

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ДЕСТРУКЦИИ *EPSILON*-КАПРОЛАКТАМА, ТОЛУОЛА И *МЕТА*-КСИЛОЛА У ШТАММА *PSEUDOMONAS PUTIDA* СТЗ

© 2020 г. Т. З. Есикова<sup>а</sup>, \*, А. Б. Гафаров<sup>а</sup>, Т. О. Анохина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290 Россия

\*e-mail: das3534@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.07.2019 г.

После доработки 23.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Из активного ила городских очистных сооружений был выделен бактериальный штамм СТЗ, обладающий уникальной способностью разлагать антропогенные токсичные соединения  $\epsilon$ -капролактама, толуола и *мета*-ксилола в качестве единственных источников углерода и энергии. На основании секвенирования и филогенетического анализа гена 16S рРНК изолят был идентифицирован как представитель вида *Pseudomonas putida*. Установлено, что штамм *P. putida* СТЗ содержит конъюгативную мегаплазмиду размером около 550 т.п.н., детерминирующую деструкцию  $\epsilon$ -капролактама до интермедиатов цикла Кребса. Гены, кодирующие окисление толуола и *мета*-ксилола по TOL-пути, локализованы на хромосоме.

**Ключевые слова:**  $\epsilon$ -капролактамы, толуол, *мета*-ксилол, биодegradация, плазмиды биодegradации, катаболические гены

**DOI:** 10.31857/S0026365620020056

Микробная дegradация играет существенную роль в процессах детоксикации устойчивых поллютантов, загрязняющих окружающую среду в результате практической деятельности человека. Способность к дegradации широкого спектра органических соединений, в том числе, токсичных ксенобиотиков, особенно характерна для бактерий рода *Pseudomonas*. Многие природные штаммы псевдомонад несут плазмиды биодegradации, которые, как правило, детерминируют расщепление одного типа соединений. Эти плазмиды контролируют катаболизм бактериями таких соединений, как, например, салицилат, нафталин,  $\epsilon$ -капролактамы, камфора, октан, толуол, ксилол и т.д. (Shintani et al., 2010; Smalla et al., 2015).

$\epsilon$ -Капролактамы (циклический амид 6-аминогексановой кислоты, КАП) – один из наиболее востребованных на мировом рынке химических продуктов, который используется в качестве сырья для производства поликапролактама, более известного как нейлон-6 (Esikova et al., 2012). Ранее нами было показано, что способность бактерий рода *Pseudomonas* утилизировать капролактамы детерминируется плазмидами (CAP плазмидами), которые содержат генетическую информацию, необходимую для полной минерализации ксенобиотика (Есикова и соавт., 2015). Если всего несколько десятилетий назад бактериальных де-

структоров КАП выделяли лишь из почв, контактирующих со сточными водами производств КАП и нейлона-6, то в последние годы, так же как и в настоящей работе, деструкторов ксенобиотика находят даже в почвах с неспецифическим загрязнением (Панов и соавт., 2013). Возможно, распространению и селекции признака утилизации КАП среди почвенных бактерий, удаленных от стоков химических производств, способствует загрязнение окружающей среды продуктами полимеризации КАП (каркасы авто- и авиапокрышек, рыболовные сети, одежда и т.п.), а также конъюгационный перенос CAP плазмид.

В условиях комплексного загрязнения почв совмещение у микроорганизмов нескольких катаболических оперонов в составе одного мобильного генетического элемента обеспечивает определенное конкурентное преимущество их обладателям. Ранее нами были охарактеризованы штаммы псевдомонад, способные утилизировать капролактамы и салицилат в качестве единственных источников углерода и энергии. Было установлено, что способность к биодegradации обоих соединений у них контролируется конъюгативными SAL/CAP плазмидами (Панов и соавт., 2013). Таким образом, впервые был описан новый тип плазмид биодegradации капролактама, в составе которых содержится второй катаболический оперон, детерминирующий

утилизацию салицилата – центрального метаболита окисления многих ароматических соединений. Недавно коллекция лаборатории пополнилась новыми уникальными штаммами *Pseudomonas*, способными утилизировать одновременно капролактамы, толуол и *мета*-ксилол.

Целью данной работы было изучение генетического контроля деградации капролактама, толуола и *мета*-ксилола в качестве единственных источников углерода и энергии у штамма *P. putida* СТЗ, выделенного из городских очистных сооружений.

Штамм *P. putida* СТЗ был выделен методом накопительной культуры из активного ила очистных сооружений г. Пушкино (Московская область, Россия). При выделении бактерий использовали минеральную среду М9 (Sambrook et al., 1989) с КАП (1.0 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Далее чистые культуры деструкторов КАП проверяли на способность к росту в среде М9, содержащей тот или иной субстрат в качестве единственного источника углерода и энергии. Использовали следующие соединения: нафталин, салицилат, производные бензола (бензол, толуол, этилбензол, фенол, *мета*-, *пара*-, *орто*-ксилол), *n*-алканы (гексан, октан, нонан, додекан, гексадекан). Бактерии культивировали при 28°C.

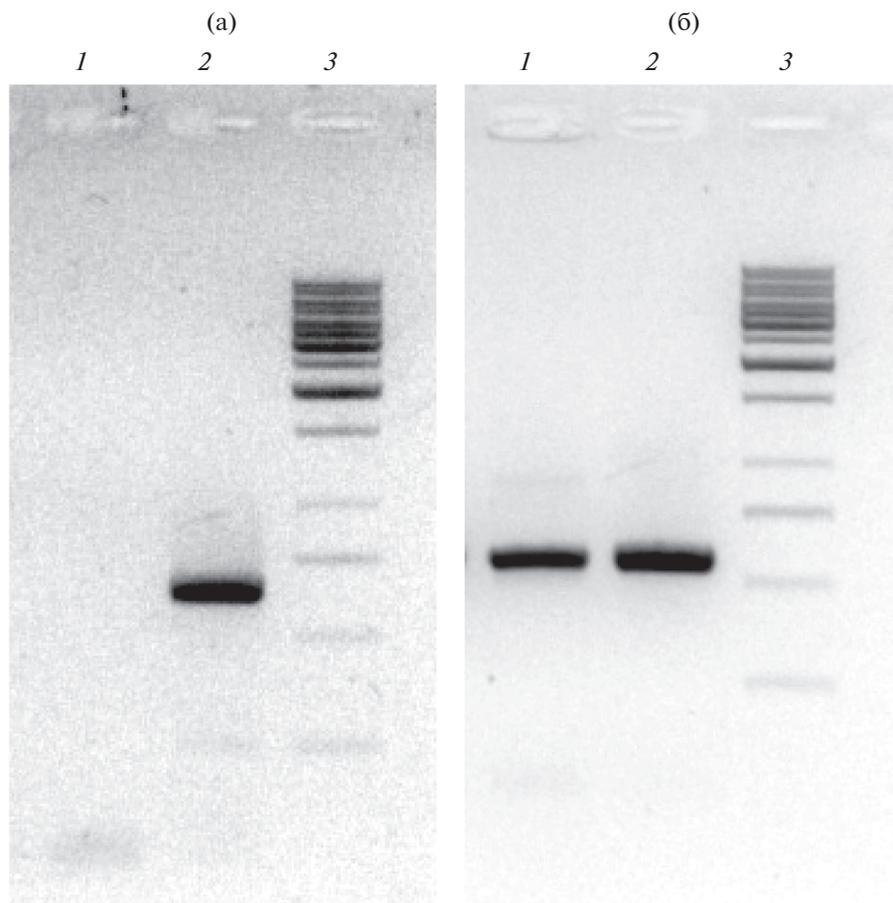
Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование гена 16S рРНК, филогенетический и ПЦР-анализ целевых генов осуществляли общепринятыми методами (Sambrook et al., 1989).

В результате изучения спектра утилизируемых субстратов у выделенных бактерий-деструкторов для дальнейших исследований был отобран штамм СТЗ, обладающий уникальной способностью утилизировать не только КАП, но также толуол и *мета*-ксилол. Секвенирование гена 16S рРНК изолята (1407 п.н.) и филогенетический анализ полученной последовательности выявил его принадлежность к виду *Pseudomonas putida*. Уровень сходства гена 16S рРНК с соответствующей последовательностью типового штамма *P. putida* DSM 291 составил 100%. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма *P. putida* СТЗ длиной 1407 п.н. помещена в GenBank под номером MN553084.

Как было сказано выше, деградация КАП у бактерий *Pseudomonas* контролируется САР плазмидами. Известно о существовании единственного пути разложения КАП (Negoro, 2002). Что касается толуола (метилбензол, ТОЛ), то описано пять возможных путей расщепления ксенобиотика микроорганизмами (Сао et al., 2009). Наиболее характерными для флуоресцирующих псевдомонад, к которым относятся штаммы *P. putida*, в том числе, и выделенный нами штамм СТЗ, являются два пути разложения толуола: ТОЛ-путь, на на-

чальных этапах которого происходит окисление боковой метильной группы под действием фермента толуолмонооксигеназы, и TOD-путь, у которого трансформация толуола начинается с дигидроксилирования ароматического кольца толуолдиоксигеназой (Хоменков и соавт., 2008; Сао et al., 2009). По этой причине у исследуемого штамма был проведен ПЦР-анализ ключевых генов *xylM* (ТОЛ-путь) и *todC1* (TOD-путь), кодирующих синтез толуолмонооксигеназы и толуолдиоксигеназы соответственно. Для амплификации данных генов были использованы разработанные ранее праймеры: для *xylM* F 5'-ACC AAA GAG GCG GAA TAA GC-3' и R 5'-TGT TTT ATG GTG ATC CGA ACC-3' (ожидаемый ПРЦ-продукт размером 570 пар нуклеотидов); для *todC1* F 5'-AAT CAG ACC GAC ACA TCA CC-3' и R 5'-TCC AGT TAC AGG GAA TGA CC-3' (ожидаемый ПРЦ-продукт размером 625 пар нуклеотидов) (Sokolov et al., 2002). В качестве положительного контроля использовали штамм *P. putida* TOL25, осуществляющий разложение толуола по TOD-пути, и *P. putida* TOL8 – по ТОЛ-пути. В результате амплификации целевых генов ПЦР-продукт был получен только для *xylM*. Размер полученного ампликона соответствовал ожидаемому и составлял 570 п.н. (рис. 1б). Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что выделенный нами штамм *P. putida* СТЗ окисляет толуол по ТОЛ-пути.

Важно отметить, что разложение толуола по ТОЛ-пути у бактерий детерминируется, как правило, плазмидами биodeградации, так называемыми ТОЛ плазмидами. Наиболее изученной из них является плаزمида рWWO (117 т.п.н.), обнаруженная в штамме *P. putida* mt-2, который утилизирует толуол, *мета*- и *пара*-ксилол в качестве единственных источников углерода и энергии. Данная плазмида кодирует ферменты полного пути деградации толуола и ксилолов, в том числе, ключевые ферменты толуолмонооксигеназу и катехол-2,3-диоксигеназу. В настоящее время показано широкое распространение рWWO-подобных и других ТОЛ плазмид среди штаммов псевдомонад-деструкторов толуола (Sentchilo et al., 2000). Таким образом, наличие у штамма СТЗ гена *xylM*, кодирующего синтез толуолмонооксигеназы, является косвенным свидетельством плазмидной локализации генов деградации толуола. Принимая во внимание также тот факт, до сих пор не было описано ни одного бесплазмидного штамма *Pseudomonas*-деструктора КАП, мы предположили, что выделенная нами бактерия содержит плазмиду, детерминирующую деградацию как капролактама, так и толуола и *мета*-ксилола. В то же время, нельзя было исключить присутствия у данной бактерии двух катаболических плазмид, одна из которых контролирует разложение капролактама, а другая – толуола и *мета*-ксилола.

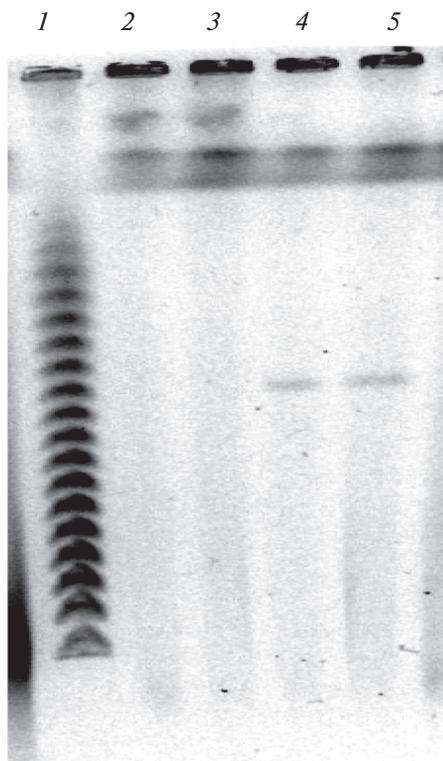


**Рис. 1.** ПЦР-анализ генов, кодирующих толуолдиоксигеназу *todC1* (а) и толуолмонооксигеназу *xyfM* (б), у штамма *P. putida* СТЗ. (а): 1 – *P. putida* СТЗ; 2 – *P. putida* TOL25; 3 – ДНК-маркер 1 т.п.н. (“Fermentas”, Литва); (б): 1 – *P. putida* СТЗ; 2 – *P. putida* TOL8; 3 – ДНК-маркер 1 т.п.н. (“Fermentas”, Литва).

Для выявления плазмидной ДНК у *P. putida* СТЗ был применен метод пульс-электрофореза геномной ДНК. Было установлено, что штамм СТЗ содержит мегаплазмиду размером около 550 т.п.н. (рис. 2). Для того чтобы подтвердить плазмидную детерминацию признаков деградации КАП и/или ТОЛ был осуществлен конъюгационный перенос плазмиды в бесплазмидный реципиентный штамм *P. putida* KT2442 (*gfp*,  $Km^r$ ,  $Rif^r$ ) методом Дана и Гонзалеса (Dunn, Gunsalus, 1973). Селекцию трансконъюгантов проводили на минеральной среде с капролактамом или толуолом в качестве единственного источника углерода и энергии. В результате проведенных экспериментов колонии трансконъюгантов были получены только на среде с КАП, при этом они не утилизировали толуол и *meta*-ксилол. Многократные попытки получить трансконъюганты на среде с толуолом не увенчались успехом. Дальнейший анализ  $SAR^+$  трансконъюгантов показал присутствие в них плазмидной ДНК, по размеру идентичной плазмиде, содержащейся в донорном штамме СТЗ (рис. 2). Следовательно, можно считать дока-

занным тот факт, что способность штамма СТЗ утилизировать КАП в качестве единственного источника углерода и энергии контролируется плазмидными генами. Что касается генов, детерминирующих разложение толуола и *meta*-ксилола, то, по всей вероятности, они локализованы на хромосоме.

Таким образом, в данном исследовании впервые выделен штамм *P. putida* СТЗ, обладающий уникальной способностью к одновременной деградации токсичных ксенобиотиков  $\epsilon$ -капролактама, толуола и *meta*-ксилола, гены деградации капролактама у которого локализованы на конъюгативной мегаплазмиде. Уникальность штамма *P. putida* СТЗ заключается также в том, что гены, ответственные за окисление толуола и *meta*-ксилола по ТОЛ-пути, которые, по всей видимости, локализованы у исследуемого штамма на хромосоме, до сих пор были описаны только в составе ТОЛ плазмид. В настоящее время проводится дальнейшее изучение генетических систем деградации капролактама и толуола у штамма *P. putida* СТЗ.



**Рис. 2.** Электрофореграмма плазмидной ДНК штаммов *P. putida* CT3 и KT2442(CAP): 1 – Lambda Ladder PFG Marker (New England, “BioLabs”); 2, 3 – бесплазмидный реципиентный штамм *P. putida* KT2442; 4 – исходный штамм-деструктор *P. putida* CT3; 5 – трансконъюгантный штамм *P. putida* KT2442(CAP).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Есикова Т.З., Волкова О.В., Таран С.А., Боронин А.М. Ключевая роль *dca*-генов в катаболизме *epsilon*-капролактама у бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 616–619.

Esikova T.Z., Volkova O.V., Taran S.A., Boronin A.M. Key role of the *dca* genes in  $\epsilon$ -caprolactam catabolism in *Pseudomonas* strains // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 726–729.

Панов А.В., Волкова О.В., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Кошелева И.А., Боронин А.М. *scpA* – новый ген салицилатгидроксилазы, локализованный на плазидах деградации салицилата/капролактама // Молекулярная биология. Т. 47. С. 116–123.

Panov A.V., Volkova O.V., Puntus I.F., Esikova T.Z., Kosheleva I.A., Boronin A.M. *scpA*, a new salicylate hydroxylase gene localized in salicylate/caprolactam degradation plasmids // Mol. Biol. (Moscow). 2013. V. 47. P. 105–111.

Хоменков В.Г., Шевелев А.Б., Жуков В.Г., Загустина Н.А., Безбородов А.М., Попов В.О. Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биodeградации ксенобиотиков у микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. С. 133–152.

Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. P. 117–135.

Cao B., Nagarajan K., Loh K.C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 85. P. 207–228.

Dunn H.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmids coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. 1973. V. 114. P. 974–979.

Esikova T.Z., Ponamoreva O.N., Baskunov B.P., Taran S.A., Boronin A.M. Transformation of low-molecular linear caprolactam oligomers by caprolactam-degrading bacteria // JCTB. 2012. V. 87. P. 1284–1290.

Negoro S. Biodegradation of nylon and other synthetic polyamides // Biopolymers. 2002. V. 9. P. 395–415.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.

Sentchilo V.S., Perebituk A.N., Zehnder A.J.B., Meer J. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated

ed from different contaminated sites in Belarus // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2842–2852.  
*Shintani M., Takahashi Y., Yamane H., Nojiri H.* The behavior and significance of degradative plasmids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms // Microbes Environ. 2010. V. 25. P. 253–265.  
*Smalla K., Jechalke S., Top E.M.* Plasmid detection, characterization and ecology // Microbiol. Spectr. 2015. V. 3 (1).

PLAS-0038-2014.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>

*Sokolov S., Gafarov A., Esikova T., Boronin A.* Diversity of BTEX-degrading *Pseudomonas* isolated from different regions of Russia // 12th Int. Biodeterioration and Biodegradation Symp. (Biosorption and Bioremediation III). Czech Republic, Prague, 2002. P. 65.

## Genetic Control of Degradation of *Epsilon*-Caprolactam, Toluene, and *meta*-Xylene in *Pseudomonas putida* Strain CT3

T. Z. Esikova<sup>1</sup>, \*, A. B. Gafarov<sup>1</sup>, and T. O. Anokhina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

\*e-mail: [das3534@rambler.ru](mailto:das3534@rambler.ru)

Received July 26, 2019; revised October 23, 2019; accepted November 1, 2019

**Abstract**—A bacterial strain CT3 with a unique ability to degrade anthropogenic toxic compounds  $\epsilon$ -caprolactam, toluene, and *meta*-xylene as sole sources of carbon and energy was isolated from the activated sludge of a municipal wastewater treatment plant. Based on sequencing and phylogenetic analysis of its 16S rRNA gene, the isolate was identified as a *Pseudomonas putida* strain. *P. putida* strain CT3 was found to possess a conjugative megaplasmid (~550 kb) responsible for  $\epsilon$ -caprolactam degradation to the TCA cycle intermediates. The genes encoding toluene and *meta*-xylene oxidation via the TOL pathway are localized on the chromosome.

**Keywords:**  $\epsilon$ -caprolactam, toluene, *meta*-xylene, biodegradation, biodegradation plasmids, catabolic genes