

УДК 579.25

## ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРФЕНОКСИУКСУСНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИЙ РОДА *Raoultella*

© 2021 г. Н. В. Жарикова<sup>1</sup>\*, Т. Р. Ясаков<sup>1</sup>, Е. Ю. Журенко<sup>1</sup>, В. В. Коробов<sup>1</sup>, Т. В. Маркушева<sup>1</sup><sup>1</sup>Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: puzzle111@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.08.2020 г.

После доработки 27.11.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Представители вида *Raoultella planticola*, выделенные из почв, загрязненных отходами химического производства, использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную/2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии. Установлено, что клетки штаммов 33-4ch, 36D и 36T содержали плазмиды, обозначенные rRP33-4ch, rRP36D и rRP36T соответственно. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов показал, что rRP33-4ch и rRP36T, вероятно, являлись одной и той же плазмидой, в то время как в профилях рестрикции rRP36D содержались дополнительные фрагменты. Методом элиминации плазмид установлено, что гены деградации хлорфеноксиуксусных кислот имели внехромосомную локализацию. ПЦР-анализ показал отсутствие в геномах исследуемых штаммов известных генов инициации (*tfdA* и *tftA*) конверсии хлорфеноксиуксусных кислот. Идентифицированные промежуточные метаболиты (хлорфеноксиуксусная, феноксиуксусная кислоты и 2-кето-3-метил-муконовый полуальдегид) свидетельствовали о способности штаммов 33-4ch, 36D и 36T осуществлять полное дехлорирование ароматического кольца субстрата с последующим его *мета*-расщеплением.

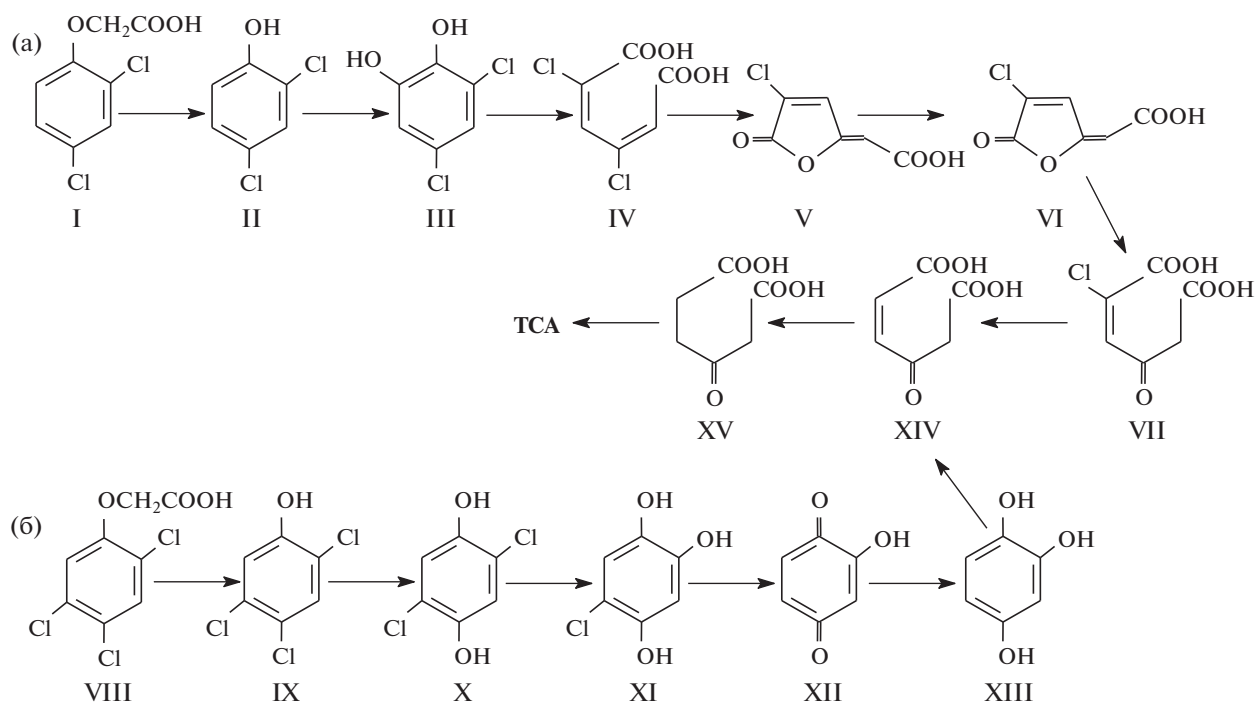
**Ключевые слова:** 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, плаزمида деградации, *tfd*, *tft*, 2-гидроксимуконовый полуальдегид

DOI: 10.31857/S0555109921030156

2,4-Дихлорфеноксиуксусная (**2,4-Д**) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (**2,4,5-Т**) кислоты относятся к группе синтетических ауксинов, которые с конца второй мировой войны широко используются в качестве действующих агентов селективных гербицидов. Масштабное применение этих агрохимикатов привело к адаптации к ним почвенной микробиоты и селекции бактерий, способных к их активной деградации. Известно, что такие процессы идут, в основном, на уровне генов реакций первичного окисления субстратов, которые часто локализуются на внехромосомных элементах, что объясняет механизмы их распространения среди бактериальных популяций [1].

Известно, что в зависимости от степени галогенированности субстрата аэробная деградация хлорароматических соединений, в том числе и хлорфеноксиуксусных кислот, может пойти двумя основными метаболическими путями. Бактерии разлагают моно- и дихлорированные субстраты обычно по хлоркатехольному пути с последующим *орто*-расщеплением ароматического кольца [2]. Классический путь бактериальной де-

градации 2,4-Д штаммом *Cupriavidus necator* (ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* и *Wautersia eutropha*) JMP134, локализованный на плазмиде rJP4, начинается с образования 2,4-дихлорфенола (**2,4-ДХФ**) [3, 4]. Стадия инициации катализируется  $\alpha$ -кетоглутарат( **$\alpha$ -кГ**)-зависимой диоксигеназой, кодируемой геном *tfdA*. 2,4-Дихлорфенолгидролаза (**TfdB**) осуществляет трансформацию 2,4-ДХФ до 3,5-дихлоркатехола (**3,5-ДХК**), а *tfdCDEF*-кодируемые ферменты – дальнейшую конверсию последнего через модифицированный *орто*-путь расщепления вплоть до  $\beta$ -кетoadипата (рис. 1a). Такой путь установлен для большинства известных к настоящему моменту бактериальных деструкторов 2,4-Д, относящихся к  $\beta$ - и  $\gamma$ -подклассам *Proteobacteria* родов *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Delftia*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodospirillum rubrum*, *Variovorax* и др., полученных из почв сельскохозяйственного и промышленного назначения [5]. Для многих штаммов этой группы, так же как для штамма *C. necator* JMP134, характерна плазмидная локализация *tfdA*, *tfdB* и *tfdCDEF* детерминант деградации [6]. Необходимо отметить, что существуют другие группы



**Рис. 1.** Пути аэробной деградации хлорированных феноксиуксусных кислот у бактерий: а – 2,4-Д штамма *S. necator* JMP134 [3], б – 2,4,5-Т штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [8–10]. Условные обозначения: I – 2,4-Д; II – 2,4-дихлорфенол; III – 2,4-дихлоркатехол; IV – 2,4-дихлор-*цис*, *цис*-муконат; V – *транс*-2-хлордиенлактон; VI – *цис*-2-хлордиенлактон; VII – 2-хлормалеилуксусная кислота; VIII – 2,4,5-Т; IX – 2,4,5-трихлорфенол; X – 2,5-дихлоргидрохинон; XI – 5-хлор-гидрокси-1,4-бензохинон; XII – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; XIII – гидрокси-1,4-бензохинон; XIV – малеилуксусная кислота; XV –  $\beta$ -кетоадиат; TCA – цикл трикарбоновых кислот.

деструкторов 2,4-Д, которые содержат или гомолог *tfdA* гена – *tfdA $\alpha$*  или негомологичные гены – *cadAB*, но все они строго принадлежат к таксону  $\alpha$ -*Proteobacteria*.

Второй основной метаболический путь установлен для бактерий, растущих на полигалогенированных ароматических субстратах, где ключевым метаболитом является не хлоркатехол, а хлорированные гидрохинон и/или гидрокси-1,4-бензохинон. В дальнейшем происходит расщепление ароматического кольца с образованием малеилацетата, а затем –  $\beta$ -кетоадиата [7]. Подобным образом происходит конверсия 2,4,5-Т у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (ранее *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*) AC1100 (рис. 1б), гены деградации которого имеют хромосомную локализацию [8–10].

Стадия инициации происходит в результате монооксигеназной активности 2,4,5-Т-оксигеназы, которая превращает 2,4,5-Т в 2,4,5-трихлорфенол [11]. Гены, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы многокомпонентной 2,4,5-Т оксигеназы, отнесенной к оксигеназам Риске-типа, получили обозначение *tfiAB* и позднее были локализованы еще у нескольких штаммов рода *Burkholderia* [12, 13].

Цель работы – исследование катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот и локализации генов деградации у бактерий рода *Raoultella*.

## МЕТОДИКА

Объектами исследований служили три природных бактериальных штамма 33-4ch, 36D и 36T, изолированные из образцов почвы, загрязненной отходами химического производства (Уфа, Россия).

Выделение геномной ДНК, амплификация частичной последовательности гена 16S рРНК и секвенирование были описаны ранее в статье Жариковой с соавт. [14], дальнейший анализ проведен в работе Коробова с соавт. [15].

Методики выделения плазмидной ДНК, ее рестрикционный анализ и элиминация плазмид из клеток штаммов с использованием бромистого этидия опубликованы ранее [16].

Лизис клеток и выделение ДНК-матриц для ПЦР-реакций получали нагреванием бактериальных клеток 7 мин до 95°C, с последующим осветлением клеточного лизата центрифугированием в течение 5 мин на MiniSpin (“Eppendorf”, США) при 9840 g.

ПЦР проводили с использованием амплификатора ThermalCycler (“Applied Biosysteme”, США) в объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-НСl (рН 8.3), 17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001%-ный Твин 20, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 пмоль каждого праймера, 2 мМ дНТФ – 1.0 мкл и 1.25 единиц *Taq*-полимеразы

(“Sigma-Aldrich”, США), ДНК-матрица – 1 мкл осветленного клеточного лизата с концентраций геномной ДНК ~25 нг.

Аmplификации гена *tfdA* проводили по следующей программе: 1) 95°C – 6 мин; 2) 94°C – 45 с; 3) 64°C – 30 с; 4) 72°C – 2 мин; 5) повтор 2, 3, 4 – 50 циклов; 6) 72°C – 2 мин. Использовали праймеры *tfdA\_F*, 5' – GAGCACTACGCACTGAACTCCCG – 3', *tfdA\_R*, 5' – CTTCGGCCACCGGAAGGCCT – 3' [17]. В качестве положительного контроля служила рJP4, плаزمида деградации 2,4-Д.

Для амплификации гена *tftA* использовали следующие праймеры: *tftA\_F* – 5' – ACATTCGACGGGAATTGGAA – 3', *tftA\_R* – 5' – AGGATTGAAGAAATCCTGATA – 3', предложенные Хуонг с соавт. [13]. Реакцию проводили по следующей схеме: 94°C – 2 мин; 94°C – 1 мин; 50°C – 1 мин; 72°C – 1 мин; повтор 2, 3, 4 – 30 циклов; 72°C – 2 мин. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *Burkholderia* sp. M38-VN3-2W, любезно предоставленную автором Хуонгом [13], с известной нуклеотидной последовательностью *tftA*.

Культуры бактерий (накопительные и чистые) выращивали в конических колбах (250 мл) на минимальной солевой среде M9 [18], содержащей в качестве единственного источника углерода 2,4-Д/2,4,5-Т в концентрации 100 мг/л. Культивирование проводили при температуре 28°C в термостатируемой установке УВМТ-12-250 (“Элион”, Россия) при 120 об/мин. Интенсивность роста культуры оценивали по оптической плотности (ОП<sub>590</sub>) клеточной суспензии с использованием фотоколориметра КФК-2 (Россия).

Определение количества хлорфеноксиуксусных кислот в культуральной жидкости проводили согласно руководству [19] с небольшими модификациями. Для анализов отбирали по 5 мл культуральной жидкости, освобождали от клеток центрифугированием при 3600 g в течение 30 мин. Супернатант подкисляли 2 н соляной кислотой до pH 2.0 и добавляли в пробы в качестве внутреннего стандарта 2,4,5-Т (при определении количества 2,4-Д) и 2,4-Д (при определении 2,4,5-Т) до конечной концентрации каждой метки 100 мг/л. Затем из проб хлорфеноксиуксусные кислоты экстрагировали трехкратно равными объемами хлороформа. После испарения хлороформа экстракты метилировали свежеприготовленным диазометаном и переводили в гексан (2 мл). Половину полученного образца использовали для определения интермедиатов, а остальное – для фракционирования методом тонкослойной хроматографии на пластинах силуфол UV-254 (“Chemapol”, Чехия). Сканирование образцов проводили при длине волны 260–280 нм в камере Хромоскана (“Joyce-Loebl”, Великобритания).

Содержание хлорфеноксиуксусных кислот определяли по калибровочному графику для чистого стандарта.

Продукты метаболизма хлорфеноксиуксусных кислот определяли на хромато-масс-спектрометре NERMAG R-30-10 с хроматографом Carlo Erba MEGA 536010 (“Hewlett-Packard”, США). Условия определения: капиллярная колонка 15 м × 0.25 мм, привитая фаза ДВ-1, растворитель гексан, температура инжектора 200°C, интерфейса 250°C, колонки от 80 до 250°C, скорость нагрева 3.5 мин. Масс-спектры электронного удара получали при температуре источника ионов, равной 250°C, энергии электронов, равной 70 эВ.

Интермедиаты идентифицировали с использованием системы обработки данных MS HP ChemStation, содержащей библиотеку из 138 000 масс-спектров Base Date WILEY138L.

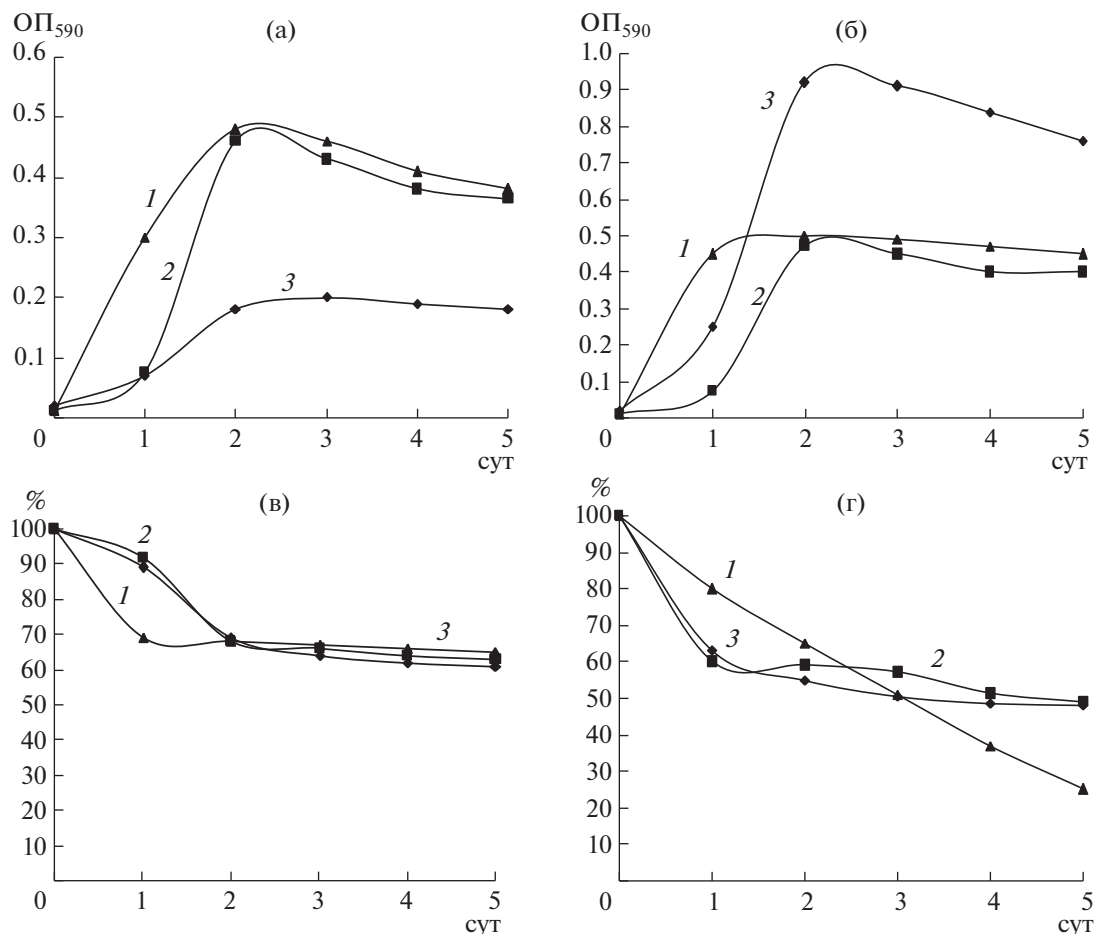
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы 36D и 36T были испытаны на способность использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Третий штамм – 33-4ch, уже описанный ранее как деструктор 2,4,5-Т [20], культивировали только на 2,4-Д. Периодическое культивирование штаммов проводили в течение недели. Значительная убыль концентрации субстрата наблюдалась в период активного роста штаммов (1–2 сут), а после 5 сут она практически не менялась (рис. 2). Таким образом, все исследуемые штаммы проявили способность к конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т, однако более предпочтительным для них, особенно для 36D, оказался последний субстрат.

В разное время активность штаммов-деструкторов 2,4-Д исследовали в условиях использования 2,4-Д как единственного источника углерода и энергии в концентрации от нескольких мг/л до нескольких сотен мг/л или даже г/л [5].

В то же время, в отличие от хорошо изученных и довольно распространенных бактерий, метаболизирующих 2,4-Д, известно на порядок меньше чистых культур, осуществляющих конверсию более хлорированного производного – 2,4,5-Т [21].

Впервые такой штамм AC1100 был получен с использованием технологии так называемого плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга. Активно растущая культура AC1100 (таксономия этого штамма менялась: ранее была идентифицирована как *Pseudomonas cepacia*, потом *Burkholderia cepacia*, а затем *Burkholderia phenoliruptrix*) метаболизировала более 97% 2,4,5-Т, присутствующего в среде в концентрации 1 мг/мл, в течение 6 сут. Однако способность к разложению 2,4,5-Т у штамма AC1100 оказалась нестабильной и само-



**Рис. 2.** Зависимость значений ОП<sub>590</sub> культуральной жидкости штаммов *R. planticola* 36 D (1), *R. planticola* 33 4ch (2) и *R. planticola* 36Т (3) при выращивании культур на 2,4-Д (а) и 2,4,5-Т (б), динамика концентрации 2,4-Д (в) и 2,4,5-Т (г) в зависимости от времени.

произвольно терялась с высокой частотой, что, скорее всего, было связано с его гибридным происхождением [22].

Второй штамм *Nocardioides simplex* 3E, изолированный в 1990 г., был способен использовать 2,4,5-Т при достаточно высоких концентрациях — до 4.0 мМ, однако полная деградация ксенобиотика происходила только при концентрации 0.04 мМ [23].

Относительно недавно, в 2007 г., из почв Вьетнама были выделены 353 штамма-деструктора 2,4-Д и 2,4,5-Т. От общего количества изолированных штаммов 65% оказались деструкторами 2,4,5-Т. Способность всех изолятов к деградации хлорфеноксиуксусных кислот проверялась на солевой среде, содержащей 100 мг/л 2,4-Д/2,4,5-Т [13].

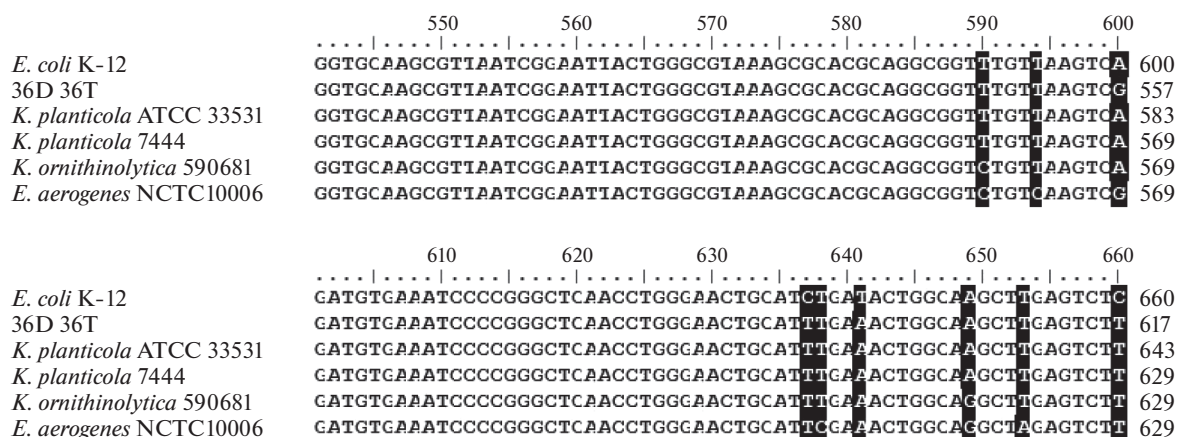
Таким образом, исследованные в данной работе штаммы (особенно 36D) оказались более перспективными в качестве потенциальных агентов утилизации 2,4,5-Т и в дальнейшем могут быть ис-

пользованы для решения проблем ремедиации территорий загрязненным этим гербицидом.

Известно, что конверсию 2,4-Д и 2,4,5-Т, как правило, контролируют разные генные кластеры, локализация которых часто коррелирует с таксономическим положением штамма.

Для культур 36D и 36Т были определены практически полные последовательности (1439 п.н., соответствующие позициям 42-1481 по номенклатуре *E. coli*) амплификатов генов, кодирующих 16S рРНК, которые оказались идентичными друг другу и 16S рДНК штамма *Raoultella planticola* 33-4ch (DQ333356), депонированной в базе данных GenBank ранее [20].

Сравнение последовательностей 16S рДНК исследуемых штаммов и двух видов, принадлежащих к роду *Klebsiella* — *K. planticola* и *K. ornithinolytica*, продемонстрировало высокую степень их сходства (идентичность составила 99.5–99.8 и 99.3–99.6% соответственно).



**Рис. 3.** Сравнение частичных нуклеотидных последовательностей варибельной области V7 16S рДНК штаммов 36D (а) и 36Т (б) и родственных культур *Escherichia coli* K-12, *Klebsiella planticola* ATCC 33531, *Klebsiella planticola* 7444, *Klebsiella ornithinolytica* 590681 и *Enterobacter aerogenes* NCTC 10006. Черным цветом выделены сигнатурные нуклеотиды.

Известно, что для представителей рода *Klebsiella* внутривидовые уровни сходства последовательностей 16S рДНК обычно превышают 99.0%. В то же время уровни межвидового сходства варьируют от 96.6 до 98.6% с одним исключением: сходство последовательностей 16S рДНК между *K. planticola* и *K. ornithinolytica* достигает внутривидового уровня 99.0–99.4% [24]. Некоторые исследователи даже не считают их разделение на два вида оправданным и рассматривают *K. ornithinolytica* как биогруппу *K. planticola*.

В пределах 16S рДНК у представителей рода *Klebsiella* выявлено несколько варибельных областей, на протяжении которых были обнаружены сигнатурные нуклеотиды, которые оказались специфичны для каждого вида этого рода. В варибельной области V7 (позиции 489–653) были идентифицированы только два нуклеотида в пределах целой последовательности 16S рДНК, по которым можно различить представителей видов *K. planticola* и *K. ornithinolytica* [24] (рис. 3).

Таким образом, наличие специфичных нуклеотидов в положениях 590 и 649 в последовательностях штаммов 36D и 36Т свидетельствовало об их принадлежности к виду *K. planticola*. Так как ранее три вида рода – *K. planticola*, *K. ornithinolytica* и *K. terrigena* были реклассифицированы в новый род *Raoultella* [25], то исследуемые штаммы были идентифицированы как *Raoultella planticola* 36D и *Raoultella planticola* 36Т.

Известно, что у β- и γ-подклассов *Proteobacteria* за деградацию 2,4-Д отвечает *tfd*-группа генов, которые часто локализованы на плазмидах [5]. Однако среди деструкторов γ-*Proteobacteria* ранее не идентифицировались штаммы, принадлежащие к роду *Raoultella* или реклассифицированные

по принадлежности к данному роду виды *K. planticola*, *K. ornithinolytica* и *K. terrigena*.

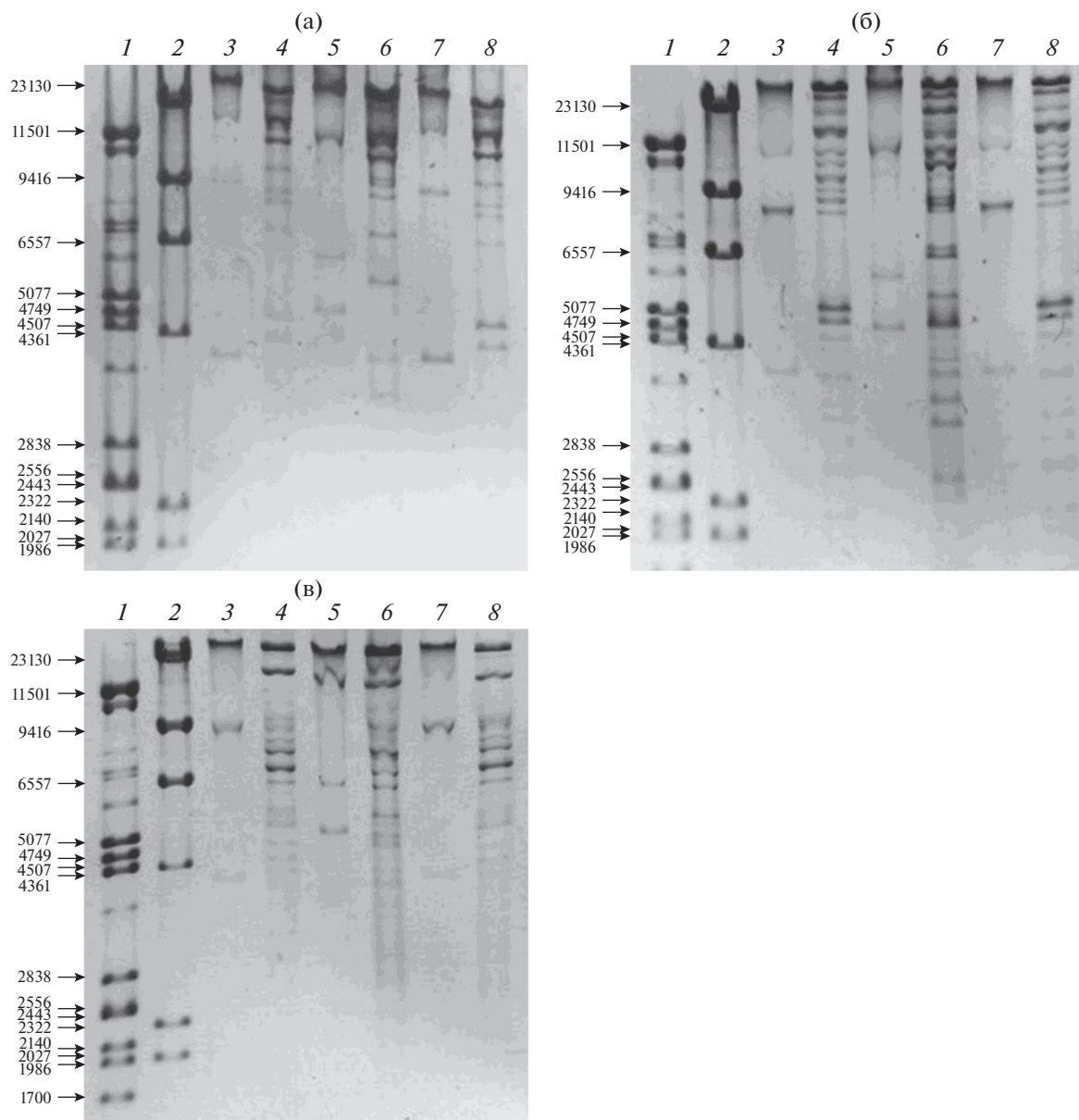
Поиск внехромосомных элементов в клетках штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т выявил наличие плазмид, обозначенных нами как pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T соответственно. С целью оценки их разнообразия был проведен анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с использованием *Bam*HI, *Hind* III и *Pst* I ферментов (рис. 4).

Профили рестрикции pRP33-4ch и pRP36T по всем трем ферментам оказались идентичными, в то время как в профиле плазмиды pRP36D, в целом несомненно сходном с предыдущими, содержались дополнительные фрагменты (дорожки б на рис. 4а–4в). Скорее всего, pRP33-4ch и pRP36T являются одной и той же плазмидой (или очень близкими), а pRP36D – ее вариантом, которая “захватила” некую нуклеотидную последовательность.

Размеры плазмид составили для pRP33-4ch и pRP36T 110, а для pRP36D – 130 т. п. н. Известные плазмиды деградации β- и γ-подклассов *Proteobacteria* обладали сопоставимыми размерами, например: pJP4 (88 т. п. н.), pIJB1 (102 т. п. н.), pEST4011 (70 т. п. н.) и pMSB1 (80 т. п. н.) штаммов *C. necator* JMP134, *Burkholderia cepacia* 2a, *Achromobacter xylosoxidans* EST4002 и *Azotobacter chroococcum* MSB-1 соответственно [3, 26–28].

Для локализации детерминант катаболизма 2,4-Д и 2,4,5-Т в геномах штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т применялся метод элиминации плазмид. В случае необратимой утраты исследуемых свойств считали, что детерминанты деградации расположены вне хромосомы.





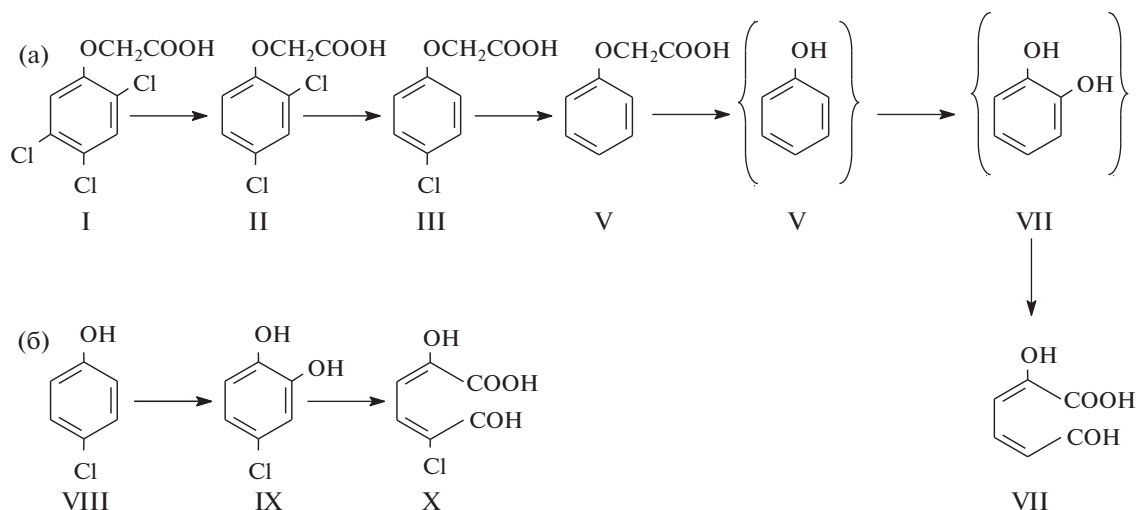
**Рис. 4.** Электрофорез плазмид pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T после обработки *Bam*H I (а), *Hind* III (б) и *Pst* I (в) ферментами рестрикции: 1, 2 – ДНК-маркеры  $\lambda$ Pst I и  $\lambda$ Hind III соответственно; 3, 5, 7 – нативные препараты pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T; 4, 6, 8 – рестриktированные препараты pRP33-4ch, pRP36D, pRP36T. Стрелками показаны размеры фрагментов ДНК маркеров.

Бесплазмидные клетки были получены при использовании концентрации бромистого этидия 200 мкг/мл, а сам факт элиминации подтверждался отсутствием плазмид в препаратах внехромосомной ДНК.

В ходе дальнейшей работы бесплазмидные варианты исследуемых штаммов проверялись на способность использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом отдельные колонии высевались на агаризованную минимальную среду М9 с 2,4-Д/2,4,5-Т в

качестве единственного источника углерода и энергии. Контролем в эксперименте служил рост исходных штаммов на тех же средах и их бесплазмидных вариантов на богатой среде (МПА) (табл. 1).

Бесплазмидные варианты штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T не были способны использовать 2,4-Д и 2,4,5-Т в качестве единственного источника углерода и энергии. Следовательно, детерминанты катаболизма хлорфеноксисукусных кислот расположены на



**Рис. 5.** Схемы вероятного метаболизма: а – 2,4-Д и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т; б – 4-хлорфенола у культуры *C. testosteroni* JH5 [30]. Условные обозначения: I – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота, II – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, III – 4-хлорфеноксиуксусная кислота, IV – феноксиуксусная кислота, V – фенол, VI – катехол, VII – 2-гидроксимуконовый полуальдегид VIII – 4-хлорфенол, IX – 4-хлоркатехол, X – 5-хлор-2-гидроксимуконовый полуальдегид, в скобках показаны предполагаемые метаболиты.

плазмидах pRP33-4ch, pRP36D и pRP36T соответственно.

Известно, что у групп бактериальных деструкторов 2,4-Д и 2,4,5-Т стадии инициации катализируют α-кетоглутарат-зависимая диоксигеназа (TfdA) и 2,4,5-Т-оксигеназа (TftAB) соответственно. Однако ПЦР-анализ с использованием праймеров, разработанных на кодирующие их гены *tfdA* [17] и *tftA* [13] не выявил их наличия в геномной ДНК исследуемых штаммов, в то время как целевые ПЦР-продукты присутствовали в обоих положительных контролях.

Поиск промежуточных метаболитов в средах культивирования изучаемых штаммов в условиях использования 2,4-Д и 2,4,5-Т как единственных источников углерода и энергии показал присут-

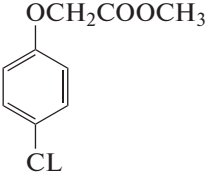
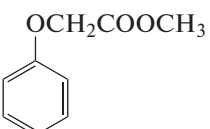
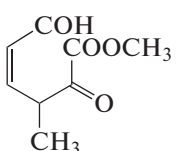
ствие хлорфеноксиуксусной, феноксиуксусной и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой (2-кето-3-метил-муконовый полуальдегид) кислот (табл. 2). Ранее для культуры *R. planticola* 33-4ch были установлены идентичные интермедиаты деградации 2,4,5-Т [20]. Следовательно, конверсия 2,4-Д и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т и *R. planticola* 33-4ch, вероятно, происходит одним общим путем через одинаковые промежуточные метаболиты (рис. 5а).

Обнаружение в среде культивирования исследуемых штаммов 4-хлорфеноксиуксусной и феноксиуксусной кислот показало, что на начальной стадии конверсии хлорфеноксиуксусных кислот происходило восстановительное дехлорирование субстрата, а не его гидроксилирование с отщепле-

**Таблица 1.** Оценка способности штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36Т к конверсии 2,4-Д и 2,4,5-Т после элиминации плазмид

Штамм	Оценка роста штаммов на средах		
	МПА	М9 с добавлением	
		2,4-Д	2,4,5-Т
33-4ch (pRP33-4ch <sup>-</sup> )	+	-	-
33-4ch (pRP33-4ch <sup>+</sup> ) контроль	+	+	+
36D (pRP36D <sup>-</sup> )	+	-	-
36D (pRP36D <sup>+</sup> ) контроль	+	+	+
36Т (pRP36Т <sup>-</sup> )	+	-	-
36Т (pRP36Т <sup>+</sup> ) контроль	+	+	+

**Таблица 2.** Масс-спектрометрический анализ метаболитов конверсии 2,4-Д, и 2,4,5-Т у штаммов *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T

Метаболит	Основные пики в масс-спектре $m/z$ , %	33-4ch		36D		36T	
		2,4-Д	2,4,5-Т[20]	2,4-Д	2,4,5-Т	2,4-Д	2,4,5-Т
 Метилловый эфир 4-хлорфеноксиуксусной кислоты	$M^+$ 200 (100), 202 (32), 143 (32), 141 (100), 141 (100), 113 (38), 111 (58)	+	+	+	+	+	+
 Метилловый эфир феноксиуксусной кислоты	$M^+$ 166 (50), 107 (120), 77 (80)	+	+	+	+	+	+
 Метилловый эфир 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновой кислоты	$M^+$ 156 (2), 126 (6), 111 (10), 97 (20), 95 (20), 85 (21), 83 (21), 71 (16), 57 (100), 44 (50)	+	+	+	+	+	+

нием остатка уксусной кислоты и образованием соответствующего хлорфенола как при деградации субстратов штаммами *S. necator* JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100, рассмотренными выше (рис. 1).

Реакции восстановительного дехлорирования описаны в путях деградации хлорфеноксиуксусных кислот для двух штаммов: *N. simplex* 3E [23] и *A. chroococcum* [29], однако кодирующие их гены до сих пор не известны. Стоит отметить, что диссимилиация 2,4-Д у *A. chroococcum* MSB-1, также как у штаммов 33-4ch, 36D и 36T, контролируется плазмидой pMSB1 [28].

По современным представлениям ключевой стадией конверсии хлорароматических соединений является раскрытие ароматического кольца. Эта реакция катализируется диоксигеназами, и может происходить между гидроксильными группами (*орто*-расщепление) или по соседству с одним из гидроксильных (*мета*-расщепление) [2, 7].

Обнаруженный метаболит конверсии хлорфеноксиуксусных кислот с открытой углеродной цепью (2-кето-3-метилмуконовый полуальдегид) является метилированным производным 2-гидроксимуконового полуальдегида. Послед-

ний представляет собой классический интермедиат *мета*-расщепления ароматического кольца катехола, в основном характерного для метаболизма метилированных ароматических соединений. Однако известны случаи, когда бактерии использовали *мета*-путь для конверсии хлорфенолов. Так, у штамма *Comamonas testosteroni* JH5 при минерализации 4-хлорфенола был идентифицирован 5-хлор-2-гидроксимуконовый полуальдегид – метаболит *мета*-расщепления хлорированного катехола (рис. 5б) [30].

Таким образом, штаммы *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T, вероятно, осуществляют полное дехлорирование субстрата с последующим *мета*-расщеплением его ароматического кольца (рис. 5а). Ранее подобный путь был описан для культуры *Cellulosimicrobium* sp. NPZ-121 [31].

Исследованные в данной работе штаммы рода *Raoultella* проявляют полисубстратную активностью в отношении сразу двух хлорфеноксиуксусных кислот. Не смотря на то, что 2,4,5-Т считается более сложным субстратом для бактерий и известно немного чистых культур природных штаммов, способных к полной его деградации, оказалось, что



изучаемые культуры (особенно 36D) являются более эффективными деструкторами 2,4,5-Т, а не 2,4-Д. Поскольку часто встает проблема очистки экотопов от целого спектра загрязнителей хлороматической природы, в том числе 2,4-Д и 2,4,5-Т, штаммы *R. planticola* 33-4ch, *R. planticola* 36D и *R. planticola* 36T особенно интересны как потенциально полисубстратные агенты ремедиации таких территорий.

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. Phale P.S., Shah B.A., Malhotra H. // Genes. 2019. V. 10. № 8. P. 569. <https://doi.org/10.3390/genes10080569>
2. Arora P.K., Bae H. // Microb. Cell. Fact. 2014. V. 13. № 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31>
3. Don R.H., Weightman A.J., Knackmuss H.J., Timmis K.N. // J. Bacteriol. 1985. V. 161. № 3. P. 85–90.
4. Laemmli C., Werlen C., van der Meer J.R. // Arch. Microbiol. 2004. V. 181. № 2. P. 112–121. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0634-4>
5. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 5. С. 514–528. <https://doi.org/10.7868/S0042132417050076>
6. Kumar A., Trefault N., Olaniran A.O. // Critical Reviews in Microbiology. 2016. V. 42. № 2. P. 194–208. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068>
7. Enguita F.J., Leitão A.L. // Biomed Res. Int. 2013. V. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/542168>
8. Danganan C.E., Ye R.W., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 11. P. 4100–4106.
9. Daubaras D.L., Saido K., Chakrabarty A.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
10. Zaborina O., Daubaras D.L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A.M. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
11. Xun L., Wagnon K.B. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 9. P. 3499–3502.
12. Rice J.F., Menn F.-M., Hay A.G., Sanseverino J., Sayler G.S. // Biodegradation. 2005. V. 16. P. 501–512. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-6186-8>
13. Huong N.L., Itoh K., Suyama K. // Microbes Environ. 2007. V. 22. № 3. P. 243–256. <https://doi.org/10.1264/jsme.2.22.243>
14. 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. // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. № 4. P. 660–671. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.014>
15. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. // Вестник Московского университета. 2017. Серия 16: Биология. Т. 72. № 4. С. 235–240. <https://doi.org/10.3103/S0096392517040083>
16. Маркушева Т.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Гафиятова Л.Р. // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1469–1476.
17. Vælum J., Henriksen T., Christian H., Hansen B., Jacobsen C.S. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 2. P. 1476–1486. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1476-1486.2006>
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
19. Методы определения микроколичеств пестицидов. / Ред. М.А. Клисенко М.: Медицина, 1984. 256 с. 20.
20. Жарикова Н.В., Маркушева Т.В., Галкин Е.Г., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Ситдикова Л.Р., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 292–297. <https://doi.org/10.1134/S0003683806030069>
21. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. // Генетика. 2018. Т. 54. № 3. С. 292–305. <https://doi.org/10.7868/S0016675818030025>
22. Kilbane J.J., Chatterjee D.K., Karns J.S., Kellogg S.T., Chakrabarty A.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.1.72-78.1982>
23. Golovleva L.A., Pertsova R.N., Evtushenko L.I., Baskunov B.P. // Biodegradation. 1990. V. 1. № 4. P. 263–271.
24. Boye K., Hansen D. // Int. J. Med. Microbiol. 2003. V. 292. № 7–8. P. 495–503. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00228>
25. Drancourt M., Bollet C., Carta A., Rousselier P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. № 3. P. 925–932. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-925>
26. Xia X.S., Smith A.R., Bruce I. J. // FEMS Microbiol. Lett. 1996. V. 144. № 2–3. P. 203–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08531.x>
27. Vedler E., Koiv V., Heinaru A. // Gene. 2000. V. 255. P. 281–288. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00329-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00329-2)
28. Balajee S., Mahadevan A. // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 65. № 1–2. P. 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03626.x>
29. Balajee S., Mahadevan A. // Xenobiotica. 1990. V. 20. № 6. P. 607–617. <https://doi.org/10.3109/00498259009046876>
30. Hollender J., Hopp J., Dott W. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 11. P. 4567–4572. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.11.4567-4572.1997>
31. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Галкин Е.Г., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Стариков С.Н., Сагитова А.И., Маркушева Т.В. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 1. С. 93–96. <https://doi.org/10.7868/S002636561801010X>

## Chlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmids of Bacteria of the Genus *Raoultella*

N. V. Zharikova<sup>a, \*</sup>, T. R. Iasakov<sup>a</sup>, E. Yu. Zhurenko<sup>a</sup>, V. V. Korobov<sup>a</sup>, and T. V. Markusheva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*\*e-mail: puzzle111@yandex.ru*

Members of the *Raoultella planticola* species isolated from soils contaminated with chemical waste were capable to use 2,4-dichlorophenoxyacetic/2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid as the sole source of carbon and energy. It was found that cells of strains 33-4ch, 36D and 36T contained plasmids which were designated as pRP33-4ch, pRP36D and pRP36T, respectively. RFLP analysis showed that pRP33-4ch and pRP36T were probably the same plasmid, while pRP36D contained in the restriction profiles additional fragments. Using the method of elimination of plasmids, it was found that the genes for the degradation of chlorophenoxyacetic acids have extrachromosomal localization. PCR analysis showed the absence in the genomes of the studied strains of known initiation genes (*tfdA* and *tftA*) for the conversion of chlorophenoxyacetic acids. The identified intermediate metabolites (chlorophenoxyacetic and phenoxyacetic acids and 2-keto-3-methylmuconic semialdehyde) indicated that strains 33-4ch, 36D and 36T perform complete dechlorination of the aromatic ring of the substrate with its subsequent *meta*-cleavage.

**Keywords:** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, degradation plasmid, *tfd*, *tft*, 2-hydroxymuconic semialdehyde