

Штаммоспецифичность биохимических и физиологических параметров утилизации глифосата у бактерий рода *Achromobacter*

Свиридов А.В., Эпиктетов Д.О., Тарлачков С.В., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН;
alhummen@rambler.ru

По современным данным, фосфор – макроэлемент, необходимый для функционирования всех живых систем – может включаться в биологический круговорот не только в виде фосфатов, но и в любой степени окисления. Среди восстановленных соединений фосфора наиболее важную роль играют органофосфонаты (ОФ), содержащие прямую связь С–P³⁺, устойчивую к гидролизу и действию фосфатаз. Природные ОФ могут замещать фосфаты как структурные компоненты клетки, использоваться для запасаания фосфора, выступать биологически активными вторичными метаболитами. Синтетические ОФ применяются как пестициды и хелатирующие агенты. Наиболее распространен глифосат (N-фосфонометилглицин, ГФ) – неселективный гербицид, ингибирующий синтез ароматических аминокислот. Объемы применения синтетических ОФ превышают 1 млн. тонн в год, не менее 800 тыс. тонн составляет ГФ. С бесконтрольным поступлением ОФ в окружающую среду связаны серьезные экологические риски, являющиеся предметом активных дискуссий. Проблема трансформации и деградации ОФ в природе весьма актуальна с практической и фундаментальной точек зрения.

Основной вклад в биодеструкцию ОФ вносят бактерии, обладающие ферментными системами, расщепляющими С–P связь (С–P лиаза, фосфонатаза и др.). До 40% расшифрованных бактериальных геномов содержат цистроны, кодирующие такие ферменты. Однако способность утилизировать ГФ как источник фосфора описана лишь у отдельных изолятов. Исследований взаимосвязи между наличием такой способности и систематическим положением микроорганизма не проводились; также не выяснен вопрос о генетических детерминантах, обеспечивающих возможность утилизации ГФ у прокариот.

Методика, позволяющая связать эффективность потребления ГФ с доступными для экспресс-анализа генетическими признаками бактерий, значительно упростила бы поиск перспективных деструкторов гербицида и интерпретацию данных метагеномных исследований сред, загрязненных ГФ. Изучение возможности решения данной задачи на примере деструкторов ГФ рода *Achromobacter* с помощью методов генетического типирования стало целью настоящей работы.

В лабораторной коллекции было отобрано 6 наиболее эффективных деструкторов ГФ рода *Achromobacter*, выделенных из загрязненных ОФ почв (Табл. 1) и лабораторный штамм, полученный при многократных пассажах *A. aegrifaciens* Km 11 на селективных средах с ГФ. Новый штамм, обозначенный как *A. aegrifaciens* Km 11А, отличался от дикого типа физиологическими и биохимическими характеристиками (Табл. 1).

Для таксономического определения бактерий и выявления степени их родства проводился анализ гена нуклеотидредуктазы *NrdA*. Из литературы известно, что секвенирование участка гена длиной 765 п.н. (локус *NrdA_765*) позволяет достоверно определять не только видовую принадлежность бактерий рода *Achromobacter*, но и выявлять устойчивые геногруппы внутри одного вида. Проводилась ПЦР с геномной ДНК деструкторов ГФ с праймерами 5' GAACTGGATTCCCGACCTGTTC 3' (*NrdA_F*) и 5' TTCGATTTGACGTACAAGTTCTGG 3' (*NrdA_R*), продукт ПЦР длиной 954 п.н. секвенировался ЗАО «Евроген», полученные нуклеотидные последовательности анализировались с помощью базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Также применялся метод геномных фингерпринтов с ПЦР повторяющихся палиндромных элементов (Rep-ПЦР) с праймером BOX-A1R 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3' с

разделением амплифицированных фрагментов электрофорезом в агарозном геле и типированием штаммов по количеству и длине выявленных ампликонов.

Табл. 1. Физиологические и биохимические параметры утилизации ГФ у различных геногрупп *Achromobacter*

Штамм	Регион выделения/ОФ в почве	Потребность в адаптации к ГФ, результат	Максимальная биомасса, г/л,	Удельная деструкция ГФ, мг/г биомассы	Аллель NrdA_765	Группа по геномному фингерпринту	Биохимические особенности утилизации ГФ
<i>Achromobacter aegrifaciens</i> Km 11	Краснодар/ГФ	Требовалась, сокращение лаг-фазы	0,7±0,2	97±8	69	Нет данных	Нет
<i>A. aegrifaciens</i> Km 11A	Лаборатория/ГФ	Не требовалась	1,1±0,1	111±5	69	Нет данных	Экспрессия двух изоформ фосфонатазы на средах с ГФ
<i>A. insolitus</i> Kg 13	Краснодар/ГФ	Не требовалась	2,1±0,4	59±3	6	1	Нет
<i>A. aegrifaciens</i> Kg 16	Краснодар/ГФ	Не требовалась	1,2±0,1	71±6	280	4	Наличие ГФ-ацетилтрансферазы
<i>A. insolitus</i> Kg 19	Краснодар/ГФ	Не требовалась	1,6±0,2	74±9	9	Нет данных	Экспрессия двух изоформ фосфонатазы на средах с ГФ
<i>A. aegrifaciens</i> Km 102	Краснодар/ГФ	Требовалась, увеличение биомассы, сокращение лаг-фазы	1,6±0,1 (0,2±0,05 до адаптации к ГФ)	57±4	280	4	Две С–Р лиазы, специфичные либо к МФК либо к ГФ
<i>A. aegrifaciens</i> Sm 51	Шиханы/МФК	Требовалась, увеличение биомассы, сокращение лаг-фазы	2,3±0,4 (0,2±0,1 до адаптации к ГФ)	50±4	100	3	Две С–Р лиазы, специфичные либо к МФК либо к ГФ

Результаты верифицировались с помощью ДНК-ДНК гибридизации *in silico* полногеномных нуклеотидных последовательностей и определения показателя ANI (Average Nucleotide Identity). NGS-секвенирование *de novo* проводилось ООО «Ридсенс» с помощью прибора Illumina MiSeq.

Показано, что биохимические параметры утилизации ГФ у исследованных штаммов носят штаммоспецифичный характер и не связаны с принадлежностью к определенному виду или геногруппе внутри вида. *A. aegrifaciens* Km 102 и *A. aegrifaciens* Sm 51 выделены в двух географически отдаленных регионах под селективным давлением разных ОФ, принадлежат к разным группам по локусу NrdA_765 и геномному фингерпринту. Однако они практически идентичны по ростовым характеристикам на средах с ГФ, по особенностям адаптации исходных изолятов к потреблению гербицида, а также по наличию у них двух независимо индуцирующихся С–Р лиазных систем. Напротив, *A. aegrifaciens* Kg 16, принадлежащий к тем же группам, что и *A. aegrifaciens* Km 102, экспрессирует не ГФ-специфичную С–Р лиазу, а новую ГФ-ацетилтрансферазу и не способен к длительному

потреблению гербицида как источника фосфора. *A. aegrifaciens* Km 11 и отделившийся от него в результате спонтанной диссоциации *A. aegrifaciens* Km 11A (практически идентичный родительскому штамму по показателю ANI) имеют не только отличающиеся ростовые параметры, но и разный набор ферментов деструкции ОФ: у штамма Km 11A впервые показано наличие двух изоформ фосфонатазы. Также две изоформы фермента обнаружены нами у представителя другого вида – *A. insolitus* Kg 19, что отличало его от *A. insolitus* Kg 13.

Таким образом, широко применяемые для *Achromobacter* и родственных родов методики типирования и оценки патогенности не позволяют проводить отбор потенциально эффективных деструкторов ГФ с заданными биохимическими параметрами. Решение этой задачи потребует углубленного анализа геномов изучаемых бактерий и выявления участков, определяющих возможность утилизации гербицида конкретным штаммом, и оценки возможности использования этих участков для типирования деструкторов ГФ.

Работа проводилась при поддержке РНФ (проект 18-74-0021).