167, B5-168, B5-170 и B5-171).

В табл. 2 приведены результаты исследований, которые показывают наиболее вероятное таксономическое положение изолированных бактерий.

Таким образом, на основании анализа гена 16S рРНК изолированные из *benA*-положительных ассоциаций штаммы-деструкторы были отнесены к родам *Achromobacter*, *Ochrobactrum* и *Pseudomonas*.

Таблица 2

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изолированных штаммов-деструкторов бензоата с гомологичными последовательностями типовых штаммов

Ассоциация	Штамм	Типовой штамм	Сходство, %
A1	A1-69	<i>Pseudomonas japonica</i> NRBC103040 ^T	99,9
A4	A4-72	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC14159 ^T	100
A5	A5-67	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49188 ^T	99,8
	A5-68	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC14159 ^T	99,9
	A5-70	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC14159 ^T	100
B1	B1-169	<i>Pseudomonas japonica</i> NRBC103040 ^T	99,9
B2	B2-174	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49188 ^T	99,5
B3	B3-162	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T	100
	B3-163	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T	100
	B3-164	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T	99,7
	B3-165	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T	99,8
	B3-166	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC17751 ^T	100
B4	B4-172	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> BCRC17751 ^T	99,9
B5	B5-167	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T	99,6
	B5-168	<i>Pseudomonas japonica</i> NRBC103040 ^T	100
	B5-170	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC14159 ^T	100
	B5-172	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T	99,9
B6	B6-173	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49188 ^T	99,7

На ДНК-матрице изолированных штаммов с помощью праймеров *benA-F* и *benA-R* были получены фрагменты гена, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, ожидаемого размера (~500 пн). Проведен ПДРФ-анализ амплифицированного фрагмента гена *benA* длиной ~500 пн штаммов ассоциаций А5, В3 и В5 с использованием эндонуклеаз рестрикции *HhaI* и *HaeIII*. Установлено, что анализируемые нуклеотидные последовательности формируют три группы, соответствующие ассоциациям, из которых были получены штаммы (данные не представлены). Таким образом, внутри каждой группы присутствуют сходные гены, что позволяет для дальнейшего анализа использовать по одному штамму-деструктору бензоата из данных ассоциаций.

Определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов с тотальной ДНК бак-

териальных ассоциаций, а также с ДНК штаммов-деструкторов бензоата, изолированных из исследуемых ассоциаций (табл. 3).

Выявленные нуклеотидные последовательности показали наибольший уровень сходства с геном α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов рода *Pseudomonas*. Следует отметить, что уровень сходства фрагментов, амплифицированных с тотальной ДНК ассоциаций, совпадал с уровнем сходства фрагментов гена *benA*, амплифицированных с ДНК чистых культур. В дальнейшем анализе мы использовали название бактериальных ассоциаций для обозначения принадлежности исследуемых нуклеотидных последовательностей при визуализации филогенетического дерева.

Проведен филогенетический анализ исследуемых нуклеотидных последовательностей на основании сравнения с гомологичными последовательностями из базы

Таблица 3

Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена *benA*

Ассоциация, размер фрагмента, пн (номер в GenBank)	Штамм, размер фрагмента, пн (номер в GenBank)	Наиболее близкий гомологичный ген (номер в GenBank)	Уровень сходства, %	Перекрытие, %
A1 419 (МК403888)	A1-69 420 (МК403897)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> B6-2 (CP015202.1)	98	100
A4 415 (МК403889)	A4-72 416 (МК403898)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	98	100
A5 420 (МК403890)	A5-67 423 (МК403899)	<i>bedA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> JY-Q (CP011525.1)	99	100
		<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	98	100
B1 408 (МК403891)	B1-169 408 (МК403900)	<i>bedA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> JY-Q (CP011525.1)	97	100
		<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	96	100
B2 398 (МК403892)	B2-174 395 (МК403901)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	98	100
B3 399 (МК403893)	B3-164 399 (МК403902)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	98	100
B4 401 (МК403894)	B4-172 403 (МК403903)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> B6-2 (CP015202.1)	99	100
B5 400 (МК403895)	B5-170 401 (МК403904)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas</i> sp. VLB120 (CP003961.1)	93	100
		<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> S16 (CP002870.1)	95	99
B6 411 (МК403896)	B6-173 418 (МК403887)	<i>benA</i> (α -субъединица) <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (LT799039.1)	97	100

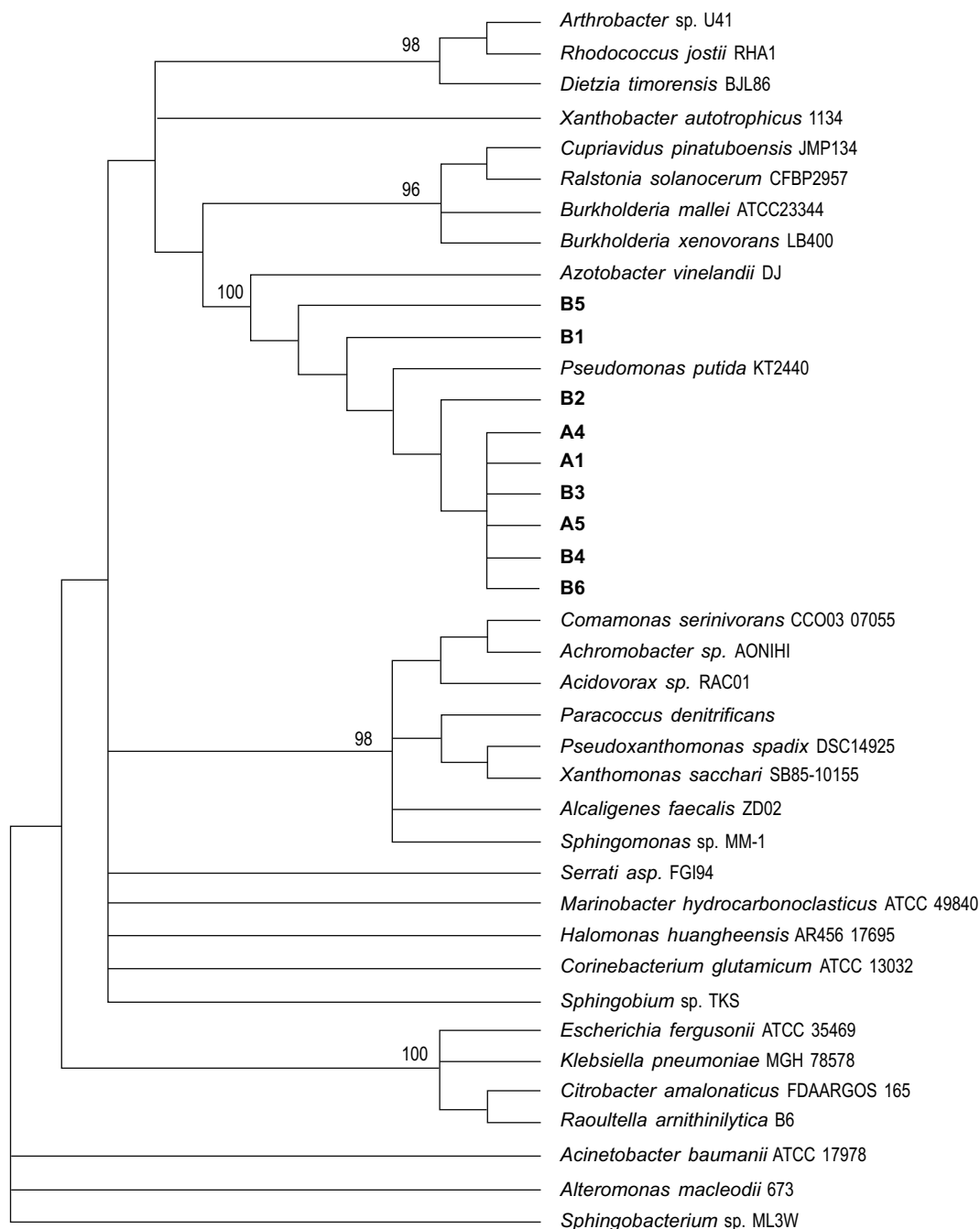


Рис. 2. Дерево сходства выявленных генов с известными генами α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы, построенное методом UPGMA. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Bootstrap-анализ проведен на 1000 повторностях. Значения рядом с «ветвями» показывают вероятность расположения последовательностей в данных группах. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, исследуемые в настоящей работе. Для анализируемых последовательностей приведены обозначения штаммов, а также их родовые и видовые названия

данных GenBank (рис. 2). Амплифицированные участки функциональных генов были сходны с генами подсемейства БДО бактерий различных таксономических групп, осуществляющих деструкцию ароматических соединений (см. рис. 2). В ряде работ продемонстрирована возможность горизонтального распространения генов, обуславливающих разложение хлорароматических

веществ, среди одноклеточных организмов [18–21]. Данное явление может объяснить присутствие генов с высоким уровнем идентичности в геноме штаммов и бактериальных ассоциаций, территориально удаленных друг от друга.

Напротив, анализ сходства генов деструкции у бактерий различных таксономических групп показывает,

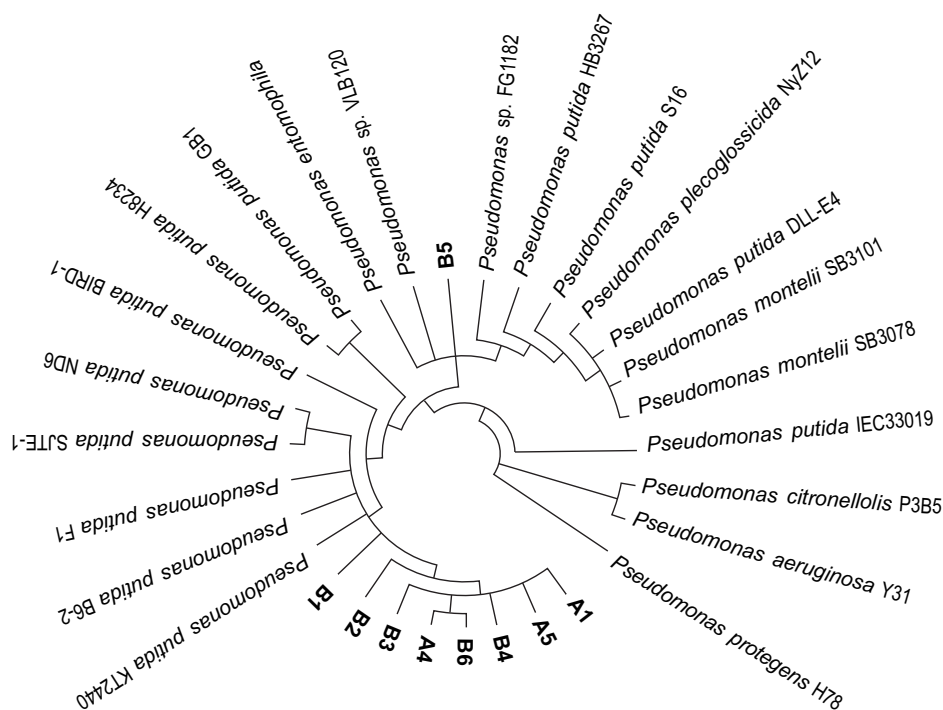


Рис. 3. Дерево сходства нуклеотидных последовательностей, гомологичным исследуемым участкам генов α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов рода *Pseudomonas*, построенное методом UPGMA. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 пар нуклеотидов. Bootstrap-анализ проведен на 1000 повторностях. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, исследуемые в настоящей работе. Для анализируемых последовательностей показаны обозначения штаммов, а также их родовые и видовые названия

что гены могут иметь существенные различия [5]. В настоящем исследовании установлено, что нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов гена *benA* из тотальной ДНК ассоциаций A1, A4 и A5 и из ДНК соответствующих штаммов обладали более высоким уровнем сходства (78–99 % при 96–100 % перекрытии) с соответствующим геном грамотрицательных бактерий и меньшим уровнем сходства с генами α -субъединицы БДО грамположительных бактерий (79–87 % при 83–97 % перекрытии) среди практически полутора тысяч представленных в базе данных последовательностей (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Аналогичная закономерность выявлена при анализе сходства нуклеотидной последовательности фрагментов генов, амплифицированных на ДНК ассоциаций и бактериальных штаммов, полученных при культивировании на хлорбензоле (см. табл. 2, рис. 1, 2). Уровень сходства с аналогичными диоксигеназами грамположительных бактерий классов *Actinobacteria* и *Bacilli* составил 83–88 % при 73–100 % перекрытии, а с геном α -субъединицы БДО грамотрицательных бактерий классов β - и γ -*Proteobacteria* варьировал в пределах 80–99 % при 85–100 % перекрытии.

При этом кластерный анализ показал, что амплифицированные с ДНК штаммов и ассоциаций, выделенных

из почв Чапаевска, фрагменты генов *benA* со 100 % вероятностью формируют единый кластер с генами БДО штаммов рода *Pseudomonas* (см. рис. 2).

Таким образом, полученные результаты не исключают горизонтального распространения гена БДО среди бактерий различных таксономических групп. Однако более правдоподобной в данном случае является гипотеза о конвергентном происхождении генов *benA*, обусловленном процессами адаптации к одинаковому воздействию хлорорганических соединений, присутствовавших как в окружающей среде, так и в среде культивирования [19–22].

Поскольку кластерный анализ амплифицированных последовательностей и известных нуклеотидных последовательностей гена *benA* показал, что гены, представленные в исследованных бактериальных ассоциациях, наиболее вероятно формируют один кластер с генами БДО штаммов рода *Pseudomonas* (см. рис. 2), был проведен анализ внутри данного кластера (рис. 3).

Установлено, что наиболее близкими по нуклеотидной последовательности для гена *benA*, амплифицированного с ДНК ассоциаций A1, A4, A5, B1, B2, B3, B4 и B6 и соответствующих индивидуальных штаммов, являются гены, кодирующие α -субъединицу БДО штаммов *Pseudomonas putida* KT2440 (GenBank LT799039.1) и *Pseudomonas putida* B6-2 (CP015202.1) — 96–99 %

сходства при 100 % перекрытии. При этом проанализированные гены формируют отдельный кластер на филогенетическом дереве (см. рис. 3), прилегающий к кластеру гена *benA* штаммов *P. putida* KT2440, *P. putida* B6-2 (GenBank CP015202.1), *P. putida* F1 (GenBank CP000712.1), *P. putida* SJTE-1 (GenBank CP015876.1) и *P. putida* ND6 (GenBank CP003588.1).

Представленные результаты позволяют предположить, что в данных ассоциациях получили распространение гены, кодирующие α -субъединицу БДО, наиболее широко описанные у штаммов, принадлежащих виду *Pseudomonas putida* [9]. Однако данное предположение может быть сделано с некоторым допущением, так как известно, что гены биодegradации в процессе горизонтальной эволюции могут передаваться на плазмиде между представителями разных таксономических групп [19–21, 23].

Стоит отметить, что последовательность гена *benA*, амплифицированного с ДНК штамма В5-170 ассоциации В5, располагается в одном кластере с генами БДО штаммов *Pseudomonas* sp. VLB120 и *P. entomophila* L48 (см. рис. 3), уровень сходства составил 93 % при 100 % перекрытии, но в разных кластерах с геном *benA* штамма *Pseudomonas putida* S16, несмотря на то что уровень сходства с данным геном при гомологичном поиске составил 95 %. Штамм *P. entomophila* L48 (GenBank CT573326) — энтамопатогенная бактерия, принадлежащая к сапрофитным почвенным аэробным бактериям. Установлено, что в данном штамме присутствуют ферментативные системы, обеспечивающие метаболизм бензойной, 4-гидроксibenзойной, 3-гидроксibenзойной и 3,4-дигидроксibenзойной кислот. При этом БДО участвует только в трансформации незамещенной бензойной кислоты, а гены расположены на хромосоме [24]. Штамм *Pseudomonas* sp. VLB120 (GenBank CP003961), разлагающий октанол, толуол и стирол, был выделен из почв Штутгарта в Германии. Гены БДО у данного штамма имеют хромосомальную, но не плазмидную локализацию [25]. Однако обнаружение у территориально удаленных бактериальных штаммов высокоидентичных генов *benA* свидетельствует в пользу теории о передаче генетического материала между бактериями рода *Pseudomonas* в процессе адаптации к высокому уровню загрязнения ароматическими и хлорароматическими соединениями [19, 21, 22].

Выявленные в настоящем исследовании фрагменты гена α -субъединицы БДО обладают уникальными нуклеотидными последовательностями, что подтверждается отсутствием 100 % сходства с последовательностями известных генов *benA*, размещенными в международных базах данных. Установлено, что исследуемый фрагмент гена *benA*, распространенный среди бактериальных штаммов ассоциаций А1, А5 и В4, содержит одну замену (вместо цитозина

в составе нуклеотида присутствует тимин), по две замены в структуре нуклеотидов выявлено у генов α -субъединицы БДО, распространенных в ассоциациях А4, В3 и В6 (у всех присутствует замена цитозина в составе нуклеотида на тимин, а также аденина на цитозин (ассоциация А4), гуанина на тимин (ассоциация В3) и гуанина на аденин (ассоциация В6)). Три замены в нуклеотидах обнаружены во фрагменте гена *benA*, распространенного в ассоциации В2, а для последовательности фрагмента гена *benA*, представленного в ассоциации В1, установлено шесть замен в составе нуклеотидов. Наибольшее количество отличий обнаружено в нуклеотидной последовательности исследуемого фрагмента гена α -субъединицы БДО, характерного для ассоциации В5 (14 замен).

Обнаруженные точечные мутации не проявляются при анализе аминокислотной последовательности фрагмента α -субъединицы БДО у представителей ассоциаций А1, А5, В2, В4 и В6. По одной аминокислотной замене установлено в последовательности БДО ассоциаций А4 (серин замещен на аргинин) и В3 (вместо глутаминовой кислоты в составе белка присутствует аспарагиновая кислота). Две аминокислотные замены выявлены в последовательности исследуемого белка, характерного для штаммов ассоциации В1 (тирозин и аланин замещены на серин). Наибольшее количество отличий обнаружено в аминокислотной последовательности α -субъединицы БДО ассоциации В5 — четыре замены (дважды аланин замещен серином, и однократно вместо лизина представлен глутамин, а вместо аспарагина — лизин). На настоящем этапе исследования нельзя сказать, позволяют ли выявленные отличия в нуклеотидной и аминокислотной последовательностях α -субъединицы БДО более эффективно использовать бензоат в качестве источника углерода и энергии исследуемым бактериальным сообществам, по сравнению с известными штаммами-деструкторами ароматических соединений.

Известно, что одним из адаптационных механизмов, позволяющих аэробным бактериям приспособиться к выживанию в стрессовых условиях, являются мутации, в том числе точечные мутации [26]. Мутации могут также возникать вследствие действия химических соединений, присутствующих в среде обитания бактерий. Исследуемые в настоящей работе бактериальные ассоциации в течение длительного времени были подвержены действию хлорорганических соединений группы СОЗ, одно из негативных свойств которых состоит в увеличении частоты мутаций при попадании в живые организмы [4]. По-видимому, сочетание данных факторов и привело к формированию уникальных последовательностей гена α -субъединицы БДО среди разных видов в бактериальных сообществах, сложившихся в почвах на территории промплощадки ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, Россия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в бактериальных ассоциациях, сформировавшихся в результате длительного воздействия хлорароматических загрязнителей в естественных и искусственных условиях, идентифицированы гены, детерминирующие α -субъединицу бензоат диоксигеназы. Выявлена филогенетическая близость амплифицированных нуклеотидных последовательностей с генами *benA* штаммов рода *Pseudomonas*, осуществляющими деструкцию различных ароматических соединений.

Дополнительная информация

Исследование выполнено в рамках госзадания, номер госрегистрации темы: 01201353249.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тререр Ю. СОЗ — стойкие и опасные // *The Chemical Journal*. — 2013. — № 1. — С. 30–34. [Treger U. POPs — persistent and dangerous. *The Chemical Journal*. 2013(1):30-34. (In Russ.)]
2. Назаров А.В., Егорова Д.О., Макаренко А.А., и др. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами // *Экология человека*. — 2016. — № 3. — С. 3–8. [Nazarov AV, Egorova DO, Makarenko AA, et al. Ecological-microbiological assessment of polychlorinated biphenyl-contaminated grounds. *Ecology Human*. 2016;(3):3-8. (In Russ.)]
3. Revich B, Shelepchikov A. Persistent organic pollutants (POPs) hot spots in Russia. In: Mehmetli E, Koumanova B. The fate of persistent organic pollutants in the environment. NATO science for peace and security series. Springer, Dordrecht; 2008. P. 113-126. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6642-9_9.
4. Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22-23 May / UNEP/POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme. Geneva; 2001. 44 p.
5. Соляникова И.П., Борзова Щ.В., Емельянова Е.В., и др. Диоксигеназы, индуцирующиеся при разложении бензоата деструкторами хлорбифенилов *Rhodococcus wratislaviensis* G10 и хлорфенолов *Rhodococcus opacus* 1CP, и гены, потенциально вовлеченные в этот процесс // *Биохимия*. — 2016. — Т. 81. — № 9. — С. 1239–1253. [Solyanikova IP, Borzova OV, Emelyanova EV, et al. Dioxygenases of chlorobiphenil-degrading species *Rhodococcus wratislaviensis* G10 and chlorophenol-degrading species *Rhodococcus opacus* 1CP induced in benzoate-grown cells and genes potentially involved in these processes. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81(9):986-998. (In Russ.).] <https://doi.org/10.1134/S000629791609008X>.
6. Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial transformation of chlorinated benzoates. *Rev Environ Sci Bio Technol*. 2008;7(3):191-210. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9133-z>.
7. Dalvi S, Youssef NH, Fathepure BZ. Microbial community structure analysis of a benzoate-degrading halophilic archaeal enrichment. *Extremophiles*. 2016;20(3):311-321. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0823-0>.
8. Parales RE, Resnick SM. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. *Pseudomonas*. 2006;4:287-340. https://doi.org/10.1007/0-387-28881-3_9.
9. Kahlon RS. *Pseudomonas: molekular and applied biology*. Springer International Publishing Switzerland; 2016. 519 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31198-2>.
10. Solyanikova IP, Emelyanova EV, Shumkova ES, et al. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by *Actinobacteria*. *Int Biodeter Biodegrad*. 2015;100:155-164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.028>.
11. Zhan Y, Yu H, Yan Y, et al. Genes involved in the benzoate catabolic pathway in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. *Curr Microbiol*. 2008;57(6):609-614. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9251-4>.
12. Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н. Подготовительный метаболизм 4-хлорбензойной кислоты у *Arthrobacter globiformis* // *Микробиология*. — 1981. — Т. 50. — № 2. — С. 423–428. [Zaitsev GM, Karasevich YuN. Preparatory metabolism of 4-chlorobenzoic acid in *Arthrobacter globiformis*. *Microbiology*. 1981;50(2):423-428. (In Russ.)]
13. Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995. 450 p.
14. Методы общей бактериологии. В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта и др.; пер. с англ. под ред. Е.Н. Кондратьевой, Л.В. Калакуцкого. — М.: Мир, 1983–1984. [Methods for general and molecular bacteriology. V 3 t. Ed. by Ph. Gerhardt et al., translated from English E.N. Kondrat'eva, L.V. Kalakutskij. Moscow: Mir; 1983-1984. (In Russ.)]
15. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173(2):697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
16. Baggi G, Bernasconi S, Zangarossi M, et al. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents. *Int Biodeter Biodegrad*. 2008;62(1):57-64. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.002>.
17. Benning MM, Wesenberg G, Liu RQ, et al. The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. Strain CBS-3. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33572-33579. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33572>.

18. Kobayashi K, Katayama-Hirayama K, Tobita S. Hydrolytic dehalogenation of 4-chlorobenzoic acid by an *Acinetobacter* sp. *J Gen Appl Microbiol*. 1997;43(2):105-8. <https://doi.org/10.2323/jgam.43.105>.
19. Coleman ML, Chisholm SW. Ecosystem-specific selection pressures revealed through comparative population genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(43):18634-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009480107>.
20. Dunning Hotopp JC. Horizontal gene transfer between bacterial and animals. *Trends Genet*. 2011;27(4):157-163. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.005>.
21. Syvanen M. Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annu Rev Genet*. 2012;46:341-358. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155529>.
22. Polz MF, Alm EJ, Hanage WP. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends Genet*. 2013;29(3):170-175. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.006>.
23. Li D, Yan Y, Ping S, et al. Genom-wide investigation and functional characterization of the β -ketoadipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Microbiol*. 2010;10(1):36. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/36>.
24. Vodovar N, Vallenet D, Cruveiller S, et al. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology*. 2006;24(6):673-679. <https://doi.org/10.1038/nbt1212>.
25. Köhler KA, Rückert C, Schatschneider S, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. Strain VLB120 a solvent tolerant, styrene degrading bacterium, isolated from forest soil. *J Biotechnol*. 2013;168(4):729-730. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.016>.
26. Liang B, Jiang JD, Zhang J, et al. Horizontal transfer of dehalogenase genes involved in the catalysis of chlorinated compounds: evidence and ecological role. *Crit Rev Microbiol*. 2012;38(2):95-110. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2011.618114>.

✿ Информация об авторах

Эльмира Алиевна Назарова — аспирант, лаборатория молекулярной микробиологии и биотехнологии. Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, Пермь. E-mail: e9026309777@gmail.com.

Татьяна Денисовна Кирьянова — магистрант, биологический факультет. ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь. E-mail: kitadi@gmail.com.

Дарья Олеговна Егорова — канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия; доцент кафедры биогеоценологии и охраны природы географического факультета, ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь. SPIN: 9450-7883. E-mail: daryao@rambler.ru.

✿ Authors and affiliations

Elmira A. Nazarova — Postgraduate Student, Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia. E-mail: e9026309777@gmail.com.

Tatyana D. Kiryanova — Undergraduate, Biological Faculty, Perm State University, Perm, Russia. E-mail: kitadi@gmail.com.

Daria O. Egorova — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; Associate Professor of the Department of Biogeocenology and Nature Conservation, Faculty of Geography, Perm State University, Perm, Russia. SPIN: 9450-7883. E-mail: daryao@rambler.ru.