

## БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК: ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И АНАЛИЗ *benA*-ГЕНОВ

© 2022 г. А. А. Пьянкова<sup>а</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

\*e-mail: peg@iegm.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 07.09.2021 г.

Проведен скрининг 124 штаммов семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*), выделенных из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС), на способность использовать бензойную кислоту (БК) в качестве единственного источника углерода и энергии. Активный рост на БК демонстрировали 28 штаммов рода *Halomonas*, близкородственным видам *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, *H. sulfidaeris*, в присутствии 30–70 г/л NaCl в среде культивирования. Штаммы родов *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria* не росли на БК или осуществляли трансформацию БК (2 штамма рода *Chromohalobacter*). ПЦР-скрининг на наличие у исследуемых бактерий семейства *Halomonadaceae* гена *benA*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы (1,2-ДО) – ключевого фермента деструкции БК, показал присутствие гена во всех штаммах-деструкторах БК рода *Halomonas*. Установлено, что нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов имели наибольшее сходство, не превышающее 95.50%, с генами  $\alpha$ -субъединиц бензоат 1,2-ДО, 2-хлорбензоат 1,2-ДО и других диоксигеназ с кластером Риска [2Fe-2S], галофильных бактерий рода *Halomonas*. Новые данные о генетических системах, контролирующих разложение БК, бактерий рода *Halomonas* представляют интерес для понимания молекулярных механизмов деструкции ароматических соединений в условиях засоления, а выявленные активные штаммы-деструкторы БК могут быть использованы при разработке технологий восстановления и мониторинга загрязненных почв.

**Ключевые слова:** бактерии-деструкторы, бензойная кислота, *benA*, *Halomonadaceae*

DOI: 10.31857/S0026365622010104

Бактерии семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*) являются грамотрицательными, слабо- или умеренно-галофильными, неспорообразующими, аэробными микроорганизмами. Представители семейства, включающего 14 родов, широко распространены в засоленных экосистемах, таких как соленые озера, засоленная почва, солончаки, морской лед, морепродукты, морские беспозвоночные, сточные воды, морская вода и гидротермальные источники (de la Haba et al., 2014). Повышенный интерес к изучению бактерий семейства *Halomonadaceae* вызван тем, что они способны синтезировать осмопротекторы (эктоин, глицин бетаин и гидроксиэктоин), биополимеры (экзополисахариды и полигидроксисилканоат), биосурфактанты, а также осуществлять разложение ароматических соединений (García et al., 2005; de la Haba et al., 2014; Monzón et al., 2018). Такие бактерии перспективны для использования в биотех-

нологических целях, в частности, для очистки засоленных почв и водоемов от токсичных органических поллютантов. Имеется большое количество публикаций о деградации ароматических соединений (АС) представителями семейства *Halomonadaceae* индивидуально или в составе ассоциаций (Le Borgne et al., 2008; Fathepure, 2014). Одним из промежуточных продуктов окислительного катаболизма многих АС, в том числе являющихся загрязнителями окружающей среды (фенола, толуола, бифенила, фталатов и других), у бактерий является бензойная кислота (БК) (Moreno et al., 2011; Li et al., 2013). Накопление БК в окружающей среде также связано с метаболической активностью растений, антропогенной деятельностью, поскольку БК и ее производные служат сырьем для получения целого спектра химических соединений, применяются при консервировании пищевых продуктов, в медицине и парфюмерной промышленности

(García et al., 2005; Le Borgne, 2008; Li et al., 2013). Среди бактерий семейства *Halomonadaceae* способность к разложению БК описана для *H. halodurans* ATCC 29686<sup>T</sup> (Rosenberg, 1983), *H. organivorans* CECT 5995<sup>T</sup> (Moreno et al., 2011), *H. elongata* A15.6, *H. eurihalina* A17.6, A25.2 (García et al., 2005), *H. campisalis* ATCC 700597<sup>T</sup> (Oie et al., 2007), *Halomonas* sp. KHS3 (Monzón et al., 2018), *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> (Csonka et al., 2005), *Chromohalobacter* sp. HS-2 (Kim et al., 2008). Однако информация об особенностях строения и функционирования генетических систем, а также путях метаболизма, обеспечивающих деструкцию ароматических соединений в условиях засоления, у этой группы микроорганизмов крайне ограничена (Fatherine, 2014).

Метаболический путь разложения бензойной кислоты, который наиболее часто встречается у прокариот, начинается с внедрения гидроксигрупп в химически стабильное ароматическое кольцо молекулы под действием бензоат 1,2-диоксигеназы (EC 1.14.12.10) и дигидродигидроксibenзоат дегидрогеназы (EC 1.3.1.25) с образованием дигидроксibenзоата (катехола) (<https://www.genome.jp/pathway/map00362+C00180>). Показано, что субстратная специфичность обуславливается  $\alpha$ -субъединицей бензоат 1,2-ДО (Parales, Resnick, 2006), поэтому ген *benA*, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу этого фермента, часто используется в качестве генетического маркера, предполагающего возможность индукции в бактериальных клетках бензоат 1,2-ДО.

Ранее из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниево-солей (ВМКМС), характеризующегося высоким уровнем засоления и присутствием различных органических поллютантов (в том числе, моно- и полиАС) (Бачурин, Одинцова, 2009), были выделены индивидуальные бактерии семейства *Halomonadaceae* и ассоциации, в составе которых присутствовали представители этого семейства (Ананьина и соавт., 2005; Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Пьянкова и соавт., 2020). Ряд штаммов рода *Halomonas* был способен расти на нафталине, орто-фталевой, протокатеховой, гентизиновой и бензойной кислотах в качестве единственного источника углерода и энергии (Ястребова и соавт., 2019).

Цель настоящей работы — характеристика бактерий-деструкторов БК семейства *Halomonadaceae*, выделенных из различных экотопов района промышленных разработок ВМКМС, и описание разнообразия ключевых генов деструкции БК (*benA*) у исследуемых галофильных штаммов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Образцы для исследований.** В работе использованы бактерии семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Kushneria*, *Salinicola*) из рабочей коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем ИЭГМ УрО РАН. Бактериальные штаммы были выделены из различных образцов, отобранных в районе солеразработок ВМКМС (г. Соликамск, г. Березники, Пермский край): ризосферы растений, почвы, грунта, глинистых донных отложений рассоловодящей выработки рудника, отходов производства (шламохранилища, солеотвалы), рассоло-сборников (Ананьина и соавт., 2005; Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Ястребова и соавт., 2019; Пьянкова и соавт., 2020). Также для исследования были взяты типовые штаммы: *Halomonas taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup>, *Chromohalobacter canadensis* DSM 6769<sup>T</sup>, *Chromohalobacter beijerinckii* DSM7218<sup>T</sup>, *Chromohalobacter japonicas* CECT7219<sup>T</sup>, *Chromohalobacter salarius* CECT5903<sup>T</sup>, *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup>, *Salinicola salarius* DSM18044<sup>T</sup>.

**Способность бактерий разлагать бензойную кислоту** оценивали путем культивирования в жидкой минеральной среде Раймонда (MCP) (Raymond, 1961) с различными концентрациями NaCl (30–150 г/л) и без добавления соли. Бензойную кислоту (в виде 10% раствора бензоата натрия) добавляли до конечной концентрации 1 г/л. Культивирование осуществляли на термостатируемом шейкере при температуре 28°C и скорости вращения 140 об./мин в течение 14 сут. Оценка роста проводили путем измерения оптической плотности (ОП) культуральной жидкости на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Утилизацию БК оценивали в культуральной жидкости, очищенной от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g) в течение 3 мин на центрифуге miniSpin (“Eppendorf”, Германия). Наличие в надосадочной жидкости БК определяли методом ВЭЖХ-анализа на хроматографе LC-20AD Prominace (“Shimadzu”, Япония) с колонкой (C-18 150 × 4.6 мм; “Sigma-Aldrich”, США) и УФ-детектором SPD-20A (при 205 нм) в системе ацетонитрил–0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (60 : 40). Количество субстрата оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно величины стандарта (0.01% водный раствор БК). Повторность опытов трехкратная.

**Идентификация бактерий-деструкторов.** ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом (Short protocols in molecular biology, 1995). Идентификацию бактерий проводили на основе определения и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длина фрагментов 915–1418 п.н.). Амплификацию гена

16S рРНК осуществляли с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27F (5'-AGAGTTTGTATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3') (Lane, 1991) на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler ("Bio-Rad Laboratories", США). Электрофорез, секвенирование и анализ полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили, как описано ниже.

**Исследование ключевых генов деструкции бензойной кислоты (*benA*-генов)** осуществляли путем амплификации фрагмента гена (длиной 521 п.н.), кодирующего  $\alpha$ -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, при использовании праймеров *benA-F* (5'-GCCACGAGAGCCGATTC-3') и *benA-R* (5'-GGTGGCGCGTAGTTCAGTG-3') как описано (Baggi et al., 2008), с последующим секвенированием и анализом полученных нуклеотидных последовательностей.

**Для обнаружения ПЦР-продуктов** использовали электрофорез в горизонтальном 1% агарозном геле на 1× буфере TBE (Трис – 10.8 г/л, борная кислота – 5.5 г/л, 0.5 М ЭДТА – 4 мл, вода дистиллированная – 79.7 мл/л) при комнатной температуре, напряжении 5–15 В/см в течение 20–40 мин. Агарозные гели анализировали после окрашивания раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 10–15 мин и фотографирования в УФ-свете с помощью системы геледокументирования BioDocAnalyze ("Bio-Rad Laboratories", США). Для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder ("Евроген", Россия).

**Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *benA*** осуществляли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL ("Applied Biosystems", США) с использованием набора реактивов Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit v3.1 ("Applied Biosystems", США), согласно рекомендациям производителя. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рДНК и *benA* проводили с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>), сервиса BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли по международным базам данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для построения филогенетических деревьев использовали метод "neighbor-joining" программы MEGA 7.0. Статистическую достоверность ветвления ("bootstrap"-анализ) оценивали на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *benA* исследуемых штаммов депонированы в базу данных GenBank под номерами MW757272–

MW757286, MZ359852–MZ359857 и MW862486–MW862498 соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Скрининг штаммов семейства *Halomonadaceae* на способность использовать БК в качестве субстрата.** Сто двадцать четыре штамма семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*), выделенных ранее из различных экотопов района солеразработок Верхнекамского месторождения солей, а также 7 типовых штаммов родов *Halomonas*, *Chromohalobacter* и *Salinicola* были проверены на способность к росту на БК в качестве единственного источника углерода и энергии. Было показано, что при выращивании в МСР в присутствии 30 г/л NaCl рост на БК демонстрировали 29 штаммов рода *Halomonas* (включая *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup>) из 63 штаммов этого рода разной видовой принадлежности, которые были отобраны для анализа. Рост на бензоате был зафиксирован у бактерий, близкородственных типовым штаммам видов *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, *H. sulfidaeris*, но не у представителей видов *H. venusta*, *H. hydrothermalis*, *H. utahensis*, *H. alimentaria*, *H. meridiana*, *H. piezotolerans* и *H. songnenensis*. Двадцать два активных штамма-деструктора БК рода *Halomonas* были исследованы более подробно (табл. 1). Среди 52 исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* (близкородственных видам *C. beijerinckii*, *C. japonicus*, *C. salarius*, *C. canadensis*) и 4 типовых штаммов рода, три штамма вида *C. canadensis* (включая типовой штамм *C. canadensis* DSM 6769<sup>T</sup>) осуществляли разложение (трансформацию) БК, о чем свидетельствовали убыль субстрата и изменение цвета среды в процессе культивирования (табл. 1). У 6 представителей рода *Salinicola*, близкородственных видам *S. halophyticus*, *S. socius*, *S. salarius* и типовых штаммов *S. socius* SMB35<sup>T</sup>, *C. salarius* СЕСТ 5903<sup>T</sup>, а также у 3 штаммов рода *Kushneria* (близкородственных штамму *K. phyllosphaerae* EAod3<sup>T</sup>), не было выявлено способности разлагать БК.

**Характеристика бактерий-деструкторов БК рода *Halomonas*.** Бактерии рода *Halomonas* являются умеренно галофильными микроорганизмами, способными расти как в отсутствие соли, так и в присутствии высоких концентраций хлорида натрия до 325 г/л (de la Haba et al., 2014). Показано, что все исследуемые штаммы, изолированные из разных экотопов района солеразработок, росли на БСР при концентрации соли от 30 до 150 г/л. У ряда штаммов, *Halomonas* spp. PD13-5, РМК3, D2, 610-2, 61g и *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup>, рост в отсутствие соли не был выявлен, а оптимальное содержание NaCl в среде составляло 70–150 г/л. Кроме

**Таблица 1.** Рост бактерий семейства *Halomonadaceae* в присутствии различных концентраций хлорида натрия

Штамм	Богатая среда Раймонда, NaCl (г/л)	Минеральная среда Раймонда, БК (1 г/л), NaCl (г/л)			
		без NaCl	30	50	70
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. taeanensis</i>					
<i>H. taeanensis</i> DSM 16463 <sup>T</sup>	30–250	–	+++	++	+
SMB56	0–150	+	++	++	+
NDT27	0–250	+	++	+++	++
D2	30–300	–	+++	+++	++
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. olivaria</i>					
NDT31	0–200	++	++	+	+
NDT21	0–150	+	+	–	–
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. ventosae</i>					
610-2	30–150	–	+++	+++	+
PMK3	30–150	–	++	++	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. titanicae</i>					
BNL26	0–150	++	+++	+++	++
BBL18	0–150	++	++	++	++
NDT13	0–150	+	+	–	–
BNL3-2	0–150	+	+	–	–
M125-1	0–150	–	+	+	+
PD13-5	30–150	–	+	+	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>H. alkaliantarctica</i>					
BBL22	0–150	+	+++	+++	++
8CN1-1	0–150	+	+	+	+
6CN3-12	0–150	+	+	–	–
5RN1	0–150	+	+	–	–
Штаммы, близкородственные другим видам рода <i>Halomonas</i>					
M135-4Nt ( <i>H. sulfidaeris</i> )	0–150	–	+++	+++	+
NDT28 ( <i>H. neptunia</i> )	0–200	++	++	+	+
M56-2 ( <i>H. alkaliphila</i> )	0–150	–	+++	+++	+
61g ( <i>H. radialis</i> )	30–150	–	+	+++	+
Штаммы, близкородственные типовому штамму вида <i>Chromohalobacter canadensis</i>					
<i>C. canadensis</i> B201	30–300	–	– т.о.с.*	– т.о.с.	–
<i>C. canadensis</i> 55	30–300	–	– т.о.с.*	– т.о.с.	–
<i>C. canadensis</i> DSM 6769 <sup>T</sup>	30–300	–	– т.о.с.*	–	–

Примечание. “–” – рост не обнаружен; “+” – ОП<sub>600</sub> от 0.1 до 0.3 ед.; “++” – ОП<sub>600</sub> от 0.4 до 0.7 ед.; “+++” – ОП<sub>600</sub> выше 0.7 ед.; “т.о.с.” – темное окрашивание среды культивирования.

\* Данные об утилизации бензойной кислоты приведены в тексте статьи.

того, штаммы NDT27, D2, NDT28, NDT31, *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup> способны к росту при более высоких концентрациях NaCl в среде (200–300 г/л). Штаммы были проверены на способность к росту

в МСР на БК в присутствии различных концентраций соли (табл. 1). Большинство культур показали наивысший прирост биомассы, выраженный в показателях оптической плотности культу-

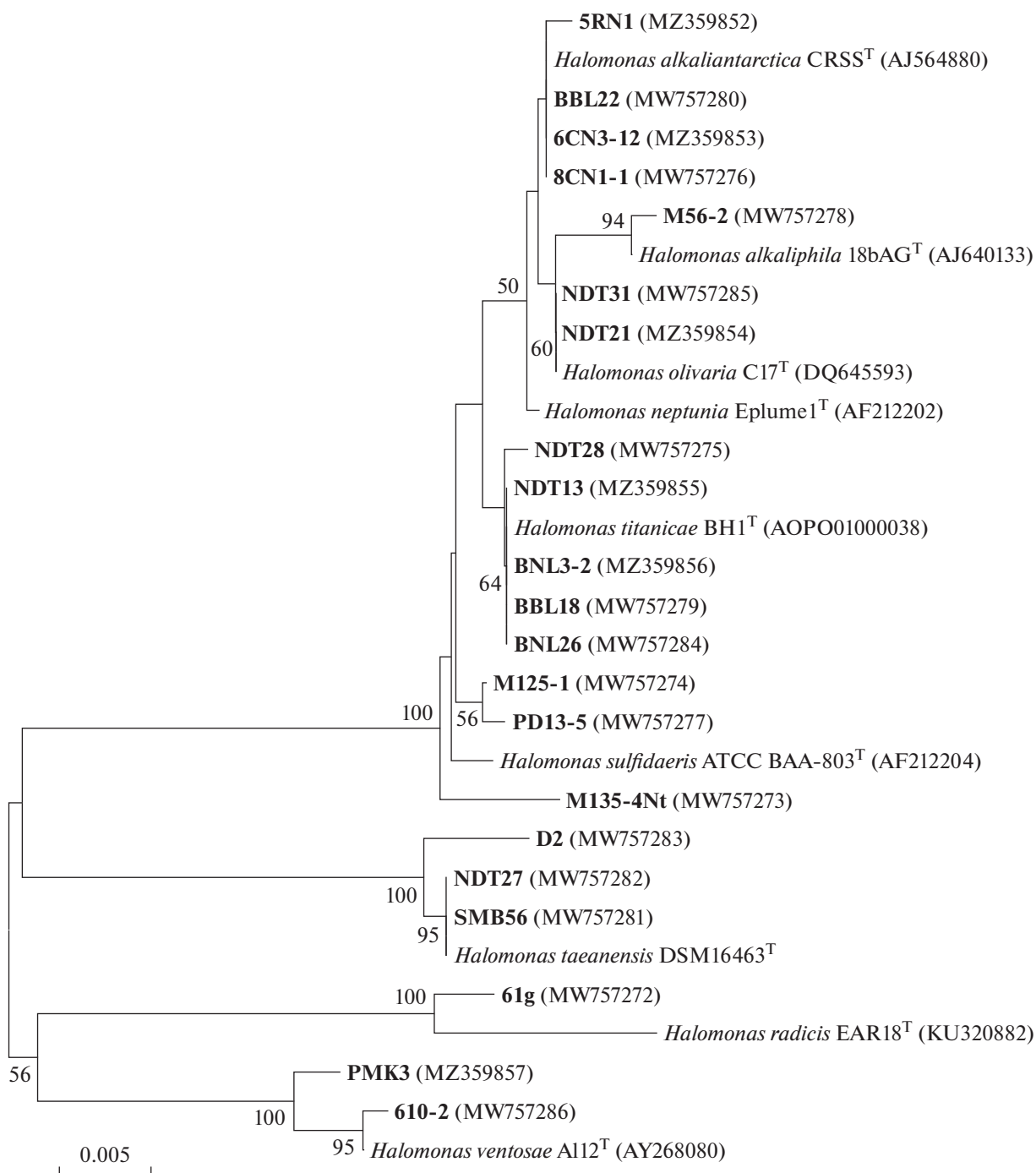
ры, при содержании 30 г/л соли в среде. С другой стороны, ряд штаммов (NDT27, D2, BNL26, BBL18, BBL22, M56-2, M135-4Nt, 61g, 610-2) демонстрировали активный рост при более высоких концентрациях соли — 50 и 70 г/л NaCl. В присутствии соли — 100 г/л и выше — не был выявлен рост исследуемых бактерий на БК.

В рамках настоящего исследования у 14 деструкторов БК (штаммов BBL18, BNL26, BNL3-2, BFL1, PD13-5, NDT13, BBL22, NDT27, D2, 610-2, 61g, NDT21, NDT31, NDT28) проведено секвенирование и анализ почти полного гена 16S рРНК (1350–1418 п.н.). Штаммы SMB56, M56-2, M135-4Nt, SMB61, TC193 и TC195 были идентифицированы на основе анализа гена 16S рРНК впервые. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых бактерий (длиной 915–1418 п.н.) и типовых штаммов рода *Halomonas* (<http://www.ezbiocloud.net>) показало, что активные деструкторы бензоата филогенетически близки с видами: *H. alkaliantarctica*, *H. alkaliphila*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. sulfidaeris*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae* и *H. radices*. Шесть штаммов сходны на уровне 99.24–100% с морским штаммом *H. titanicae* ВН1<sup>Т</sup> (Sanchez-Porro et al., 2010). Четыре штамма близкородственны (99.29–100% сходства по гену 16S рРНК) *H. taeanensis* DSM 16463<sup>Т</sup> (Lee et al., 2005), пять штаммов имели 99.62–99.85% сходства по гену 16S рРНК с *H. alkaliantarctica* CRSS<sup>Т</sup>, выделенным из соленого озера в Антарктике (Poli et al., 2007). Другие штаммы наибольшее сходство (на уровне 99.02–100%) имели с видами *H. olivaria* (99.93–100%, штаммы NDT21, NDT31), *H. ventosae* (99.06–99.42%, штаммы 610-2, PMK3), *H. neptunia* (99.57%, штамм NDT28), *H. sulfidaeris* (99.02%, штамм M135-4Nt), *H. alkaliphila* (99.79%, штамм M56-2). Следует отметить, что штамм 61g, изолированный из донных отложений рассолосборника на территории разработок ВМКМС, по гену 16S рРНК (размер анализируемой последовательности 1408 п.н.) имел низкий уровень сходства (98.41%) с ближайшим типовым штаммом *H. radices* EAR18<sup>Т</sup> (Navarro-Torre et al., 2020) и может представлять новый таксон в семействе *Halomonadaceae*. На рис. 1 показано положение исследуемых штаммов с близкородственными типовыми штаммами рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном с использованием метода “neighbor-joining”.

**Разнообразие генов *benA* бактерий рода *Halomonas*.** В результате проведения амплификации гена *benA*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу бензоат 1,2-ДО, было установлено, что у всех 22 исследуемых штаммов-деструкторов рода *Halomonas*, в том числе у *H. taeanensis* DSM 16463<sup>Т</sup>, присутствует ген *benA*. Для секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей *benA*-генов были

отобраны ампликоны, полученные с ДНК-матриц 12 штаммов разной видовой принадлежности (табл. 2). На основании сравнения амплифицированных фрагментов *benA*-генов с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank установлено, что наибольшее сходство, на уровне не выше 97.28%, сравниваемые последовательности имели с генами  $\alpha$ -субъединиц бензоат 1,2-ДО, 2-хлорбензоат 1,2-ДО и белка, содержащего кластер Риске, бактерий рода *Halomonas* (табл. 2). При анализе последовательностей *benA*-генов штаммов BBL18, M135-4Nt и *H. taeanensis* DSM 16463<sup>Т</sup> было выявлено сходство с генами бензоат/толуат 1,2-ДО (на уровне 83.82–82.04%) и бензоат 1,2-ДО (80.87 и 82.25%, штаммы BBL18 и *H. taeanensis* DSM 16463<sup>Т</sup>) штамма рода *Chromohalobacter* (*C. salexigens* 40a\_TX). Более низкое сходство исследуемых *benA*-генов, не превышающее 80.54% (у штамма *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840<sup>Т</sup>, класс *Cammaproteobacteria*), было выявлено с *benA* и гомологичными генами других представителей класса *Cammaproteobacteria*, а также штаммами классов *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Actinobacteria* (табл. 3).

На филогенетическом дереве (рис. 2) приведены транслированные аминокислотные последовательности (ТАП) *benA*-генов исследуемых деструкторов БК рода *Halomonas*, а также ближайших гомологичных генов представителей рода *Halomonas* других таксонов протеобактерий (классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Cammaproteobacteria*) и актинобактерий. ТАП *benA*-генов штаммов семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas* и *Chromohalobacter*) на дереве формируют отдельную филогенетическую группу, в которой четко прослеживается наличие нескольких кластеров (рис. 2). Так, наиболее многочисленный кластер включает ТАП восьми штаммов: NDT28, M56-2, M125-1, M135-4Nt, PD13-5, 8CN1-1, BBL18 и BBL22, которые филогенетически близки по гену 16S рРНК разным видам рода *Halomonas* (*H. alkaliantarctica*, *H. alkaliphila*, *H. neptunia*, *H. sulfidaeris*, *H. titanicae*, *H. utahensis*). BLAST-анализ геномов типовых штаммов вышеперечисленных видов показал, что гены *benA* в них отсутствуют. В то же время ТАП, близкородственные этой группе генов, были выявлены в геномах двух штаммов: *H. sulfidaeris* SST4 (QNTU01000040) и *Halomonas* sp. HL-93 (LJST01000014) (рис. 2). Сравнимые последовательности генов *benA* этого кластера проявляли наибольшее сходство с генами большой субъединицы бензоат/2-галобензоат 1,2-ДО и белка, содержащего кластер Риске, штаммов рода *Halomonas*, изолированных из морских экосистем (табл. 2, рис. 2). Аминокислотные последовательности генов *benA* штаммов BBL18 и BBL22 формируют отдельную ветвь с таковыми генов 2-гало(хлор)бензоат 1,2-ДО двух штаммов рода *Halomonas* (рис. 2).



**Рис. 1.** Положение исследуемых штаммов рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “Jukes-Cantor”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. В скобках указаны номера в базе данных GenBank.

Штаммы SMB56, NDT27 и D2 (по гену 16S рРНК) являются филогенетически близкими с *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup>, а штамм 610-2 — с *H. ventosae* A112<sup>T</sup>. Сравнительный анализ последо-

вательностей гена *benA* этих штаммов и штамма *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup> с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank показал наибольшее сходство с генами α-субъедини-

**Таблица 2.** Сравнение нуклеотидных последовательностей *benA*-генов штаммов рода *Halomonas* с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Штаммы	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
	Ген $\alpha$ -субъединицы 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Halomonas</i> sp. КО116	CP011052	92.15 94.67 94.46 93.32 94.03 93.39 95.50 93.66	Водная поверхность Средиземного моря, дельта Нила, Египет	O'Dell et al., 2015
	Ген $\alpha$ -субъединицы 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>H. titanicae</i> GPM3	CP054580	91.88 94.46 94.46 93.50 94.03 93.39 95.09 94.08	Красные водоросли <i>Pyropiatenera</i> , Южная Корея	Н.д.
NDT28 M56-2 M125-1 M135-4Nt	Ген, кодирующий белок с кластером Рискс [2Fe-2S], <i>Halomonas</i> sp. PA16-9	CP040451	91.88 94.68 94.66 93.91 94.24 92.98 93.87 91.97	Донные отложения, Тихий океан	Н.д.
PD13-5 8CN1-1 BBL18 BBL22	<i>benA</i> , <i>H. sulfidaeris</i> SST4	QNTU01000040	92.15 94.01 94.46 93.70 94.03 93.80 95.30 92.60	Морские отложения, Антарктида	Abdel-Mageed et al., 2020
	<i>benA</i> , <i>Halomonas</i> sp. HL-93	LJST01000014	Н.д. 87.58 87.01 86.50 86.60 85.42 87.63 Н.д.	Микробный мат гиперсоленого озера, США	Nelson et al., 2015
	Ген $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> СЕСТ 5797 <sup>T</sup>	SNZJ01000041	86.70 88.99 89.63 89.08 89.60 88.02 88.64 Н.д.	Засоленная почва, Испания	Н.д.

Таблица 2. Окончание

Штаммы	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
	Ген $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> USBA 854	PVTM01000013	91.02 90.00 90.59 90.42 90.00 92.94 91.02 Н.д.	Соленый источник, Анды, Колумбия	Н.д.
	<i>benA</i> , <i>H. aestuarii</i> Hb3	CP018139	89.48 89.00 89.38 89.32 88.91 88.71	Солнечная солеварня, Южная Корея	Н.д.
	<i>benA</i> , <i>H. organivorans</i> СЕСТ 5995 <sup>T</sup>	FN997646	85.92 87.68 86.74 86.86 87.37 84.70	Засоленная почва, Южная Испания	Moreno et al., 2011
DSM16463 <sup>T</sup>	Ген, кодирующий белок, содержащий кластер Риске 2Fe-2S, <i>Halomonas</i> sp. BM-2019	CP071922	86.56 88.38 87.90 87.82 87.03 86.34	Озерная вода, Танзания	Н.д.
NDT27					
D2					
DR1	<i>benA</i> , <i>H. sulfidaeris</i> SST4	QNTU01000040	82.85 84.06 83.44 83.54 83.92 Н.д.	Морские отложения, Антарктида	Abdel-Mageed et al., 2020
SMB56					
610-2	Ген $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> СЕСТ 5797 <sup>T</sup>	SNZJ01000041	Н.д. 89.00 88.96 88.89 88.49 90.44	Засоленная почва, Испания	Н.д.
	Ген $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. ventosae</i> USBA 854	PVTM01000013	Н.д. 90.80 89.66 89.66 90.59 89.66	Соленый источник, Анды, Колумбия	Н.д.
	Ген $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат-1,2-ДО, <i>H. taeanensis</i> BH539 <sup>T</sup>	FNCI01000003	100 97.28 94.86 94.83 97.28 83.98	Солнечная солеварня, Корея	Н.д.

Примечание. "Н.д." – нет данных.



**Таблица 3.** Сравнение нуклеотидных последовательностей *benA*-генов штаммов рода *Halomonas* (сем. *Halomonadaceae*, класс *Gammaproteobacteria*) с гомологичными ближайшими последовательностями бактерий других таксонов (BLAST-анализ)\*

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Класс	Номера GenBank**	Сходство, %
M135-4Nt	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000001/ PWW42699	82.18
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 <sup>T</sup>	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	FO203363/ CCG93781	80.54
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Pseudomonas</i> sp. DTU12.1	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	CP045254/ QHG23773	80.25
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	CP003171/ AEY00109	79.21
	<i>benA</i> , <i>Pseudogulbenkiania</i> sp. NH8B	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	AP012224/ BAK76567	77.50
	<i>benA</i> , <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2 <sup>T</sup>	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	CP000529/ ABM37421	77.41
BBL18	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a_TX	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000001/ PWW42699	83.82
	<i>benA</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	QGTY01000032/ PWW32861	80.87
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Pseudomonas</i> sp. DTU12.1	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	CP045254/ QHG23773	79.47
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 <sup>T</sup>	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	FO203363/ CCG93781	78.31
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Zobellia denitrificans</i> F13-1	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	CP012621/ ATG72450	78.12
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Kocuria palustris</i> MU14/1	<i>Actinobacteria</i>	CP012507/ ALB03862	77.92
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> KT112-7	<i>Actinobacteria</i>	CP072193/ Н.д.	77.51
	<i>benA</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> sp. NIBRBAC000502771	<i>Actinobacteria</i>	CP041187/ QDG62019	77.44
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	CP003171/ AEY00109	77.18
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Serratia rubidaea</i> NCTC10848	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	LS483492/ SQJ16490	76.76
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Comamonas piscis</i> BIGb0172	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	CP058554/ QMV73311	76.53
	<i>benA</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 22B	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	CP050092/ QIO68893	76.12
	<i>benA</i> , <i>Citricoccus</i> sp. SGAir0253	<i>Actinobacteria</i>	CP039424/ QCU78183	75.91
610-2	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Massilia</i> sp. WG5	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	CP012640/ ALK97586	78.92
	<i>benA</i> , <i>Pseudomonas sihuiensis</i> KCTC 32246 <sup>T</sup>	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	LT629797/ SDU90471	75.95
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DMU1	<i>Actinobacteria</i>	CP050952/ QIX52496	75.80
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Sinorhizobium americanum</i> CCGM7	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	CP013054/ APG87352	75.00

Таблица 3. Окончание

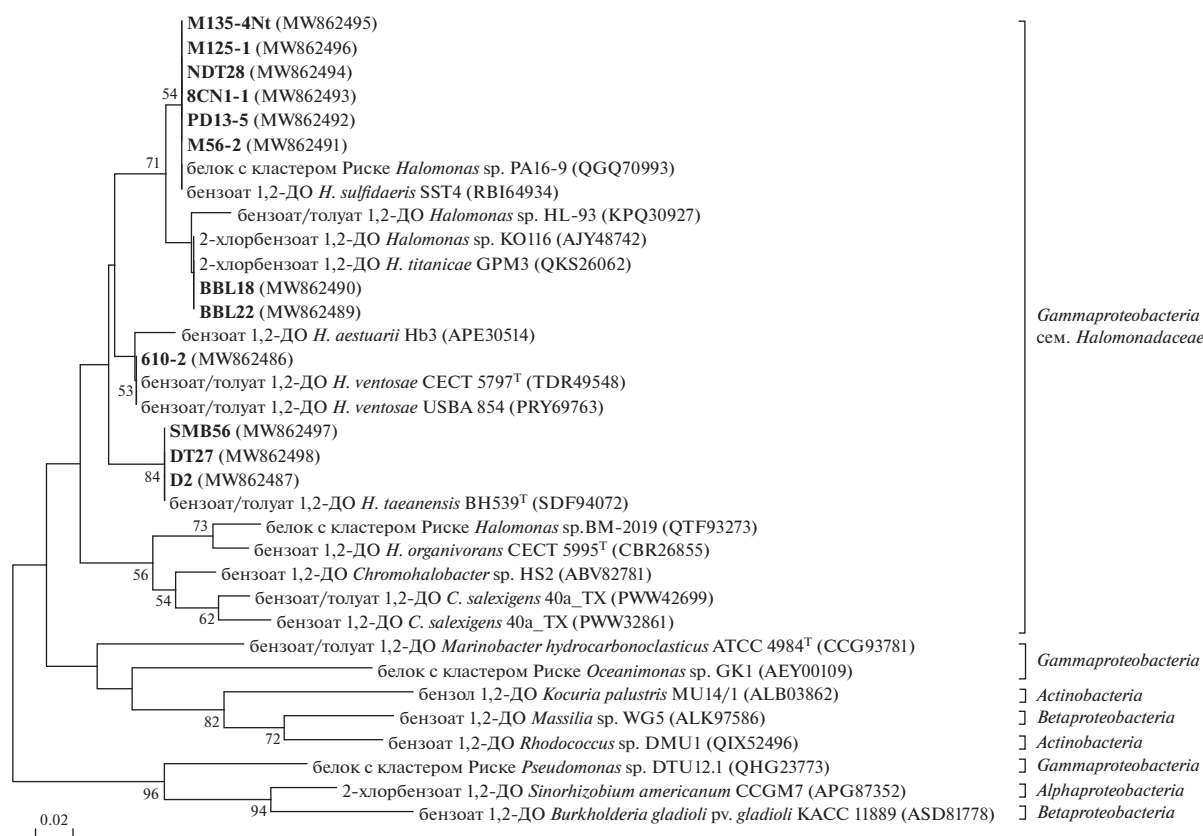
Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Класс	Номера GenBank**	Сходство, %
DSM 16463T	<i>benA</i> , <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	$\gamma$ -Proteobacteria	QGTY01000032/ PWW32861	82.25
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Chromohalobacter salexigens</i> 40a TX	$\gamma$ -Proteobacteria	QGTY01000001/ PWW42699	82.04
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59	$\gamma$ -Proteobacteria	CP003093/ AER57629	77.13
	<i>benA</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> PF08	$\gamma$ -Proteobacteria	CP032618/ AYG08044	76.99
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 <sup>T</sup>	$\gamma$ -Proteobacteria	FO203363/ CCG93781	76.70
	Ген бензол 1,2-ДО, <i>Zobellella denitrificans</i> F13-1	$\gamma$ -Proteobacteria	CP012621/ ATG72450	76.23
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Aeromonas simiae</i> A6	$\gamma$ -Proteobacteria	CP040449/ QF154779	76.16
	Ген, кодирующий белок с кластером Риске [2Fe-2S], <i>Oceanimonas</i> sp. GK1	$\gamma$ -Proteobacteria	CP003171/ AEY00109	76.01
	<i>benA</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf10	$\alpha$ -Proteobacteria	CP016287/ ANP89222	75.88
	Ген бензоат/толуат 1,2-ДО, <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> KACC 11889	$\beta$ -Proteobacteria	CP022006/ ASD81778	75.72
	<i>benA</i> , <i>Sphingobium wenxiniae</i> JZ-1 <sup>T</sup>	$\alpha$ -Proteobacteria	KJ620836/ AHZ46835	75.62
	<i>benA</i> , <i>Achromobacter</i> sp. AONIH1	$\beta$ -Proteobacteria	CP026124/ AUT46373	75.35
	Ген 2-галобензоат 1,2-ДО, <i>Raoultella terrigena</i> NCTC13098	$\gamma$ -Proteobacteria	LR131271/ VDR27448	75.15

Примечание. “Н.д.” – нет данных. \* В таблице приведены нуклеотидные последовательности, имеющие сходство с анализируемыми нуклеотидными последовательностями не меньше 75%. \*\* Нуклеотидные/аминокислотные последовательности.

цы бензоат 1,2-ДО штамма *H. aestuarii* Hb3, изолированного из солнечной солеварни (Южная Корея), и штамма-деструктора фенола *H. organivorans* СЕСТ 5995<sup>T</sup>, выделенного из засоленной почвы в Южной Испании, а также с геном, кодирующим белок с кластером Риске, штамма *Halomonas* sp. VM-2019, изолированного из озерной воды (Танзания) (табл. 2). ТАП генов *benA* штаммов SMB56, NDT27, D2 (близкородственных виду *H. taeanensis*) и штамма 610-2 (близкородственного виду *H. ventosae*) на филогенетическом дереве формируют два отдельных кластера (рис. 2). Интересен факт, что при анализе геномов штаммов рода *Halomonas*, представленных в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), у типового штамма *H. ventosae* СЕСТ 5797<sup>T</sup> (SNZJ01000041) и штамма *H. ventosae* USBA 854 (PVTM01000013) были выявлены гены  $\alpha$ -субъединицы бензоат/толуат 1,2-ДО. Идентичность нуклеотидных последовательностей *benA* штамма 610-2 и выявленных в геномах штаммов *H. ventosae* гомологичных после-

довательностей составляла 89.66–90.44% (табл. 2). Транслированные аминокислотные последовательности этих генов представлены на филогенетическом дереве и входят в один кластер с *benA*-геном штамма 610-2 (рис. 2). Также показано, что ТАП *benA* штаммов SMB56, NDT27, D2 и типового штамма *H. taeanensis* DSM 16463<sup>T</sup> (FNCI01000003) формируют отдельную ветвь на дереве. Гомология нуклеотидных последовательностей генов *benA* этих штаммов между собой составляла 96.13–98.73%. Интересен факт, что на дереве, построенном на основе сравнения генов 16S рРНК, эти штаммы также формируют один кластер (рис. 1). Таким образом, на настоящем этапе исследований выявлено филогенетическое отличие генов *benA* штаммов, близкородственных видам *H. taeanensis* и *H. ventosae*, как между собой, так и с представителями других видов рода *Halomonas*.

**Характеристика бактерий-деструкторов БК рода *Chromohalobacter*.** Предварительный скрининг показал, что среди 52 штаммов, изолированных



**Рис. 2.** Положение *benA*-генов исследуемых штаммов рода *Halomonas* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей *benA*-генов с использованием метода “neighbor-joining”. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “p-distance”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Масштаб соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот. В скобках указаны номера в базе данных GenBank.

из разных экотопов района солеразработок (Корсакова и соавт., 2013; Olsson et al., 2017; Пьянкова и соавт., 2020), среди которых большинство (35 штаммов) близкородственны по гену 16S рРНК виду *C. canadensis* (сходство на уровне 99.40–99.93% с *C. canadensis* ATCC 43984<sup>T</sup>), 16 штаммов – виду *C. japonicus* (99.54–99.78% с *C. japonicus* 43<sup>T</sup>) и 1 штамм – виду *C. beijerinckii* (99.85% с *C. beijerinckii* ATCC 19372<sup>T</sup>), выявлены только 2 штамма, близкородственных виду *C. canadensis*, способные осуществлять разложение (трансформацию) БК (табл. 1). На процесс разложения БК указывала убыль субстрата и появление темного окрашивания среды, которое нарастало в процессе культивирования штаммов в МСР с БК в присутствии 30 и 50 г/л NaCl (табл. 2). Так при инкубировании в присутствии 30 г/л NaCl штаммы в течение 5 сут демонстрировали убыль субстрата: штамм 55 – 10%, штамм В201 – 11% от первоначального количества (1 г/л) в среде. На основании имеющихся данных о метаболических путях разложения БК у бактерий (<https://www.genome.jp/pathway/map00362+C00180>), можно предположить, что БК окисляется до гид-

роксированных ароматических метаболитов (Li et al., 2013), которые далее не разлагаются ферментными системами исследуемых штаммов и накапливаются при культивировании. Для идентификации продуктов разложения БК требуются дополнительные исследования. Результаты наших исследований показали, что типовой штамм *C. canadensis* DSM 6769<sup>T</sup> проявлял аналогичную реакцию при культивировании на БК в присутствии 30 г/л соли (табл. 1), при этом убыль субстрата наблюдалась на уровне 33% в течение 5 сут. Типовые штаммы *C. beijerinckii* DSM 7218<sup>T</sup>, *C. japonicus* СЕСТ7219<sup>T</sup>, *C. salarius* СЕСТ 5903<sup>T</sup> не осуществляли деструкцию (трансформацию) БК.

В результате амплификации с использованием праймеров к гену *benA* (Baggi et al., 2008) и ДНК-матриц исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* не были выявлены искомые нуклеотидные последовательности (*benA*-гены). На основании проведенных экспериментов можно предположить, что в трансформации БК у исследуемых штаммов рода *Chromohalobacter* задействованы ферментные системы, отличные от “классиче-

ского” пути разложения БК бактериями (Li et al., 2013). Анализ генома *C. canadensis* DSM 6769<sup>T</sup> показал отсутствие *benA*-генов, что подтверждает это предположение. В результате поиска *benA*-генов в базах данных GenBank только в двух штаммах рода *Chromohalobacter* (*C. salexigens* 40a TX и *Chromohalobacter* sp. HS-2) обнаружены последовательности генов  $\alpha$ -субъединицы бензоат 1,2-ДО (EU155151, *Chromohalobacter* sp. HS-2),  $\alpha$ -субъединиц бензоат и бензоат/толуат 1,2-ДО (QGTU01000032 и QGTU01000001, штамм *C. salexigens* 40a TX) (рис. 2, табл. 3).

Таким образом, результаты исследования разнообразия бактерий-деструкторов БК семейства *Halomonadaceae* в микробных сообществах района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край) показали, что среди всего массива выделенных и охарактеризованных представителей семейства (родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, *Kushneria*) активные деструкторы БК выявлены в группе бактерий рода *Halomonas*. Штаммы-деструкторы были филогенетические близки видам: *H. alkaliarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. radices* и *H. utahensis*, для представителей которых ранее не была описана способность разлагать БК. Установлено, что выявленные штаммы рода *Halomonas* способны использовать БК в качестве единственного источника углерода и энергии при росте в минеральной среде в присутствии 30–70 г/л хлорида натрия. Известно, что промышленная территория района солеразработок характеризуется наличием большого количества органических загрязнителей, в том числе различных моно- и полиароматических соединений, и высоким содержанием солей (Бачурин, Одинцова, 2009; Корсакова и соавт., 2013). Наши исследования показали, что галофильные бактерии рода *Halomonas* способны разлагать БК и, соответственно, участвовать в процессах деградации ароматических поллютантов в составе уникальных микробных сообществ, сформировавшихся в этом промышленном регионе. Впервые у представителей рода *Halomonas* (выделенных из района ВМКМС) показано разнообразие генов (*benA*), участвующих на начальном этапе окисления БК. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей *benA*-генов показал, что наибольшее сходство они имеют с гомологичными последовательностями представителей рода *Halomonas* и рода *Chromohalobacter* (табл. 2, 3, рис. 2). На филогенетическом дереве транслированные аминокислотные последовательности *benA*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* формируют самостоятельный кластер, уровень гомологии нуклеотидных последовательностей *benA* представителей этой группы составляет 95.50–80.87%. Аминокислотные последовательности *benA*-генов представителей других таксонов

протеобактерий и актинобактерий располагаются на дереве отдельно от группы “*Halomonadaceae*” (рис. 2). Выделение *benA*-генов семейства *Halomonadaceae* в отдельную группу вызывает интерес для возможности их использования в качестве филогенетического маркера, который может быть востребован для изучения разнообразия и функционирования деструкторов БК, в частности, бактерий родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*. Кроме того, охарактеризованные в рамках настоящей работы галофильные бактерии-деструкторы БК имеют практический интерес для использования их при создании новых биотехнологий восстановления и мониторинга засоленных почв, загрязненных токсичными органическими соединениями.

#### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьина Л.Н., Алтынцева О.В., Плотникова Е.Г. Изучение сообщества микроорганизмов, выделенного из района солеразработок // Вестн. Пермского ун-та. Серия: биология. 2005. Вып. 6. С. 109–114.
- Anan'ina L.N., Altyntzeva O.V., Plotnikova E.G. The study of microbial community isolated from the region of salt mining // Bull. Perm Univ. Biology. 2005. Iss. 6. P. 109–114.
- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2009. № 7. С. 374–380.
- Bachurin B.A., Odintsova T.A. Wastes from mining and processing industry as sources of emission of organic pollutants // Mining informational and analytical bulletin. 2009. № 7. P. 374–380.
- Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Бачурин Б.А., Плотникова Е.Г. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 247–250.
- Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Bachurin B.A., Plotnikova E.G. Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* at the mining area of the Verkhnekamsk salt deposit // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 249–252.

- Пьянкова А.А., Усанина Д.И., Алеев В.С., Блинов С.М., Плотникова Е.Г. Характеристика бактерий, выделенных из рудника Верхнекамского месторождения солей (Пермский край) // Вестн. Пермского ун-та. Серия: биология. 2020. № 4. С. 312–320.
- Pyankova A.A., Usanina D.I., Aleev V.S., Blinov S.M., Plotnikova E.G. Characteristics of bacteria isolated from the miner of the Verkhnekamsky salt deposit (Perm krai) // Bull. Perm Univ. Biology. 2020. № 4. P. 312–320.
- Ястребова О.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы фталатов, выделенные из района промышленной добычи и переработки калийно-магниевых солей (г. Березники, Пермский край) // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. С. 378–385.
- Yastrebova O.V., Pyankova A.A., Plotnikova E.G. Phthalate-degrading bacteria isolated from an industrial mining area and the processing of potassium and magnesium salts // Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow). 2019. V. 55. P. 397–404.
- Abdel-Mageed W.M., Lehri B., Jarmusch S.A., Miranda K., Al-Wahaibi L.H., Stewart H.A., Jamieson A.J., Jaspars M., Karlyshev A.V. Whole genome sequencing of four bacterial strains from South Shetland Trench revealing biosynthetic and environmental adaptation gene clusters // Mar. Genomics. 2020. V. 54. P. 100782.
- Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Vincenza A. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents // Int. Biodeter. Biodegr. 2008. V. 62. P. 57–64.
- Csonka L.N., O'Connor K., Larimer F., Richardson P., Lapidus A., Ewing A.D., Goodner B.W., Oren A. What we can deduce about metabolism in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens* from its genomic sequence // Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya / Eds. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. Springer: Dordrecht, 2005. P. 267–285.
- de la Haba R.R., Arahal D.R., Sánchez-Porro C., Ventosa A. The Family *Halomonadaceae* // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Heidelberg: Springer, 2014. P. 325–360.
- Fathepure B.Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 173.
- García M.T., Ventosa A., Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 54. P. 97–109.
- Kim D., Kim S.W., Choi K.Y., Lee J.S., Kim E. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2 // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 280. P. 235–241.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 15. P. 74–92.
- Lee J.C., Jeon C.O., Lim J.M., Lee S.M., Lee J.M., Song S.M., Park D.J., Li W.J., Kim C.J. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 2027–2032.
- Li M., Yi P., Liu Q., Pan Y., Qian G. Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 85. P. 577–582.
- Monzón G.C., Nisenbaum M., Seitz M.K.H., Murialdo S.E. New findings on aromatic compounds' degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3 // Curr. Microbiol. 2018. V. 75. P. 1108–1118.
- Moreno M., Sánchez-Porro C., Piubeli F., Frias L., García M.T., Mellado E. Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans* // PLoS One. 2011. V. 6. P. e21049.
- Navarro-Torre S., Carro L., Rodríguez-Llorente I.D., Pajuelo E., Caviedes M.A., Igual J.M., Klenk H.P., Montero-Calasan M.D.C. *Halomonas radialis* sp. nov., isolated from *Arthrocnemum macrostachyum* growing in the Odiel marshes (Spain) and emended descriptions of *Halomonas xinjiangensis* and *Halomonas zincidurans* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 220–227.
- Nelson W.C., Maezato Y., Wu Yu-W., Romine M.F., Lindemann S.R. Identification and resolution of microdiversity through metagenomic sequencing of parallel consortia // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. P. 255–267.
- O'Dell K.B., Woo H.L., Utturkar S., Klingeman D., Brown S.D., Hazen T.C. Genome sequence of *Halomonas* sp. strain KO116, an ionic liquid-tolerant marine bacterium isolated from a lignin-enriched seawater microcosm // Genome Announc. 2015. V. 3. P. e00402-15.
- Oie C.S., Albaugh C.E., Peyton B.M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism // Water Res. 2007. V. 41. P. 1235–1242.
- Olsson B.E., Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Pyankova A.A., Mavrodi O.V., Plotnikova E.G., Mavrodi D.V. Draft genome sequences of strains *Salinicola socius* SMB35<sup>T</sup>, *Salinicola* sp. MH3R3-1 and *Chromohalobacter* sp. SMB17 from the Verkhnekamsk potash mining region of Russia // Stand. Genomic Sc. 2017. V. 12. P. 39.
- Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases // *Pseudomonas* / Eds. Ramos J.L., Levesque R.C. Boston: Springer, 2006. P. 287–340.
- Poli A., Esposito E., Orlando P., Lama L., Giordano A., de Appolonia F., Nicolaus B., Gambacorta A. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline Lake Cape Russell in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium // Syst. Appl. Microbiol. 2007. V. 30. P. 31–38.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinhydrocarbons // Develop. Ind. Microbiol. 1961. V. 2. P. 23–32.
- Rosenberg A. *Pseudomonas halodurans* sp. nov., a halotolerant bacterium // Arch. Microbiol. 1983. V. 136. P. 117–123.
- Sánchez-Porro C., Kaur B., Mann H., Ventosa A. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2768–2774.

Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. / Eds. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. N.Y.: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.

## Benzoate-Degrading Bacteria of the Family *Halomonadaceae* Isolated from a Salt Mining Area: Species Diversity and Analysis of the *benA* Genes

A. A. Pyankova<sup>1</sup> and E. G. Plotnikova<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

\*e-mail: [peg@iegm.ru](mailto:peg@iegm.ru)

Received July 27, 2021; revised August 17, 2021; accepted September 7, 2021

**Abstract**—Screening of ability to utilize benzoate as the sole carbon and energy source was carried out for 124 strains of the family *Halomonadaceae* (genera *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Salinicola*, and *Kushneria*) isolated from mining sites of the Upper Kama deposit of potassium and magnesium salts. Active growth on benzoate (in the presence of 30–70 g/L NaCl) was shown for 28 *Halomonas* strains closely related to the species *H. taeanensis*, *H. olivaria*, *H. ventosae*, *H. titanicae*, *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. radialis*, and *H. sulfidaeris*. Strains of the genera *Chromohalobacter*, *Salinicola*, and *Kushneria* either did not grow on benzoate or carried out its transformation (2 *Chromohalobacter* strains). PCR screening for the *benA* gene encoding the  $\alpha$ -subunit of benzoate 1,2-dioxygenase (1,2-DO), the key enzyme for benzoate degradation, within the family *Halomonadaceae* revealed its presence in all benzoate-degrading *Halomonas* strains. The sequences of the amplified fragments had the highest similarity (not exceeding 95.50%) with the genes encoding the  $\alpha$ -subunits of benzoate 1,2-DO, 2-chlorobenzoate 1,2-DO, and other dioxygenases of *Halomonas* strains containing Rieske-type [2Fe-2S] clusters. New data on the genetic systems regulating benzoate degradation in *Halomonas* isolates are of interest for better understanding of molecular mechanisms of aromatics degradation under salinization conditions. The isolated active benzoate degraders may be used to develop the technologies for bioremediation and monitoring of polluted soils.

**Keywords:** bacterial degraders, benzoate, *benA*, *Halomonadaceae*