

Д.С. Сергиевич, асп., магистр биол. наук;
Н.А. Беясова, доц., канд. биол. наук;
А.М. Шимкевич, ст. преп., канд. биол. наук;
(БГТУ, г. Минск)

СПОСОБ СКРИНИНГА ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ДЕГРАДИРУЮЩИХ ПОЛИЛАКТИД

В последнее время все больше внимание многих ученых приковано к проблеме накопления в окружающей среде полимерных отходов. Одним из наиболее перспективных методов снижения экологической нагрузки с сохранением всех преимуществ, применения традиционных синтетических полимерных материалов – создание биоразлагаемых полимеров, имеющих в основе структуру, схожую с природными материалами. Одним из наиболее популярных биоразлагаемых полимеров является полилактид, синтезируемый биотехнологическим способом из молочной кислоты.

Ежегодно промышленное производство полилактидов стремительно возрастает. Однако, различные исследования биоразложения, проводимые при их захоронении в почве таких полимеров, как полигидроксибутират (PHB), поликапролактон (PCL), полибутилен сукцинат (PBS) и полилактид (PLA), свидетельствуют не в пользу полилактидов. Установлено, что степень биodeградации в условиях эксперимента уменьшается в порядке: PHB = PCL > PBS > PLA. Эти результаты показывают, что PLA-деградирующие микроорганизмы не являются широко распространёнными в природной среде. По этой причине важно создать способ, позволяющий эффективно и быстро проводить скрининг бактерий, способных к активной деградации полилактида.

Известно, что отбор бактерий, деградирующих полилактид, общепринятыми микробиологическими методами является сложной и длительной задачей. Поэтому выявление высококонсервативных мотивов в участках бактериальных генов, обуславливающих деградацию полимерных материалов, может создать предпосылки для качественного и быстрого поиска и изучения практически ценных бактериальных штаммов.

В настоящем исследовании мы провели поиск специфичных высококонсервативных участков ДНК, отличающих геномы бактерий, способных к деградации полилактида. Для этого использовали сведения о нуклеотидных последовательностях геномов, депонированных в базу данных NCBI GenBank. В результате поиска, в геноме актинобактерий

Amycolatopsis orientalis (EU334748.1) выявлена нуклеотидная последовательность гена (PLAase 2), отвечающего за деградацию полилактоида.

Сопоставив нуклеотидную последовательность гена PLAase 2 с известными бактериальными нуклеотидными последовательностями, депонированными в базе данных NCBI GenBank, установлены консервативные области в последовательностях генов, отвечающих за синтез трипсино-подобных сериновых протеаз.

Найденные консервативные участки в генах бактериальных протеаз использовали для подбора олигонуклеотидных праймеров, предназначенных для скрининга бактерий, способных к деградации полилактоида. Подобранные последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице.

Таблица - Олигонуклеотидные праймеры к генам PLA-деполимераз актинобактерий

Название праймера	Направление	Последовательность олигонуклеотидных праймеров	Длина продукта п.н.
<i>PLAase 3</i>	<i>Прямой</i>	<i>5'-GTCACCGCGAAGCACTGT-3'</i>	407
	<i>Обратный</i>	<i>5'-ACACCGTTGACCTGCTTGAT-3'</i>	

Используя подобранные олигонуклеотидные праймеры, провели скрининг коллекционных штаммов почвенных бактерий, обладающих потенциальной способностью деградировать полилактоид.

В результате, наличие продуктов амплификации искомой величины, образованных в процессе ПЦР-анализа тотальной ДНК коллекционных бактерий, подтвердило правомерность использования подобранных праймеров для поиска бактерий, деградирующих полилактоид.

Используя подобранные синтетические олигонуклеотиды, проанализированно 36 коллекционных бактериальных штаммов, в том числе 3 штамма актиномицетов. Искомые продукты амплификации обнаружены только у актиномицетов, при этом не зафиксировано ни одного случая случайного отжига олигонуклеотидных праймеров.

Таким образом, подобранные праймеры, могут стать основой для разработки тест-системы, позволяющей осуществлять первичный скрининг бактерий, деградирующих полилактоид.