УДК 579.66:661.8

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ФТАЛАТОВ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РАЙОНА ПРОМЫШЛЕННОЙ ДОБЫЧИ И ПЕРЕРАБОТКИ КАЛИЙНО-МАГНИЕВЫХ СОЛЕЙ

© 2019 г. О. В. Ястребова^{1, *}, А. А. Пьянкова¹, Е. Г. Плотникова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН — филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия *e-mail: olyastr@mail.ru

Поступила в редакцию 03.11.2018 г. После доработки 27.12.2018 г. Принята к публикации 20.02.2019 г.

Из образцов почвы, шламов и донных отложений, отобранных в районе соледобывающих предприятий ПАО "Уралкалий" (г. Березники, Россия), выделены 25 галотолерантных штаммов бактерий-деструкторов орто-фталевой кислоты (**ОФК**). На основании анализа гена 16S pPHK изоляты были отнесены к родам *Rhodococcus, Dietzia, Bacillus, Halomonas, Pseudomonas, Idiomarina, Stappia, Martelella, Erythrobacter, Alcanivorax, Marinobacter, Oceanisphaera, Nitratireductor, Breoghania*. Восемь штаммов-деструкторов ОФК способны использовать эфиры фталевой кислоты – дибутилфталат (**ДБФ**) и диэтилфталат (**ДЭФ**) в качестве единственного источника углерода и энергии. Штаммы утилизировали 90–98% ДБФ и 49–80% ДЭФ (концентрация фталатов 500 мг/л) как при отсутствии в среде культивирования NaCl, так и при ее концентрации в среде 50 г/л. Повышение содержания NaCl в среде до 70 и 90 г/л существенно не влияло на утилизацию фталатов. Впервые показана способность бактерий родов *Halomonas, Martelella* и *Oceanisphaera* к деструкции ДЭФ и ДБФ. Выделенные штаммыдеструкторы фталатов (ОФК, ДЭФ и ДБФ) являются перспективными для разработки новых методов биоремедиации засоленных почв, загрязненных фталатами.

Ключевые слова: галотолерантные бактерии, деструкция, орто-фталевая кислота, дибутилфталат, диэтилфталат, засоленные почвы

DOI: 10.1134/S0555109919040159

Фталаты – соли и эфиры фталевой кислоты являются одними из наиболее широко используемых синтетических химикатов в качестве добавок для повышения гибкости, прозрачности и долговечности пластмасс, в производстве строительных материалов, полиэтилена, полистирола, одноразовых медицинских изделий. Одни из наиболее часто применяемых в химической промышленности эфиров фталевой кислоты – дибутилфталат (ДБФ) и диэтилфталат (ДЭФ). Эти соединения используются в качестве пластификаторов полимеров при производстве лаков, красок, искусственных пленок, кабельных пластикатов, линолеума. Распространено применение дибутилфталата в резинотехнической индустрии при изготовлении некоторых видов резин и смол. а также в качестве растворителя, имеющего высокую температуру кипения [1, 2]. В связи с интенсивным использованием в промышленности данные соединения являются распространенными загрязнителями природной среды и представляют серьезную экологическую проблему [3]. Фталаты и их метаболиты обладают гепатотоксичными, мутагенными

и канцерогенными свойствами и признаны потенциально опасными для человека и животных [2, 4]. Агентство по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agenсу; EPA) включило данные соединения в перечень приоритетных экополлютантов, концентрация которых в объектах окружающей среды требует постоянного мониторинга (https://www.epa.gov/).

Значительное количеств фталатов обнаружено в отходах предприятий соледобывающего производства "Уралкалий" (Верхнекамское месторождение калийно-магниевых солей, **ВКМС**, Россия), что обусловлено использованием в технологическом цикле обогащения калийных руд ряда реагентов (оксиэтилированные жирные кислоты, нефтепродукты, диоксановые спирты и др.), продуктами трансформации которых и являются фталаты. Данные соединения обнаружены в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах и отходах калийного производства [5].

Поскольку деструкция сложных эфиров фталевой кислоты физическими и химическими ме-

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ФТАЛАТОВ

Образец	Мин., %*	Катионы водорастворимых солей и органические соединения, мг/кг								
		Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Наф	ДБФ	БОФ	Алк	
Донные отложения (р. Зырянка)	0.2	17241.8	9.1	23.1	378.3	1.9	5.5	34.8	74.9	
Донные отложения, промканал	1.6	6212.7	405.5	98.6	3095.0	105.1	3.9	14.6	16001.7	
Шламохранилище	12.1	24099.5	11027.3	275.5	1929.0	12.7	2.5	4.9	4042.3	
Донные отложения, рас- солосборник	4.9	14757.9	801.9	6.7	3185.0	0.7	7.5	7.2	78.7	
Ризосферная почва, около солеотвала	0.4	12726.2	294.8	4.1	250.5	1.4	5.8	3.9	85.4	

Таблица 1. Характеристика образцов, отобранных в районе солеразработок

* Мин. – минерализация; ДБФ – дибутилфталат; БОФ – бутилоктилфталат; Наф – нафталин; Алк – алканы.

тодами (гидролиз, фотолиз) требует длительного времени, основная роль в утилизации фталатов в окружающей среде принадлежит микроорганизмам. Способность к деградации сложных эфиров фталевой кислоты обнаружена у бактерий и их сообществ, выделенных из активного ила, сточных вод, морских и речных донных отложений, почв, загрязненных пластиковыми отходами [3, 6–10]. Известны бактерии-деструкторы фталатов (ДБФ и ДЭФ), принадлежащие родам Comamonas, Pseudomonas, Acinetobacter, Sphingomonas, Rhodococcus, Arthrobacter, Bacillus [6–11].

У ряда бактерий описан метаболический путь деградации эфиров фталевой кислоты, включаюший два этапа: первичная деструкция данных соединений до орто-фталевой кислоты (ОФК) и разложение последней с образованием протокатеховой кислоты (ПКК) [1]. Первый этап бактериальной деструкции ДБФ включает образование монобутилфталата, а деструкция ДЭФ проходит с образованием диметилфталата и монометилфталата в качестве ключевых метаболитов [7, 12]. Большинство грамотрицательных бактерий осуществляют деструкцию ОФК через цис-4,5-дигидро-4,5-дигидроксифталат и 4,5-дигидроксифталат до ПКК [13]. Для грамположительных бактерий описан метаболический путь деструкции ОФК через иис-3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталат и 3,4-дигидроксифталат до ПКК [1]. Далее ПКК метаболизируется через расщепление бензольного кольца по орто- или мета-пути [1, 14]. Однако известны грамотрицательные бактерии, в частности Pseudomonas aeruginosa PP4, в клетках которых присутствует 3,4-фталат диоксигеназа фермент начального этапа разложения ОФК по пути, описанному для грамположительных бактерий [14].

К настоящему времени имеются единичные сведения о бактериальной деструкции фталатов в условиях повышенного засоления среды. Описаны морские галотолерантные бактерии родов Alteromonas, Marinomonas, Marinovum, Thalassococcus и Thalassospira, способные разлагать орто-фталат в условиях осмотического стресса [15]. Способность к деструкции сложных эфиров фталевой кислоты при повышенном содержании соли в среде выявлена у штаммов родов Sphingobium и Rhodococcus [8, 16].

Цель работы — выделение и характеристика штаммов-деструкторов фталатов (ОФК, ДБФ и ДЭФ), выделенных из загрязненных почв, водных объектов (донных отложений) и шламохранилищ, расположенных на территории г. Березники (Россия).

МЕТОДИКА

Образцы почв и донных отложений. В районе разработок ВКМС на территории промышленных площадок Березниковского калийного производственного рудоуправления "Уралкалий" (БКПРУ-3, г. Березники, Россия), были отобраны образцы шламов и почв, а также образцы донных отложений сточного канала предприятия "Промканал" (г. Березники), рассолосборника у солеотвала БКПРУ-3 и реки Зырянки, протекающей в непосредственной близости от предприятия БКПРУ-1. Определение концентрации катионов Na⁺, K⁺, Ca^{2+,} Mg²⁺, органических загрязнителей, а также общей минерализации в отобранных образцах (табл. 1) проводили общепринятыми методами, как описано в работе [17].

Среды и условия культивирования. Для выделения бактерий-деструкторов фталатов использовали метод накопительных культур (**HK**). Исследуемые образцы весом 1 г помещали в колбы объемом 250 мл со 100 мл минеральной среды Раймонда (**MCP**) [18] с добавлением NaCl (30 г/л) и ОФК (1 г/л) в качестве субстрата. Культивирование осуществляли в течение 2 нед. при температуре 28°C.

Чистые культуры бактерий выделяли путем высева суспензии полученных НК на агаризованную богатую среду Раймонда (**БСР**) с добавлением триптона и дрожжевого экстракта (5 и 2.5 г/л, соответственно) с 30 г/л NaCl. Для исследования отбирали бактерии, различающиеся морфологией колоний, которые в дальнешем проверяли на способность к росту на ОФК (1 г/л) в жидкой МСР.

ДНК-типирование. Штаммы бактерий-деструкторов ОФК, характеризующиеся одинаковой морфологией колоний и ростом в жидкой МСР с ОФК (1 г/л), определяли с использованием молекулярно-генетического метода REP-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся экстрагенетических палиндромных последовательностей ДНК) с использованием праймеров REP 1R (5'-IIIIC-GICGICATCIGCC-3') и REP 2I (5'-ICGICTTAT-CIGGCCTAC-3') в соответствии с методикой [19]. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1.5% агарозном геле в 1 × ТБЭ-буфере (трис-борат-ЭДТА) в течение 2 ч при напряжённости электрического поля 5.7 V/см [20].

Идентификацию бактерий. Идентификацию осуществляли на основании анализа генов 16S рРНК. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') на амплификаторе Му Сусlег "Віо-Rad Laboratories" (США) согласно описанию [21]. Определение нуклеотидных последовательностей проводили с применением набора реактивов Від Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 ("Thermo Fisher Scientific", США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL "Applied Biosystems" (США) согласно рекомендациям производителя.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рДНК проводили с использованием программ CLUSTAL W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw), Sequence Scanner v 2.0. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и EzBio-Cloud (http://www.ezbiocloud.net/identify).

Культивирование бактерий на ароматических субстратах при различном уровне осмолярности среды и pH. Рост бактерий на ОФК, ДБФ, ДЭФ и других ароматических субстратах (нафталине, бифениле, протокатеховой, салициловой, бензойной и гентизиновой кислотах) оценивали при культивировании в жидкой МСР, содержащей NaCl (30 г/л) и ароматический субстрат (1 г/л), на термошейкере при 100 об./мин и 28°С. Органические кислоты вносили в среду в виде водных растворов натриевых солей (в пересчете на кислоту — 1 г/л). Оценку роста культуры осуществляли путем измерения оптической плотности (**OII**) среды на спектрофотометре UVVisible BioSpec-mini "Shimadzu" (Япония) при 600 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. При выращивании в жидких средах ОП₆₀₀ < 0.3 ед. оценивали как слабый рост, ОП₆₀₀ = (0.3 – 0.4) ед. – средний рост, ОП₆₀₀ > 0.4 ед. – хороший рост.

Способность бактерий к росту при разных условиях засоления (0 – 120 г/л NaCl) определяли на агаризованной БСР. Бактерии культивировали при температуре 28°С, рост оценивали через 3 сут по диаметру колоний. Колонии диаметром 0.1 см оценивали как слабый рост, диаметром от 0.1 до 0.2 см – как средний и диаметром от 0.2 см и выше – хороший рост.

Деструкция ДБФ и ДЭФ. Оценку разложения ДБФ и ДЭФ бактериями осуществляли методом ГЖХ-МС. Штаммы выращивали в жидкой МСР, содержащей 30 г/л NaCl и субстрат – ДБФ или ДЭФ (500 мг/л) в течение 72 ч при 28°С на роторном шейкере (150 об/мин). Клетки собирали центрифугированием (12000 g, 5 мин) и отмывали МСР. Отмытые дважды клетки (20 мкл, $O\Pi_{600} =$ = 2.0) инокулировали в 2 мл МСР, содержащей ДБФ или ДЭФ (500 мг/л) не содержащей хлорид натрия, а также в присутствии 50, 70 и 90 г/л Na-Cl, и инкубировали при 28°C в течение 3 сут при аэрации на роторном шейкере (150 об./мин) [10]. Экстракцию ДБФ и ДЭФ осуществляли равным объемом гексана в течение 120 мин на шейкере при 100 об./мин. Остаточную воду удаляли из образцов путем введения безводного сульфата натрия. Анализ проводили на газовом хроматографе-масс-спектрометре "Agilent GC 7890A MS 5975С Inert XL EI/CI" (США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS SN US 15189741-1 $(30 \times 0.25 \text{ мм})$, газ-носитель — гелий (1 мл/мин), температура испарителя – 230°С, объем пробы – 0.2 мкл. Идентификацию хроматографических пиков проводили по временам удерживания и массспектрам (электронная библиотека масс-спектров NIST 98). Количество фталатов оценивали по площади пика по калибровочному графику.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика образцов почв и донных отложений. При анализе отобранных в районе промышленных солеразработок (г. Березники) образцов установлено, что наиболее высокая минерализация (12.1%) и концентрация ионов Na⁺ (24099.5 мг/кг) и K⁺ (11027.3 мг/кг) была обнаружена в образце, отобранном с поверхности шла-

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ФТАЛАТОВ

Tuominu 2. Daktepi	и деструкторы о 4 к из р	unonu eostepuspuoorok	
Штамм	Источник выделения	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S pPHK, %
PG1		Halomonas alkaliantarctica CRSS ^T (AJ564880)	100
PG2		Pseudomonas xanthomarina KMM 144 ^T (AB176954)	100
1BR		Dietzia cercidiphylli YIM65002 ^T (EU375846)	100
PD13-62	Донные отложения,	Stappia indica B106 ^T (EU726271)	99.80
PD13-5	промышленный	Halomonas titanicae B1 ^T (AOPO01000038)	99.28
B23	канал	Alcanivorax dieselolei B5 ^T (DSM16502)	100
PD13-42		Stappia indica B106 ^T (EU726271)	99.88
1B3		Rhodococcus qingshengii JCM 15477 ^T (LRRJ01000016)	100
PD13-22		Bacillus vietnamensis B-23890 ^T (CLG_48530)	99.76
PSH17-4		Martelella radices BM5-7 ^T (KF560339)	99.42
PSH17-52		Martelella radices BM5-7 ^T (KF560339)	96.72
PP23-2		Oceanisphaera donghaensis BL1 ^T (DO190441)	100
PP22-1		<i>Rhodococcus jialingae</i> djl-6-2 ^T (DQ185597)	99.73
PSH17-51	Шламохранилище	<i>Rhodococcus degradans</i> CMM4446 ^T (JQ776649)	100
PP22-23		Marinobacter guineae M3B ^T (AM503093)	100
PP22-31		Breoghania corrubedonensis UBF-P1 ^T (CQ272328)	99.37
PSH17-1		Idiomarina fontislapidosi F23 ^T (AY526861)	99.43
PSH18-3		Nitratireductor aquimarinus CL-SC21 ^T (HQ176467)	100
PD10-1	Донные отложения,	<i>Rhodococcus jialingae</i> djl-6-2 ^T (DQ185597)	100
PD10-2	рассолосборник	Idiomarina loihiensis L2TR ^T (AE017340)	100
PB8-2	Ризосферная почва,	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 ^T (AE017340)	99.5
PB8-4	солеотвал	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1 ^T (AF118020)	99.53
PD11-22	-	Bacillus vietnamensis 15-1 ^T (AE017340)	99.26
PD11-41	Донные отложения,	<i>Erythrobacter citreus</i> RE35F/1 ^T (AF118020)	99.3
PD11-42	р. эырянка	<i>Rhodococcus jialingae</i> djl-6-2 ^T (DQ185597)	99.75

том 55

№ 4

2019

Таблица 2. Бактерии-деструкторы ОФК из района солеразработок

мохранилища БКПРУ-3. Высокие показатели минерализации были определены в образце донных отложений рассолосборника (солеотвал БКПРУ-3) (табл. 1). Значительные концентрации органических загрязнителей, в частности фталатов (18.5 мг/кг), нафталина (105.1 мг/кг) и алканов (16001.7 мг/кг), выявлены в образце, отобранном из донных отложений промышленного канала. Наиболее высокое содержание фталатов (40.3 мг/кг) обнаружено в образце донных отложений р. Зырянка: концентрация ДБФ в данном образце составляло 5.5 мг/кг, а бутилоктилфталата – 34.8 мг/кг (табл. 1).

Идентификация и субстратная специфичность бактерий-деструкторов ОФК. Из исследуемых образцов донных отложений, почвы и шламов, отобранных в районе промышленной добычи и переработки солей (г. Березники), методом накопительного культивирования было выделено 25 бактериальных штаммов, способных к росту в

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

жидкой минеральной среде на ОФК (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии (табл. 2).

Сходные по морфологическим признакам (морфология колоний) и выделенные из разных экотопов культуры были типированы методом REP-ПЦР (данные не показаны). Представители каждой геномогруппы были идентифицированы на основе анализа гена 16S pPHK. Среди изолятов выявлены представители 4 классов (Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria) и 14 родов: Bacillus, Rhodococcus, Dietzia, Halomonas, Idiomarina, Stappia, Martelella, Erythrobacter, Alcanivorax, Marinobacter, Oceanisphaera, Pseudomonas, Nitratireductor, Breoghania (табл. 2).

Было установлено, что штаммы PP22-1, PD10-1, PD11-42, выделенные из разных экотопов, близкородственные виду *Rhodococcus jialingae* имеют идентичные REP-PCR профили, однако отлича-

ЯСТРЕБОВА и др.

	Субстрат								
Штамм	ДБФ	ДЭФ	ПКК	СалК	БК	ГК	ПОБК	Нафталин	Бифенил
Halomonas sp. PG1	++	+	++	_	++	++	_	+	_
Pseudomonas sp. PG2	++	+	++	+_	++	_	+	_	_
Dietzia sp. 1BR	++	+	+	_	++	_	+	_	_
Stappia sp. PD13-62	+/-	+/-	+	_	_	_	-	_	+
Halomonas sp.PD13-5	_	+	+	_	+	_	-	_	_
Alcanivorax sp. B23	_	+	++	_	+	_	-	_	_
Stappia sp. PD13-42	_	_	+	_	_	_	_	_	_
Rhodococcus sp. 1B3	_	_	+	_	+	+/-	+	_	_
Bacillus sp. PD13-22	_	_	+	+	+/-	_	_	+	_
Martelella PSH17-4	+	+	++	_	+	_	+	+	++
Martelella sp.PSH17-52	+	+	++	_	_	_	_	_	_
Oceanisphaera sp. PP23-2	++	+	++	_	++	_	+	_	_
Rhodococcus sp. PP22-1	++	+	++	+/-	++	+/-	_	++	+
Rhodococcus sp. PD17-51	_	_	++	_	++	_	_	_	+
Marinobacter sp. PP22-23	_	_	+	_	_	_	_	_	_
Breoghania sp. PP22-31	_	_	+	+	+	_	_	++	+
Idiomarina sp. PSH17-1	+	_	++	+	_	+	+	_	_
Nitratireductor PSH18-3	_	_	+	_	_	_	_	+	_
Rhodococcus sp. PD10-1	++	+	++	_	_	_	_	_	_
Idiomarina sp. PD10-2	+/-	+_	+	_	_	_	+	_	_
Bacillus sp. PB8-2	+/-	_	++	_	+	_	+	_	_
Erythrobacter sp. PB8-4	_	—	+	_	—	++	_	_	_
Bacillus sp. PD11-22	+/-	+/-	+	—	—	—	+	—	—
Erythrobacter sp. PD11-41	+/-	+/-	+	—	—	—	_	++	—
Rhodococcus sp PD11-42	+/_	+/_	+	_	_	_	_	++	_

Таблица 3. Рост бактерий-деструкторов ОФК на ароматических углеводородах

Примечание. ПОБК — пара-оксибензойная кислота; ПКК — протокатеховая кислота; СалК — салициловая кислота; БК — бензойная кислота; ГК — гентизиновая кислота; "+/—" — слабый рост ($O\Pi_{600} < 0.3$); "+" — $O\Pi_{600} = 0.3 - 0.4$; "++" — хороший рост ($O\Pi_{600} > 0.4$); "—" — отсутствие роста.

лись по способности к утилизации нафталина и бифенила (табл. 3). Штамм Rhodococcus sp. PP22-1 обладал наиболее широкой субстратной специфичностью и был способен, кроме деструкции фталатов (ОФК, ДБФ, ДЭФ), к росту на бензоате, салицилате, гентизате, нафталине и бифениле. Грамотрицательные штаммы Martelella sp. PSH17-4, Halomonas sp. PG1 также осуществляли разложение различных ароматических соединений, используя их в качестве субстратов (табл. 3). Штаммы PB8-4 и PD11-41, проявляющие наибольшее филогенетическое сходство с видом Erythrobacter citreus (99.53 и 99.3%, соответственно), принадлежали к разным геномогруппам по результату анализа REP-PCR и росли на различных по химической природе субстратах (ДБФ, ДЭФ, нафталин, гентизат). Штаммы PD13-22, PB8-2, PD11-22, близкородственные виду Bacillus vietnamensis и выделенные из донных отложений промканала, реки Зырянка и ризосферной почвы, образуют одну геномогруппу. В тоже время данные штаммы отличались по способности к утилизации ароматических субстратов (ДБФ, ДЭФ, нафталина, салицилата, бензоата) (табл. 3).

Отношение бактерий-деструкторов ОФК к засолению и pH среды. Большинство изолированных штаммов-деструкторов ОФК были способны к росту как в среде без добавления соли, так и при повышенном засолении среды (до 90–120 г/л NaCl) (табл. 4) и были отнесены к галотолерантным микроорганизмам [22]. Штамм *Idiomarina* sp. PSH17-1 (наибольшее сходство по гену 16S pPHK с *Idiomarina fontislapidosi* F23^T), изолированный из шламохранилища соледобывающего предприятия, не был способен к росту без NaCl в среде культивирования.

Все изоляты росли в диапазоне рН 6-8. Штаммы Oceanisphaera sp. РР23-2 и Rhodococcus sp. РР22-1 — алкалофильные бактерии, способные к росту при рН среды выше 9. Штаммы Dietzia sp. 1BR, Rhodococcus sp. PD10-1, Idiomarina sp. PD10-2 и Martelella sp. PSH17-4 росли на БСР при рН 5.0.

Деструкция ДБФ и ДЭФ. Восемь штаммов-деструкторов ОФК активно росли на ДБФ и ДЭФ, используя эти субстраты в качестве единственно-

2019

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ФТАЛАТОВ

	NaCl, г/л							
штамм	без NaCl	30	50	70	90	100	120	
Rhodococcus sp. PD10-1	++	++	++	++	+	+/-	_	
Rhodococcus sp. PD17-51	++	++	++	+	+/-	_	_	
Rhodococcus sp. PP22-1	++	++	++	++	+	+/-	+/-	
Rhodococcus sp. PD11-42	++	++	++	+	+	+/-	_	
Rhodococcus sp. 1B3	++	++	++	++	+	+/-	+/-	
Bacillus sp. PB8-2	++	++	+	+	+/-	+/-	_	
Bacillus sp. PD11-22	++	++	+	+/-	_	_	_	
Bacillus sp. PD13-22	+	++	++	++	+/-	+/-	+/-	
Dietzia sp. 1BR	++	++	++	++	+	+/-	+/-	
Idiomarina sp. PSH17-1	_	++	++	++	+	+/-	+/-	
Idiomarina sp. PD10-2	+	++	++	++	+	+/-	+/-	
Halomonas sp. PG1	+	++	++	++	+	+/-	+/-	
Halomonas sp. PD13-5	+	++	++	+	+	+/-	_	
Pseudomonas sp. PG2	++	++	++	+	+	_	_	
Oceanisphaera sp. PP23-2	++	++	++	+	+/-	_	_	
Marinobacter sp. PP22-23	+/-	++	++	+	+	+/-	+/-	
Martelella PSH17-4	+/-	++	++	++	+	+/-	+/-	
Martelella sp. PSH17-52	+/-	++	++	++	+	+/-	+/-	
Alcanivorax sp. B23	++	++	++	++	+	+/-	+/-	
Stappia sp. PD13-62	++	++	++	+	+/-	_	_	
Stappia sp.PD13-42	++	++	++	+	+/-	_	_	
Breoghania sp. PP22-31	+/-	++	++	+	+/-	_	_	
Erythrobacter sp.PD11-41	++	++	+	+	+/-	—	—	
Erythrobacter sp. PB8-4	++	++	+	+	+/-	—	—	
Nitratireductor PSH18-3	++	++	+	+/-	+/-	—	—	

Таблица 4. Рост бактерий-деструкторов ОФК при разных концентрациях NaCl

Примечание. "+/—" — диаметр колоний менее 0.1 см, слабый рост; "+" — диаметр 0.1-0.2 см; "++" — диаметр 0.2 см и больше, хороший рост; "—" — отсутствие роста.

го источника углерода и энергии (табл. 3). Эти штаммы исследовали более подробно. Показано, что отобранные штаммы-деструкторы способны к росту на протокатеховой кислоте (**ПКК**) – основном метаболите, образующемся при деструкции ОФК (табл. 3). Из литературных источников известно, что дальнейшее разложения ПКК осуществляется при расщеплении ароматического кольца по *мета*- или *орто*-пути до основных метаболитов клетки [1, 14].

Было изучено влияния засоления среды на деструкцию ДБФ и ДЭФ у активных бактерий-деструкторов (табл. 5, 6). Показано, что большинство штаммов (*Halomonas* sp. PG1, *Pseudomonas* sp. PG2, *Oceanisphaera* sp. PP23-2, *Dietzia* sp. 1BR, *Rhodococcus* sp. PP22-1) в течение 72 ч утилизировали от 90.6 до 98.6% ДБФ в среде без добавления соли и при содержании NaCl в среде 50 г/л. Повышение содержания NaCl в среде до 70 г/л существенно не влияло на деструкцию ДБФ данными штаммами. У штамма *Oceanisphaera* sp. PP23-2 повышение концентрации соли приводило к снижению степени деструкции ДБФ до 79.6 и 75.7% при 70 и 90 г/л NaCl соответственно. Утилизация ДЭФ этими штаммами составляла от 62.0 до 79.0% при содержании NaCl в среде до 70.0 г/л (табл. 6). Существенное снижение степени разложения ДЭФ для исследуемых штаммов наблюдалось при концентрации NaCl 90 г/л (до 46–65%).

У штамма *Rhodococcus* sp. PD10-1 показатели утилизации ДБФ были выше при содержании соли в среде 50 и 70 г/л – (90 и 98.9% соответственно), по сравнению с экспериментом, где соль не добавляли, или вносили 90 г/л NaCl (78.2 и 80% соответственно). Наиболее высокие значения утилизации ДЭФ для данного штамма наблюдали в присутствии 50 и 70 г/л NaCl (65.0 и 68.6% соответственно).

Штаммы-деструкторы рода *Martelella* демонстрировали более низкие показатели деструкции обоих субстратов по сравнению со степенью деструкции фталатов другими штаммами, как при отсутствие соли в среде культивирования, так и при всех исследуемых повышенных концентрациях (табл. 5, 6).

Способность к утилизации ДБФ и ДЭФ показана для различных по таксаномической принадлежности бактерий. Так, описана способность *Acineto*-

том 55 № 4 2019

Штоми	NaCl, г/л							
штамм	без NaCl	50	70	90				
Halomonas sp. PG1	92.0 ± 4.8	94.0 ± 4.4	97.2 ± 1.2	88.8 ± 5.2				
Pseudomonas sp. PG2	99.6 ± 1.0	98.6 ± 1.0	98.0 ± 1.4	88.0 ± 6.6				
Oceanisphaera sp. PP23-2	90.6 ± 4.6	92.0 ± 3.6	79.6 ± 3.0	75.0 ± 4.7				
Dietzia sp. 1BR	91.5 ± 4.9	92.0 ± 4.2	92.4 ± 5.6	86.0 ± 5.8				
Rhodococcus sp. PP22-1	95.6 ± 2.8	95.8 ± 3.6	90.8 ± 7.6	80.2 ± 6.0				
Martelella sp. PSH17-4	63.4 ± 3.4	65.2 ± 2.8	56.2 ± 2.8	48.0 ± 2.2				
Rhodococcus sp. PD10-1	78.2 ± 1.8	90.0 ± 4.0	98.9 ± 1.1	80.0 ± 3.0				
Martelella sp. PSH17-52	73.0 ± 0.8	76.0 ± 4.0	62.2 ± 2.0	50.0 ± 2.8				

Таблица 5. Степень утилизации ДБФ (%) при разной солености среды

Таблица 6. Степень утилизации ДЭФ (%) при разной солености среды

Штамм	NaCl, г/л							
	без NaCl	50	70	90				
Halomonas sp. PG1	64.6 ± 4.1	75.3 ± 7.3	69.0 ± 5.0	59.3 ± 3.4				
Pseudomonas sp. PG2	71.0 ± 2.0	80.6 ± 3.4	74.5 ± 4.0	60.0 ± 2.0				
Oceanisphaera sp. PP23-2	74.3 ± 5.2	72.1 ± 4.3	61.3 ± 3.4	54.3 ± 6.6				
Dietzia sp. 1BR	59.0 ± 4.8	76.0 ± 2.0	64.2 ± 1.2	58.0 ± 2.0				
Rhodococcus sp. PP22-1	56.6 ± 4.2	62.0 ± 7.0	56.0 ± 5.8	53.3 ± 7.3				
Martelella sp. PSH17-4	62.6 ± 4.0	79.0 ± 7.0	73.2 ± 3.0	49.0 ± 6.0				
Rhodococcus sp. PD10-1	49.3 ± 4.1	65.0 ± 3.0	68.6 ± 3.4	46.0 ± 4.3				
Martelella sp. PSH17-52	73.7 ± 2.1	78.3 ± 4.2	70.8 ± 2.0	65.0 ± 2.0				

bacter lwoffii к полной деградации ДБФ (20 мг/л) в течение 5 сут. штамма *Bacillus* sp. SASHJ – к утилизации ДБФ (100 мг/л) в течение 3 сут, а также штамма Serratia marcescens C9 – к деструкции ДБФ (100 мг/л) за 3 сут [1, 24, 25]. Для ряда грамотрицательных штаммов описана способность к утилизации ДЭФ, в частности, для штамма Sphingomonas sp. C28242 - к деструкции ДЭФ (450 мг/л) в течении 120 ч [6], для штамма Acinetobacter sp. JDC-16 - в течении 28 ч [26]. Полная деструкция ДБФ и ДЭФ (300 мг/л) в течении 30 ч описана для штамма Variovorax sp. BS1 [27]. Исследуемые в работе штаммы утилизировали сложные эфиры фталевой кислоты – ДБФ и ДЭФ при их концентрации в среде 500 мг/л как в отсутствие соли, так и в присутствии 90 г/л NaCl в среде культивирования, что позволило отнести их к эффективным деструкторам фталатов, адаптированным к росту и потреблению этих субстратов в условиях высокого засоления среды. Разложение фталатов в условиях повышенной солености среды описано всего для нескольких бактерий — у штамма Sphingobium sp. TJ, утилизирующего ДБФ (500 мг/л) при содержании до 40 г/л NaCl в среде, а также для штамма *Rhodococcus* sp. YC-YT1, способного к росту на диэтилгексилфталате в присутствии 0120 г/л NaCl [8, 16]. Кроме того, в литературе не представлено данных о способности бактерий родов *Idiomarina* и *Oceanisphaera* к росту на ОФК и ее производных. В единичных сообщениях приводятся данные о способности бактерий родов *Halomonas* и *Martelella* к деструкции ОФК [23], но не исследованы физиологические и молекулярнобиологические особенности разложения этих соединений.

Таким образом, выделенные из техногеннозагрязненных/засоленных образцов (почв, донных отложений водных объектов и шламохранилищ, расположенных на территории соледобывающего предприятия) бактерии-деструкторы фталатов (ОФК, ДБФ, ДЭФ) характеризовались таксономическим разнообразием, обладали широкой субстратной специфичностью, способностью к эффективной утилизации ДБФ и ДЭФ при повышенном засолении среды. Выявленные особенности этих бактерий указывают на их перспективность для применения в качестве биологических объектов при разработке новых методов биоремедиации засоленных почв, загрязненных фталатами.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353247,

а также при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 16-44-590968 р_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Liang D.W., Zhang T., Fang H.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. № 2. P. 183–198.
- Zeng F, Cui K.Y., Xie Z.Y., Liu M., Li Y.J., Lin Y.J. // Environ. Int. 2008. V. 34. P. 372–380.
- 3. Yuan S.Y., Liu C., Liao C.S., Chang B.V. // Chemosphere. 2002. V. 49. № 10. P. 1295–1299.
- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P. // Environ. Health Perspect. 1995. V. 103. № 6. P. 582–587.
- 5. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. // Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2006. Т. 2. С. 7–9.
- Fang H.H.P., Liang D., Zhang T. // Bioresour. Technol. 2007. V. 198. P. 717–720.
- 7. *Kumar V., Sharma N., Maitra S.S.* // Biotechnology Reports. 2017. V. 15. P. 1–10.
- Yang T., Ren L., Jia Y., Fan S., Wang J., Wang J., Nahurira R., Wang, H., Yan Y. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018. V. 15. 964.
- Liang R., Wu X., Wang X., Dai Q., Wang Y. // J. Cent. South Univ. Technol. 2010. V. 17. P. 959–966.
- Wen Z.D., Gao D.W., Wu W.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 4683–4690.
- Navacharoen A., Vangnai A.S. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2011. V. 65. № 6. P. 818–826.
- 12. Cartwright C.D., Owen S.A., Thompson I.P., Burns R.G. // FEMS Microbiol. Letters. 2000. V. 186. № 1. P. 27–34.

- Chang H.-K., Zilstra J.G. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 24. P. 6529–6537.
- Vamsee-Krishna C., Phale P.S. // Indian J. Microbiol. 2008. V. 48. P. 19–34.
- 15. Iwaki H., Nishimura A., Hasegawa Y. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. P. 1321–1325.
- Jin D., Kong X., Cui B., Bai Z., Zhuang H. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 24046–24054.
- 17. Корсакова Е.С., Шестакова Е.А., Хайрулина Е.А., Назаров А.В. // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18). № 2 (1). С. 591–593.
- 18. *Розанова Е.П., Назина Т.Н. //* Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. // Meth. Mol. Cell. Biol. 1994. V. 5. P. 25–40.
- 20. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. //* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 390 с.
- 21. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 2. P. 697–703.
- 22. Кашнер Д. // Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 365 с.
- Monzon G.C., Nisenbaum M., Seitz M.K.H., Murialdo S.E. // Current Microbiology. 2018. V. 75. P. 1108– 1118.
- 24. *Li C., Tian X.L., Chen Z.S., Yu D., Deng J.Y., Xu H Afr.* // J. Microbiol. Res. 2012. V. 6. №11. P. 2686–2693.
- 25. *Wu Q., Liu H., Ye L.S., Li P., Wang Y.H.* // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2013. V. 76. P. 102–107.
- 26. *Liang R., Wu X., Wang X., Dai Q., Wang Y. //* J. Cent. South Univ. Technol. 2010. V. 17. P. 959–966.
- 27. *Prasad B., Suresh S.* // Int. J. Environ. Sci. Develop. 2012. V. 3. № 3 P. 283-288.

Bacteria-Destructors of Phthalates, Isolated from the Area of Industrial Mining and Processing of Potassium-Magnesium Salts

O. V. Yastrebova^{*a*}, *, A. A. Pyankova^{*a*}, and E. G. Plotnikova^{*a*}

^aInstitute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia *e-mail: olvastr@mail.ru

Receive: November 03, 2018; revised December 27, 2018; accepted February 20, 2019

Twenty five halotolerant bacteria-destructors of ortho-phthalic acid (ortho-PA) were taken from the soil samples, sludge and bottom sediments, sampled in the area of salt-mining enterprises (Berezniki, Russia). Based on the analysis of 16S rRNA gene fragment, isolated strains have been identified as members of the genera *Rhodo-coccus, Dietzia, Bacillus, Halomonas, Pseudomonas, Idiomarina, Stappia, Martelella, Erythrobacter, Alcanivorax, Marinobacter, Oceanisphaera, Nitratireductor, Breoghania.* Eight strains-destructors of ortho-PA were capable of using phthalic acid esters – dibutyl phthalate (DBP) and diethyl phthalate (DEP) as a sole sources of carbon and energy. Strains utilized 90–98% DBP and 49–80% DEP (phthalate concentration 500 mg/L) without salt in the culture medium and in the presence of 50 g/L NaCl. Increasing the NaCl concentration in a liquid medium to 70 and 90 g/L did not significantly affect the decomposition of phthalates. The ability of the bacteria of genera *Halomonas, Martelella* and *Oceanisphaera* to degrade DBP and DEP is shown for the first time. Revealed strains-destructor of phthalate (ortho-PA, DEP and DBP) are promising for the development of new methods for bioremediation of saline soils contaminated with phthalates.

Keywords: halotolerant bacteria, destruction, ortho-phthalic acid, dibutyl phthalate, diethyl phthalate, saline soils