

DOI: 10.15593/2224-9400/2020.4.03

УДК 579.26:579.222

А.А. Пьянкова, Е.Г. ПлотниковаИнститут экологии и генетики микроорганизмов –
филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия**БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ
РОДА *HALOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РАЙОНА
СОЛЕРАЗРАБОТОК**

Накопление бензойной кислоты в окружающей среде обусловлено широким использованием данного соединения в промышленных процессах. Разложение бензойной кислоты в природе осуществляется в основном аэробными бактериями. Однако биоразложение в экстремальных условиях, таких как засоление, может протекать с низкой скоростью или эффективностью. Поэтому исследования по поиску галофильных/галотолерантных бактерий-деструкторов являются актуальными для разработки технологий восстановления загрязненных территорий с повышенным содержанием солей.

*В настоящей работе исследовано филогенетическое разнообразие бактерий-деструкторов бензойной кислоты, выделенных из различных образцов с территории солеразработок (Верхнекамское месторождение солей, Пермский край). Показано, что исследуемые бактерии филогенетически близки по гену 16S рРНК типовым штаммам рода *Halomonas*, видов *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. radices* и *H. utahensis*. Обнаружено два штамма с низким уровнем сходства по гену 16S рРНК (98,59–98,84 %) с типовыми штаммами узаконенных видов, которые могут представлять новые таксономические единицы. С помощью типирования методом ВОХ-ПЦР показано, что исследуемые штаммы различаются на уровне геномов.*

Проверка устойчивости бактерий к содержанию NaCl в среде культивирования показала, что исследуемые штаммы являются галофильными и галотолерантными организмами. Установлено, что все исследуемые штаммы растут при содержании 70–150 г/л NaCl в среде. Ряд штаммов способны к росту при более высоких концентрациях хлорида натрия (200–250 г/л).

*Все исследуемые штаммы рода *Halomonas* способны использовать бензойную кислоту в качестве единственного источника углерода и энергии при повышенной солености среды (30 г/л NaCl). Кроме того, у всех бактерий методом ПЦР выявлен ген *benA*, кодирующий α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы – ключевого фермента деструкции бензойной кислоты.*

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, бензойная кислота, *Halomonas*, ПЦР, ген 16S рРНК, *benA*, хлорид натрия.

A.A. Pyankova, E.G. Plotnikova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**BACTERIA-DESTRUCTORS OF BENZOIC ACID
OF THE GENUS *HALOMONAS* ISOLATED
FROM THE SALT-MINING REGION**

The accumulation of benzoic acid in the environment is due to the widespread use of this compound in industrial processes. Decomposition of benzoic acid in nature is carried out mainly by aerobic bacteria. However, biodegradation under extreme conditions such as salinity can proceed at a slow rate or efficiency. Therefore, studies on the search for halophilic/halotolerant bacteria-destroyers are relevant for the development of technologies for the restoration of contaminated areas with an increased salt content.

*In this work, we investigated the phylogenetic diversity of benzoic acid degrading bacteria isolated from various samples from the salt-mining region (Verkhnekamsky salt deposit, Perm krai). Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene revealed that the studied bacteria are most closely related to the type strains of the genus *Halomonas* of the species *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. radices*, and *H. utahensis*. Two strains show a low level of 16S rRNA similarity (98.59-98.84%) with the type strains of species with validly published names and may represent new taxons. Analysis by BOX-PCR revealed that the studied strains differ at the genome level.*

Cultivation of bacteria on media with different NaCl concentrations showed that the studied strains are halophilic and halotolerant organisms. It was found that the optimal growth of all the studied strains was observed at 70-150 g/l NaCl in the medium. A number of strains are capable to grow at higher concentrations of sodium chloride in the medium (200-250 g/l).

*All studied strains of the genus *Halomonas* are able to use benzoic acid as the only source of carbon and energy at increased salinity (30 g/l NaCl). In addition, the *benA* gene encoding the alpha subunit of benzoate 1,2-dioxygenase, the key enzyme for the destruction of benzoic acid, was detected in all bacteria by PCR.*

Keywords: *bacteria-destroyers, benzoic acid, Halomonas, PCR, 16S rRNA gene, benA, NaCl.*

Процессы промышленной добычи и переработки солей Верхнекамского месторождения (ВКМС, Пермский край) приводят к формированию природно-антропогенных ландшафтов, подходящих для существования галотолерантных и галофильных микроорганизмов. К такой группе экстремофилов относятся бактерии рода *Halomonas* (класс *Gamma*proteobacteria, семейство *Halomonadaceae*), которые часто используются в качестве модельных организмов при изучении механизмов осмоадаптации и клеточного взаимодействия («чувства

кворума»), а также представляют интерес для применения в биотехнологических целях, таких как синтез экзополисахаридов и полимеров (в том числе полигидроксиалканоатов) стимулирование роста растений, деградация токсичных соединений при повышенных концентрациях солей [1–3].

Бензойная кислота является простейшей одноосновной карбоновой кислотой ароматического ряда. Накопление данного соединения в окружающей среде связано не только с метаболической активностью растений и бактерий, но и с антропогенной деятельностью. Бензойная кислота и ее производные служат сырьем для получения целого спектра химических соединений, применяются при консервировании пищевых продуктов, в медицине и парфюмерной промышленности. Кроме того, бензойная кислота является продуктом окислительного катаболизма многих ароматических углеводов. Проблема разложения бензойной кислоты является актуальной и в природе осуществляется рядом аэробных бактерий, в том числе галофильными бактериями рода *Halomonas*, что может быть перспективно для биоремедиации экстремально засоленных почв, водных объектов [4, 5]. У прокариот наиболее часто встречается метаболический путь разложения бензойной кислоты («классический» путь), который начинается с внедрения гидроксигрупп в химически стабильное ароматическое кольцо молекулы под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы (БДО) [6].

Цель настоящей работы – изучение разнообразия бактерий-деструкторов бензойной кислоты рода *Halomonas*, выделенных из различных биотопов района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей.

Экспериментальная часть. Для исследования из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН были отобраны бактерии рода *Halomonas*, выделенные из образцов ризосферы растений (*Chenopodium rubrum*, *Poa pratensis*, *Tussilago farfara*, *Dactylis glomerata*), почвы, грунта, отходов производства (шламохранилища, солеотвалы), рассолосборников района соле-разработок (г. Соликамск, г. Березники, Пермский край), характеризующихся разными уровнями засоления и загрязнения токсичными органическими соединениями (табл. 1). Также в работе был использован типовой штамм *H. taeanensis* DSM 16463^T.

Таблица 1

Идентификация бактерий-деструкторов бензойной кислоты
рода *Halomonas*, выделенных из района солеработок

Штамм	Образец выделения	Ближайший типовой штамм (номер в GenBank)	Сходст- во, %	Кол-во сравнивае- мых нук- леотидов
<i>Район солеработок, г. Березники</i>				
BBL18	Шламохранилище, 1 м от рассолосборника	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	100	706
BNL26		<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	99,66	881
BNL3-2		<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	100	772
BBL22	Шламохранилище, 3 м от рассолосборника	<i>H. alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)	99,74	761
PD13-5	Донные отложения, промканал	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	99,28	832
SMB31	Почва в 5 м от солеотвала	<i>H. taeanensis</i> BH539 ^T (AY671975)	99,93	1435
<i>Район солеработок, г. Соликамск</i>				
M135-4N	Ризосфера, марь красная (<i>Chenopodium rubrum</i>), около солеотвала	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	99,20	1378
PMK3	Почва около солеотвала	<i>H. ventosae</i> A112 ^T (AY268080)	98,84	1414
M56-1	Ризосфера, мятлик луго- вой (<i>Poa pratensis</i>), около солеотвала	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	99,36	1399
5RN1		<i>H. alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)	99,85	1338
M125-1	Ризосфера, мать-и-мачеха (<i>Tussilago farfara</i>), около солеотвала	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038) <i>H. utahensis</i> DSM 3051 ^T (AJ306893)	99,24	1316
NDT13	Ризосфера, ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>), за- грязнение дизельным то- пливом, около солеотвала	<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	100	890
NDT27		<i>H. titanicae</i> BH1 ^T (AOPO01000038)	100	909
NDT28		<i>H. neptunia</i> Eplume1 ^T (AF212202)	99,34	905

Окончание табл. 1

Штамм	Образец выделения	Ближайший типовой штамм (номер в GenBank)	Сходство, %	Кол-во сравниваемых нуклеотидов
NDT30	Почва, загрязненная дизельным топливом, около солеотвала	<i>H. olivaria</i> C17 ^T (DQ645593)	100	944
NDT31		<i>H. olivaria</i> C17 ^T (DQ645593)	100	949
6CN3-12	Соляная корка, дорога около солеотвала	<i>H. alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)	99,70	1351
8CN1-1		<i>H. alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)	99,71	1361
610-2	Донные отложения, рассолосборник около солеотвала	<i>H. ventosae</i> A112 ^T (AY268080)	99,77	863
61g		<i>H. radialis</i> EAR18 ^T (KU320882)	98,59	877

Бактерии культивировали в минеральной среде Раймонда (MCP) [7] с добавлением 30 г/л NaCl. В качестве субстрата добавляли бензойную кислоту (в виде 10%-ного раствора бензоата натрия) до конечной концентрации 1 г/л. Культивирование проводили на термостатируемом шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 140 об/мин в течение 14 дней. Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (Shimadzu, Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Для определения устойчивости к различным концентрациям соли (NaCl) в среде культивирования бактерии высевали на агаризованную богатую среду Раймонда (BCP), которую получали при добавлении к MCP 5 г/л триптона (Fluka, США), 2,5 г/л дрожжевого экстракта (Difco, США), в качестве ростовых субстратов, и агара (Helicon, Россия) до конечной концентрации 15 г/л. Количество NaCl в BCP составляло от 0 до 270 г/л. Рост бактерий осуществлялся в термостате при температуре 28 °С в течение 14 дней. Оценку роста бактерий проводили по появлению и размеру колоний.

Идентификацию изолятов проводили на основе морфологических, физиолого-биохимических исследований, а также путем определения и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК [8–10]. На настоящем этапе исследований было проведено уточнение филогенетического положения отобранных культур бактерий. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 16S рДНК прово-

дили с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>).

ДНК-типирование бактерий, идентифицированных как представители одного вида рода *Halomonas*, проводили методом ВОХ-ПЦР с использованием праймера ВОХА1R (5'-СТАСГГСААГГСГАСГСТГАСГ-3') на приборе С1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США), как описано в работе [11]. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле на 1х буфере ТВЕ (Трис – 10,8 г/л; борная кислота – 5,5 г/л; 0,5М ЭДТА – 4 мл; вода дистиллированная – 79,7 мл/л) в течение 1,5 ч при комнатной температуре, напряжении 5–15 В/см. Полученные фрагменты анализировали после окрашивания агарозных гелей раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 5–10 мин и фотографирования в УФ-свете с помощью системы гель-документирования BioDocAnalyze (Bio-Rad Laboratories, США). Для определения размеров фрагментов использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия).

Амплификацию гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, проводили с использованием праймеров: *benA-F* (5' -GCCACGAGAGCCAGATTCCC-3') и *benA-R* (5'-GGTGGCGGCGTAGTTCCAGTG-3'), как описано в работе [12]. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма-деструктора бензойной кислоты – *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7.

Результаты и их обсуждение. Путем скрининга 47 штаммов бактерий рода *Halomonas* из рабочей коллекции лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН на способность к росту на бензойной кислоте (БК) для дальнейших исследований было отобрано 20 штаммов (см. табл. 1). Также в работе был использован штамм *H. taeanensis* DSM 16463^T. При культивировании в жидкой минеральной среде Раймонда, где в качестве единственного источника углерода и энергии использовался бензоат, отобранные штаммы показали увеличение оптической плотности культуральной жидкости в пределах от 0,15 до 0,60 единиц (табл. 2).

У штаммов рода *Halomonas*, проявивших способность к росту на БК, было уточнено таксономическое (филогенетическое) положение. Так, в результате сравнения нуклеотидных последовательностей гена

16S рРНК исследуемых бактерий (длиной 706–1465 п. н.) и типовых штаммов рода *Halomonas* показано, что штаммы-деструкторы бензоата филогенетически близки видам: *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeanensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae* *H. radices* и *H. utahensis*, представители которых были изолированы из засоленных экотопов (см. табл. 1).

Таблица 2

Рост бактерий на бензойной кислоте и в присутствии различных концентраций хлорида натрия

Штамм	ОП ₆₀₀ (рост на БК)*	Рост на агаризованной БСР, концентрация в среде NaCl (г/л)					
		Без NaCl	70	100	150	200	250
BBL18	0,20	+++	+++**	+++	++	–	–
BNL26	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
BNL3-2	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
BBL22	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
PD13-5	0,15	–	++	+++	+	–	–
SMB31	0,20	–	+++	+++	+++	++	–
M135-4N	0,20	+++	+++	+++	+++	–	–
PMK3	0,15	–	+++	+++	+++	–	–
M56-1	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
5RN1	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
M125-1	0,20	+++	+++	+++	++	–	–
NDT13	0,15	+++	+++	+++	+++	–	–
NDT27	0,20	++	+++	+++	+++	+++	+
NDT28	0,20	+++	+++	+++	+++	+	–
NDT30	0,15	+++	+++	+++	++	–	–
NDT31	0,20	+++	+++	+++	+++	+	–
6CN3-12	0,15	+++	+++	+++	++	–	–
8CN1-1	0,20	+++	+++	+++	+++	–	–
610-2	0,60	–	+++	+++	+	–	–
61g	0,15	–	+++	+++	+	–	–
<i>H. taeanensis</i> DSM 16463 ^T	0,15	–	+++	+++	+++	+++	+++

*Культивирование бактерий осуществлялось в жидкой МСР с 30 г/л NaCl.

**Колонии диаметром до 2 мм оценивались как «+», 2–4 мм – «++», 5 мм и выше – «+++»; отсутствие роста бактерий обозначено «–».

Несмотря на видовое разнообразие, значительная часть исследуемых изолятов (9 штаммов) представлена бактериями, сходными на уровне 99,24–100 % с морским штаммом *H. titanicae* ВН1^Т [13]. Четыре изолята являются близкородственными (99,70–99,85 % сходства по гену 16S рРНК) с *H. alkaliantarctica* CRSS^Т, выделенным из соленого озера в Антарктике [14]. Также обнаружены бактерии (штаммы 61g и РМК3) с низким уровнем сходства по гену 16S рРНК (98,59–98,84 %) с типовыми штаммами видов *H. ventosae* [15] и *H. radices* [16] соответственно (см. табл. 1).

Исследовано генетическое разнообразие изучаемых штаммов методом ВОХ-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся ВОХ-элементов). Анализ электрофореграмм продуктов ВОХ-ПЦР показал, что все исследуемые штаммы проявляют генетическую гетерогенность и обладают уникальными ВОХ-профилями. На рис. 1 показаны ВОХ-профили девяти исследуемых штаммов рода *Halomonas*, близкородственных с *H. titanicae* ВН1^Т.

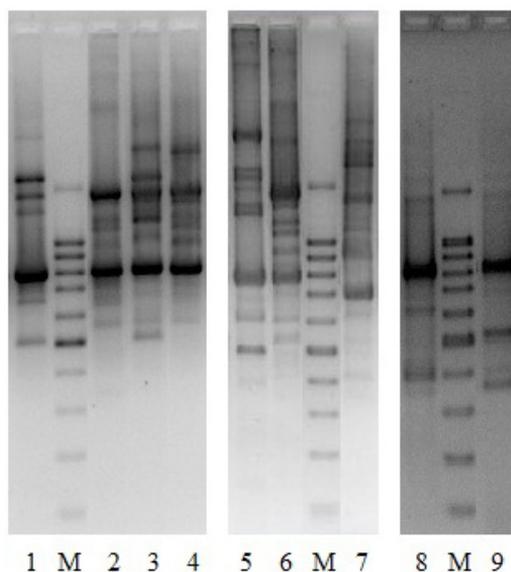


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ВОХ-ПЦР штаммов, близкородственных *H. titanicae* ВН1^Т: М – маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия); 1 – PD13-5; 2 – BNL3-2; 3 – BBL18; 4 – NDT13; 5 – M125-1; 6 – BNL26; 7 – NDT27; 8 – M56-1; 9 – M135-4N

Показано, что большинство штаммов способны к росту на агаризованной богатой среде как без добавления NaCl, так и с повышенной концентрацией соли (до 150 г/л), т.е. являются галотолерантными ор-

ганизмами [17]. Штаммы PD13-5, SMB31, PMK3, 610-2, 61g, а также типовой штамм *H. taeanensis* DSM 16463^T являются галофильными, оптимальное содержание NaCl в среде для роста этих штаммов составляет 70–150 г/л. Штаммы SMB31, NDT27, NDT28, NDT31, *H. taeanensis* DSM 16463^T способны к росту при более высоких концентрациях хлорида натрия в среде (200–250 г/л) (см. табл. 2).

В результате изучения биodeградационных свойств штаммов рода *Halomonas* было выявлено, что штаммы 610-2, BBL18, SMB31, M135-4N, M125-1, NDT27, NDT28, NDT31 и 8CN1-1 показали наиболее активный рост на БК (см. табл. 2). Разложение бензойной кислоты бактериями начинается с окисления молекулы под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы, состоящей из двух α - и двух β -субъединиц. Показано, что субстратная специфичность обуславливается α -субъединицей данного фермента [6]. В результате молекулярно-генетических исследований было установлено, что у всех исследуемых штаммов, в том числе у штамма *H. taeanensis* DSM 16463^T, присутствует ген *benA*, кодирующий α -субъединицу БДО. Так, при амплификации с использованием праймеров [18] и ДНК-матрицы исследуемых штаммов был получен продукт искомого размера (521 п. н.). На рис. 2 показана электрофореграмма продуктов амплификации гена *benA* нескольких штаммов рода *Halomonas*, близкородственных видам *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. taeanensis*, *H. titanicae* и *H. utahensis*.

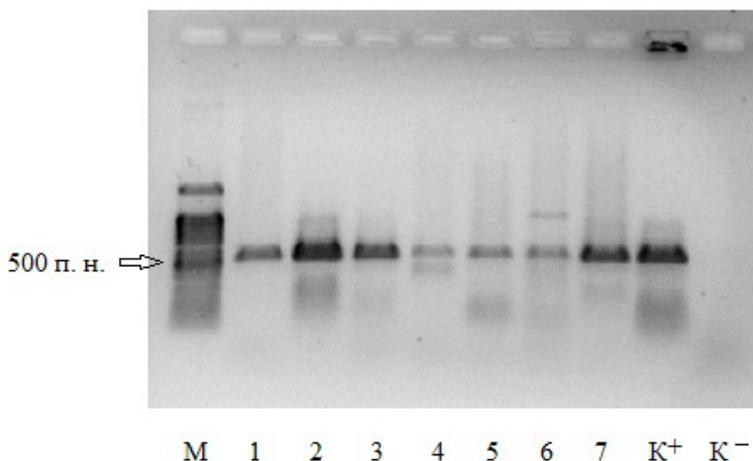


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *benA* штаммов рода *Halomonas*: М – маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия); 1 – PD13-5; 2 – M125-1; 3 – M135-4N; 4 – BBL22; 5 – M56-1; 6 – NDT28; 7 – SMB31; K⁺ – положительный контроль; K⁻ – отрицательный контроль

Заключение. Анализ литературных данных показал, что исследования бактерий-деструкторов бензойной кислоты рода *Halomonas* крайне немногочисленны. Способность к разложению бензойной кислоты описана для представителей видов *H. halodurans* [5] и *H. campisalis* [19], а также штамма *Halomonas* sp. KHS3, выделенного из загрязненной углеводородами морской воды [20]. В статье М.Т. Garcia с соавторами (2005) представлена способность к росту на БК в качестве единственного источника углерода и энергии почти у половины штаммов, близкородственным видам *H. elongata* и *H. eurihalina*, которые были выделены из образцов, отобранных вблизи нефтеперерабатывающих заводов и предприятий пищевой промышленности [4]. В результате наших исследований обнаружены бактерии, филогенетически близкие другим видам рода *Halomonas* (виды *H. alkaliantarctica*, *H. neptunia*, *H. olivaria*, *H. taeansensis*, *H. titanicae*, *H. ventosae*, *H. radices* и *H. utahensis*), для представителей которых ранее не была описана способность разлагать БК. Кроме того, выявлены бактерии-деструкторы БК с низким уровнем сходства по гену 16S рРНК с типовыми штаммами видов рода *Halomonas*, которые в дальнейшем могут быть описаны как новые таксоны.

Поскольку диоксигеназы, гидроксилирующие ароматическое кольцо, играют ключевую роль в разложении многочисленных труднодоступных соединений – загрязнителей окружающей среды, поиск и исследование гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, вызывает большой интерес исследователей [6, 21]. В литературе сообщается о наличии гена *benA* у типового штамма *H. organivorans* СЕСТ 5995^T, изолированного из гиперсоленой почвы на юге Испании [21]. Также ген *benA* найден у штаммов *Halomonas* sp. HL-93 [22], *Halomonas* sp. KO116 [23] и *H. hydrothermalis* Y2 [24]. В результате поиска в базах данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) наличие гена *benA* выявлено у типового штамма *H. ventosae* СЕСТ 5797^T (SNZJ01000041), а также ряда других штаммов рода *Halomonas*: *Halomonas* sp. TBZ202 (SBLD01000013), *H. xianhensis* 6_TX Ga0227260_113 (SOEC01000013), *H. aestuarii* Hb3 (CP018139), *Halomonas* sp. hl-4 (LT907845), *H. huangheensis* BJGMM-B45 (CP013106), *Halomonas* sp. RC (RZHD00000000), *Halomonas* sp. YLB-10 (RRCU00000000), *Halomonas* sp. ND22Bw (PXWD00000000), *H. desiderata* SP1 (MUMZ00000000), *Halomonas* sp. 'Soap Lake #7' (CP019915), *Halomonas* sp. BC-M4-5 (CP035042), *H. sulfidaeris* SST4

(QNTU00000000), *Halomonas* sp. LCM1.Bin22 (REBQ01000115), *Halomonas* sp. LBP4 (PDOG00000000), *Halomonas* sp. SYSU XM8 (NZ_PXNT00000000), *Halomonas* sp. 'Soap Lake #6' (CP020469), *Halomonas* sp. Choline-3u-9 (NZ_PJBI00000000), *Halomonas* sp. QHL1 (MINL00000000), изолированных из образцов воды морей и озер, морского льда, донных отложений, гидротермального источника, солеварни, почвы, тканей растений и животных, очистных сооружений сточных вод, что свидетельствует о распространении гена *benA* у представителей рода *Halomonas* из различных экологических ниш. Установлено, что у всех исследованных 20 деструкторов БК рода *Halomonas*, выделенных из района промышленных солеразработок Верхнекамского месторождения (Пермский край), содержится ключевой ген деструкции БК (*benA*), кодирующий α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы.

Таким образом, изученные в рамках настоящей работы галофильные/галотолерантные штаммы рода *Halomonas* могут представлять интерес при разработке новых биотехнологий восстановления и мониторинга засоленных почв, загрязненных токсичными органическими соединениями.

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

Список литературы

1. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas* / I. Llamas, E. Quesada, M.J. Martínez-Cánovas, M. Gronquist, A. Eberhard, J.E. González // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9, № 4. – P. 333–341.
2. Enhanced polyhydroxyalkanoates accumulation by *Halomonas* spp. in artificial biofilms of alginate beads / M. Berlanga, D. Miñana-Galbis, O. Domènech, R. Guerrero // *Int. Microbiol.* – 2012. – Vol. 15, № 4. – P. 191–199.
3. Salt-tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil / J. Kearl, C. McNary, J.S. Lowman, C. Mei, Z.T. Aanderud, S.T. Smith, J. West, E. Colton, M. Hamson, B.L. Nielsen // *Front. Microbiol.* – 2019. – № 10. – P. 1849.
4. García M.T., Ventosa A., Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2005. – Vol. 54, № 1. – P. 97–109.
5. Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 15, № 2–3. – P. 74–92.

6. Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. In: *Pseudomonas* / eds J.L. Ramos, R.C. Levesque. – Boston: Springer, 2006. – P. 287–340.

7. Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. – 1982. – Т. 51. – С. 324–348.

8. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей / Е.С. Корсакова, Л.Н. Ананьина, А.В. Назаров, Б.А. Бачурин, Е.Г. Плотникова // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 247–250.

9. Корсакова Е.С., Пьянкова А.А., Назаров А.В. Филогенетическое разнообразие бактерий, выделенных из ризосферы мари красной (*Chenopodium rubrum* L.), произрастающей в условиях засоления на территории солеработок (г. Соликамск, Пермский край) // Вестник Пермского университета. Биология. – 2013. – № 3. – С. 47–51.

10. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / eds E. Stackebrandt, M. Goodfellow. – New York: John Wiley and Sons, 1991. – P. 115–175.

11. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic, M. Schneider, F.J. de Bruijn, J. Lupski // *Meth. Cell. Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 5. – P. 25–40.

12. Егорова Д.О., Пьянкова А.А. Скрининг гена альфа-субъединицы бензоат диоксигеназы в бактериальных ассоциациях, полученных в результате селекции на (хлор)ароматических соединениях // Вестник Пермского университета. Биология. – 2019. – № 4. – P. 464–470.

13. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic / C. Sanchez-Porro, B. Kaur, H. Mann, A. Ventosa // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 2768–2774.

14. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium / A. Poli, E. Esposito, P. Orlando, L. Lama, A. Giordano, F. de Appolonia, B. Nicolaus, A. Gambacorta // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2007. – № 30. – P. 31–38.

15. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium / M.J. Martinez-Canovas, E. Quesada, I. Llamas, V. Bejar // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – № 54. – P. 733–737.

16. *Halomonas radialis* sp. nov., isolated from *Arthrocnemum macrostachyum* growing in the Odiel marshes (Spain) and emended descriptions of *Halomonas xinjiangensis* and *Halomonas zincidurans* / S. Navarro-Torre, L. Carro, I.D. Rodriguez-Llorente, E. Pajuelo, M.A. Caviedes, J.M. Igual, H.P. Klenk, M.D.C. Montero-Calasanz // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – № 70. – P. 220–227.

17. Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. – М.: Мир, 1981. – 365 с.

18. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents / G. Baggi, S. Bernasconi, M. Zangrossi, L. Cavalca, A. Vincenza // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2008. – Vol. 62, № 1. – P. 57–64.

19. Oie C.S.I., Albaugh C.E., Peyton B.M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism // Water Res. – 2007. – Vol. 41, № 6. – P. 1235–1242.

20. New findings on aromatic compounds' degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3 / G.C. Monzón, M. Nisenbaum, M.K.H. Seitz, S.E. Murialdo // Curr. Microbiol. – 2018. – Vol. 75, № 8. – P. 1108–1118.

21. Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans* / M.D.L. Moreno, C. Sánchez-Porro, F. Piubeli, L. Frias, M.T. García, E. Mellado // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 6. – P. e21049.

22. Identification and resolution of microdiversity through metagenomic sequencing of parallel consortia / W.C. Nelson, Y. Maezato, Y.-W. Wu, M.F. Romine, S.R. Lindemann // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – Vol. 82, № 1. – P. 255–267.

23. Genome sequence of *Halomonas* sp. strain KO116, an ionic liquid-tolerant marine bacterium isolated from a lignin-enriched seawater microcosm / K.B. O'Dell, H.L. Woo, S. Utturkar, D. Klingeman, S.D. Brown, T.C. Hazen // Genome Announc. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. e00402-15.

24. Expression and functional analysis of two NhaD type antiporters from the halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2 / Y. Cui, B. Cheng, Y. Meng, C. Li, H. Yin, P. Xu, C. Yang // Extremophiles. – 2016. – Vol. 20, № 5. – P. 631–639.

References

1. Llamas I., Quesada E., Martínez-Cánovas M.J., Gronquist M., Eberhard A., González J.E. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas*. *Extremophiles*, 2005, vol. 9, no. 4, pp. 333–341.

2. Berlanga M., Miñana-Galbis D., Domènech O., Guerrero R. Enhanced polyhydroxyalkanoates accumulation by *Halomonas* spp. in artificial biofilms of alginate beads. *Int. Microbiol.*, 2012, vol. 15, no. 4, pp. 191–199.

3. Kearn J., McNary C., Lowman J.S., Mei C., Aanderud Z.T., Smith S.T., West J., Colton E., Hamson M., Nielsen B.L. Salt-tolerant halophyte rhizosphere bacteria stimulate growth of alfalfa in salty soil. *Front. Microbiol.*, 2019, no. 10, pp. 1849.

4. García M.T., Ventosa A., Mellado E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, vol. 54, no. 1, pp. 97–109.

5. Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 15, no. 2-3, pp. 74–92.

6. Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. In: *Pseudomonas*. Eds Ramos J.L., Levesque R.C. Boston: Springer, 2006, pp. 287–340.

7. Rozanova E.P., Nazina T.N. Uglevodorodokislyayushchie bakterii i ih aktivnost' v neftyanyh plastah [Hydrocarbon oxidizing bacteria and their activity in oil reservoirs]. *Mikrobiologiya*, 1982, vol. 51, pp. 324–348.

8. Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Bachurin B.A., Plotnikova E.G. Raznoobrazie bakterij semejstva *Halomonadaceae* rajona razrabotok Verhnekamskogo mestorozhdeniya solej [Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* in the development area of the Verkhnekamskoye salt deposit]. *Mikrobiologiya*, 2013, vol. 82, no. 2, pp. 247–250.

9. Korsakova E.S., Pyankova A.A., Nazarov A.V., Filogeneticheskoe raznoobrazie bakterij, vydelennyh iz rizosfery mari krasnoj (*Shenopodium rubrum* L.), proizrastayushchej v usloviyah zasoleniya na territorii solerazrabotok (g. Solikamsk, Permskij kraj) [Phylogenetic diversity of bacteria isolated from rhizosphere *Chenopodium rubrum* L., growing in saline conditions on the salt deposit area (Solikamsk, Perm region)]. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya*, 2013, no. 3, pp. 47–51.

10. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. New York, John Wiley and Sons, 1991, pp. 115–175.

11. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Cell. Mol. Biol.*, 1994, vol. 5, pp. 25–40.

12. Egorova D.O., Pyankova A.A. Skринing gena al'fa-sub"edinicy benzoat dioksigenazy v bakterial'nyh asociacijah, poluchennyh v rezul'tate selekcii na (hlor)aromaticeskikh soedineniyah [Alpha-subunit benzoate dioxygenase gene screening in bacterial associations obtained by selection on (chlorine) aromatic compounds]. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya*, 2019, no. 4, pp. 464–470.

13. Sanchez-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, vol. 60, pp. 2768–2774.

14. 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 alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2007, no. 30, pp. 31–38.

15. Martinez-Canovas M.J., Quesada E., Llamas I., Bejar V. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, no. 54, pp. 733–737.

16. Navarro-Torre S., Carro L., Rodriguez-Llorente I.D., Pajuelo E., Caviedes M.A., Igual J.M., Klenk H.P., Montero-Calasanz 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, no. 70, pp. 220–227.

17. Kushner D. Zhizn' mikrobov v ekstremal'nyh usloviyah [Microbial life in extreme environments]. Moscow: Mir, 1981, 365 p.

18. 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. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2008, vol. 62, no. 1, pp. 57–64.

19. Oie C.S.I., Albaugh C.E., Peyton B.M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism. *Water Res.*, 2007, vol. 41, no. 6, pp. 1235–1242.

20. 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, vol. 75, no. 8, pp. 1108–1118.

21. Moreno M.D.L., 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, vol. 6, no. 6, pp. e21049.

22. Nelson W.C., Maezato Y., Wu Y.-W., Romine M.F., Lindemann S.R. Identification and resolution of microdiversity through metagenomic sequencing of parallel consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 82, no. 1, pp. 255–267.

23. 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, vol. 3, no. 3, pp. e00402-15.

24 Cui Y., Cheng B., Meng Y., Li C., Yin H., Xu P., Yang C. Expression and functional analysis of two NhaD type antiporters from the halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2. *Extremophiles*, 2016, vol. 20, no. 5, pp. 631–639.

Получено 28.10.2020

Об авторах

Пьянкова Анна Александровна (Пермь, Россия) – инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: annpjankva@mail.ru).

Плотникова Елена Генриховна (Пермь, Россия) – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: peg_el@mail.ru).

About the authors

Anna A. Ryankova (Perm, Russian Federation) – Engineer of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (13, Golev str., Perm, 614081; e-mail: annpjankva@mail.ru).

Elena G. Plotnikova (Perm, Russian Federation) – Doctor of biology, leading researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (13, Golev str., Perm, 614081; e-mail: peg_el@mail.ru).