

Ing. Hana Stiborová: Bakteriální degradace chlorbenzoových kyselin
Školitel: Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.
Studijní program: Mikrobiologie
Studijní obor: Mikrobiologie
Datum obhajoby: 21.2.2001

SOUHRN

Práce dokumentuje izolaci, charakterizaci a identifikaci kmenů degradujících chlorbenzoátů, které jsou konečnými intermediáty degradace polychlorovaných bifenyků v přírodě. Vzhledem k poměrně nízké substrátové specifitě dříve izolovaných kmenů A7, A8, A18 a A19 (isolované v roce 1996 – Žamberk), byly ze znečištěné oblasti polychlorovanými bifenyky uvnitř výrobního závodu Colorlak a.s. v Uherském Hradišti izolovány čtyři gramnegativní bakteriální isoláty UH133, UH222, UH1411 a UH1613 a jeden grampozitivní bakteriální kmen UH82.

Nově izolované bakteriální kmeny byly spolu s kmeny A7, A8, A18 a A19, které byly dříve zařazeny podle svých biochemických vlastností do rodu *Pseudomonas*, identifikovány přesněji a specifitěji genotypovou analýzou. Na základě výsledků sekvenční analýzy 16S rDNA byly kmeny A7, A8, A18 a A19 překlasičovány do rodu *Alcaligenes*, nově izolované kmeny UH133, UH222, UH1411 a UH1613 byly zařazeny do rodu *Pandoraea* a grampozitivní isolát UH82 do rodu *Arthrobacter*.

U vybraného isolátu (*Alcaligenes* sp. A7) byly sledovány rozdíly ve složení membrány při změně živného media za minimální medium s 2,5-dichlorbenzoovou kyselinou a bylo potvrzeno obecně platné pravidlo, že fluidita membrány je z větší míry závislá na poměrném zastoupení mastných kyselin, než na svých polárních složkách (fosfolipidech).

U nových isolátů byla popsána jejich substrátová specifita degradace a studiem meziproductů odbourávání chlorbenzoových kyselin bylo zjištěno, že kmeny rodu *Pandoraea* mají schopnost degradovat 2-CB, 3-CB, 2,3-DCB a 2,5-DCB klasickou modifikovanou *ortho* metabolickou dráhou, kdy enzym *ortho*-halobenzoátdioxygenasa specificky atakuje chlorbenzoové kyseliny v pozici 1 a 2. Kmen *Arthrobacter* sp. UH82 degraduje pouze 4-chlorbenzoát a to počáteční dehalogenací za vzniku 4-hydroxybenzoátu, který je oxidován na protokatechát a ten je štěpen v *meta* pozici.

K bližší charakterizaci degradačních vlastností byla u kmenů rodu *Alcaligenes* (2-CB a 2,5-DCB) a kmenů rodu *Pandoraea* (2-CB, 3-CB, 2,3-DCB a 2,5-DCB) studována lokalizace genů zodpovědných za degradaci chlorbenzoových kyselin. Bylo zjištěno, že u kmenů rodu *Alcaligenes* jsou tyto geny umístěny na plasmidové DNA o velikosti 80 kpb. Při kultivaci v živném mediu dochází ke ztrátě plasmidu, a tím i schopnosti asimilace CB. U kmenů rodu *Pandoraea* se nepodařilo získat mutantní kmen neschopný degradace CB a rovněž se nepodařilo detekovat plasmidovou DNA. Degradace je tedy u těchto kmenů velmi stabilní a je pravděpodobné, že geny zodpovědné za degradaci jsou lokalizovány na chromosomu.

U nových isolátů rodu *Pandoraea* byly charakterizovány první tři enzymy degradační dráhy chlorbenzoátů (*ortho*-halobenzoátdioxygenasa (OHBD), chlorkatechol-1,2-dioxygenasa a mukonátcykloisomerasa) s cílem jejich fylogenetického srovnání s enzymy popsanými u jiných bakteriálních kmenů. Southern hybridizace se dvěma sondami (reduktasa, α -podjednotka) multienzymového komplexu OHBD kmene *Pseudomonas aeruginosa* JB2

degradujícího CB potvrdila vysoký stupeň homologie mezi oběma enzymovými komplexy, a tím i s OHBD kmenů rodu *Alcaligenes*, jejichž homologie s kmenem JB2 byla potvrzena již dříve. Naopak geny kódující chlorokatechol-1,2-dioxygenasu a chlormukonátcykloisomerasu jsou u kmenů rodu *Pandoraea* na základě sekvenční analýzy fylogeneticky blíže k těmto genům kmenů *Pseudomonas chlororaphis* RW71 a *Pseudomonas* sp. P51 degradujících chlorbenzeny a kmene *Ralstonia eutropha* NH9 degradující 3-CB, zatímco s kmenem *Pseudomonas aeruginosa* JB2 sdílí pouze 72% sekvenční homologie.

Klíčová slova: Bakteriální degradace, chlorbenzoové kyseliny, metabolické dráhy, *ortho*-halobenzoátdioxygenasa, chlorkatechol-1,2-dioxygenasa, chlormukonát-cykloisomerasa

Ing. Hana Stiborová: **Bacterial degradation of chlorbenzoic acids**
Supervisor: **Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.**
Study programme: **Microbiology**
Study subprogramme: **Microbiology**
Date of defence: **21.2.2001**

SUMMARY

This PhD. thesis describes the isolation, characterization and identification of bacterial isolates that are capable of chlorobenzoate (CB) degradation. These compounds are intermediates of polychlorinated biphenyls (PCB) biodegradation metabolic pathway in nature. Due to the low range of substrate specificity of formerly isolated strains (A7, A8, A18 and A19), new bacterial strains were obtained from PCB polluted area within the plant Colorlak, Ltd. (Uherské Hradiště, Czech Republic). Four of them (UH133, UH222, UH1411 and UH1613) were found to be Gram-negative and the only one was characterized as a Gram-positive strain (UH82).

Newly isolated strains together with the strains A7, A8, A18 and A19 that have been previously classified according their biochemical properties as the strains of the genus *Pseudomonas*, were precisely genotypically characterized. In spite of 16S rDNA analysis the strains A7, A8, A18 and A19 were reclassified into the genus *Alcaligenes*. Gram-negative strains UH133, UH222, UH1411 and UH1613 were placed into the genus *Pandoraea*, Gram-positive isolate UH82 was classified as being the strain of the genus *Arthrobacter*.

For the precise characterization of biodegradation capabilities of *Alcaligenes* and *Pandoraea* strains, localisation of the genes responsible for chlorobenzoate degradation was performed. These genes are in the case of the strains belonging into the genus *Alcaligenes* localised on plasmid. The size of the plasmids was determined by agarose gel electrophoresis to be around 80 kbp. During the cultivation of these strains on nutrient rich medium, the plasmids were cured. This was accompanied with the loss of their biodegradation ability. On the other hand, at the strains belonging into the genus *Pandoraea* no plasmid was detected and also no mutant strains without the ability to degrade chlorobenzoates were found. The stability of this capability at *Pandoraea* strains leads into the conclusion that the genes are localized on the chromosome.

Consequently, newly isolated strains of the genus *Pandoraea* were characterized in terms of their three enzymes of degradation pathway for chlorobenzoates – *ortho*-chlorobenzoate dioxygenase, chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chloromuconate cycloisomerase. Phylogenetic comparison performed by Southern hybridization with two DNA probes (reductase, α -subunit) of the multienzyme complex of OHBD of *Pseudomonas aeruginosa* JB2 and DNA isolated from newly isolated strains showed high level of homology. Multienzyme complex OHBD of *Pandoraea* strains is thus similar to the reference strain *P.aeruginosa* JB2. Its similarity to *Alcaligenes* strains A7, A8, A18 and A19 has already been described. Contrary, the genes for chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chloromuconate cycloisomerase show closer similarity to the genes of chlorobenzene degraders *Pseudomonas chlororaphis* RW71 and *Pseudomonas* sp. P51 and 3-chlorobenzoate degrader *Ralstonia eutropha* NH9, since their similarity to *Pseudomonas aeruginosa* JB2 genes was only 72%.

Keywords: Bacterial degradation, chlorobenzoic acid, degradation pathways, *ortho*-halobenzoate dioxygenase, chlorocatechol 1,2-dioxygenase, chlormukonate cykloisomerase