

УДК 579.222:579.252.5:579.871.2

## ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ РОДА *ARTHROBACTER*

О. В. Ястребова<sup>a</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

<sup>b</sup>Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Методом накопительных культур из почв и донных отложений района солеразработок выделено пять штаммов бактерий рода *Arthrobacter*, способных к росту на нафталине как единственном источнике углерода и энергии при содержании 1 М NaCl в среде культивирования. Штамм *A. globiformis* SF27 утилизирует фенантрен в присутствии 1 М NaCl. Установлены пути метаболизма фенантрена клетками *Arthrobacter* sp. B1 через образование 1,2-дигидрокси-нафталина, салицилата и клетками *A. globiformis* SF27 – через 1-гидрокси-2-нафтоат, 2-карбокисбензальдегид, *орто*-фталат. В штаммах *A. globiformis* DF14, SF27 и *A. nicotianae* SN17 обнаружены плазмиды размером 120 т.п.н. и 85 т.п.н.

В большинстве случаев загрязнение объектов окружающей среды в промышленных районах носит комплексный, полихимический характер. Наряду с повышенным содержанием поллютантов, к которым относятся моно- и полиароматические углеводороды (ПАУ), почвы и водосемы могут подвергаться воздействию других экстремальных факторов, в частности высокой минерализации. Возможность микробной деструкции ПАУ в данных условиях определяется устойчивостью бактерий к повышенному содержанию солей и способностью проявлять при этом биодеградативные свойства (Kästner et al., 1998; Boonchan et al., 2000).

В последние годы появляется все больше публикаций о грамотрицательных и грамположительных бактериях, способных разлагать широкий спектр токсичных органических соединений различной химической природы, обладающих устойчивостью к экстремальным условиям существования, в том числе к высокой минерализации среды (Luz et al., 1997; Kästner et al., 1998). В то же время, процессы утилизации ПАУ более подробно изучены у грамотрицательных бактерий, в частности у бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* (Yen, Serdar, 1988; Laurie, Lloyd-Jones, 1999). Имеются лишь единичные работы о подробных исследованиях биохимических путей и генетических системах разложения нафталина и фенантрена у грамположительных бактерий (Keuth, Rehm, 1991; Boldrin et al., 1993; Kanaly, Narayama, 2000).

Ранее, из образцов почв и донных отложений района солеразработок нами были выделены бактериальные культуры, отнесенные к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, а

также сообщества микроорганизмов, способные использовать нафталин, фенантен и бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии (Алтынцева, 2001; Плотникова и др., 2001).

Цель исследования – изучение бактерий рода *Arthrobacter*, способных к деструкции нафталина и фенантрена в условиях повышенной минерализации среды.

### Методы исследования

**Бактериальные культуры.** В работе использованы бактериальные штаммы, выделенные из почв и донных отложений, загрязненных отходами химических производств (г. Березники, Пермская область): *Arthrobacter globiformis* SF27, *Arthrobacter globiformis* DF14, *Arthrobacter nicotianae* SN17, *Arthrobacter* sp. B45 и *Arthrobacter* sp. B1 (Алтынцева, 2001; Плотникова и др., 2001).

**Среды и условия культивирования.** Для роста микроорганизмов использовали минеральную среду Раймонда (Розанова, Назина, 1982) с разным содержанием хлорида натрия. В качестве полноценной среды использовали модифицированную среду Раймонда при добавлении 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта. Нафталин, фенантрен, бифенил использовали как субстраты в концентрации 1 г/л при культивировании в жидкой минеральной среде. При выращивании микроорганизмов на агаризованных средах добавляли нафталин и бифенил, которые наносили на крышку перевернутой чашки Петри. Культивирование проводили при температуре 28°С.

**Ростовые характеристики** штаммов-деструкторов изучались в периодической культуре. Оптическую плотность (ОД) определяли на ФЭК-56М при длине волны 540 нм и толщине кюветы 0.5 см. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом серийных разведений с последующим высевом и подсчетом колоний микроорганизмов на чашках с агаризованной полноценной средой.

**Плазмидную ДНК выделяли** модифицированным методом щелочного лизиса (Marco et al., 1982), методом Бабыкина (Бабыкин и др., 1984), методом Портного-Уайта (Методы общей бактериологии, 1983).

**Электрофорез в агарозном геле** осуществляли в соответствии с рекомендациями (Маниатис и др., 1984).

**Элиминация бактериальных плазмид** была выполнена согласно стандартной методике (Rheinwald et al., 1973).

**Анализ метаболитов** проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с применением пластин Silufol UV 254 (Kavalier, Чехия) и системы растворителей гексан : этилацетат : уксусная кислота (10:3:1). Пластины анализировали под ультрафиолетом (254 нм).

## Результаты и обсуждение

### Характеристика бактерий-деструкторов

Выделенные из почв и донных отложений, загрязненных отходами химических и соледобывающего предприятий, 5 штаммов-деструкторов нафталина и фенантрена были идентифицированы как представители рода *Arthrobacter*. Штаммы

SF27 (=ВКМ Ас-2063) и DF14 (=ВКМ Ас-2064) отнесены к виду "*A. globiformis*", штамм SN17 (=ВКМ Ас-2065) определен как представитель вида "*A. nicotianaе*". Два бактериальных штамма – В1 и В45 до вида не определены (Алтынцева, 2001; Плотникова и др., 2001).

Исследуемые бактериальные культуры были проверены на способность к утилизации ряда ароматических соединений и продуктов их метаболизма. Установлено, что все штаммы растут на нафталине и салицилате. Два штамма *A. globiformis* – SF27 и DF14, способные к эффективному росту на фенантрена, утилизируют возможные продукты его метаболизма – 1-гидрокси-2-нафтоат и орто-фталат, а также растут на гентизате – одном из основных метаболитов нафталина. Штамм *A. nicotianaе* SN17 способен к росту на нафталине и его ключевых метаболитах (табл. 1).

Методом ТСХ были определены продукты метаболизма разложения нафталина и фенантрена у *A. globiformis* SF27 и *Arthrobacter* sp. В1. Установлено, что при росте на фенантрена в среде культивирования штамма *A. globiformis* SF27 присутствуют 1-гидрокси-2-нафтоат и два неидентифицированных метаболита. В среде культивирования штамма *Arthrobacter* sp. В1 были зафиксированы 1-гидрокси-2-нафтоат, 1,2-дигидрокси-нафталин и аналогичные неидентифицированные продукты.

При выращивании штаммов SF27, В1 и В45 на нафталине установлено, что в среде культивирования всех трех штаммов в низкой концентрации присутствует салицилат. В культуральной среде *A. globiformis* SF27 обнаружен также катехол, являющийся ключевым метаболитом утилизации салицилата.

Таблица 1

Характеристика бактерий-деструкторов ПАУ рода *Arthrobacter*

Штамм	Ростовые субстраты*						
	Нафталин	Бифенил	Фенантрен	Салицилат	Орто-фталат	Гентизат	1Н2N
DF14	+	–	+	+	+	+	+
SF27	+	–	+	+	+	+	±
SN17	+	±	–	+	+	+	–
В45	+	–	–	+	–	–	–
В1	+	–	±	+	–	–	–

Примечание. + – выраженный рост; ± – слабый рост; – – нет роста; 1Н2N – 1-гидрокси-2-нафтоат; \* рост штаммов проверяли в минеральной среде Раймонда в присутствии 0.5 М NaCl.

На основании полученных данных можно предположить, что утилизация нафталина штаммами SF27, В1 и В45 идет по наиболее распространенному у штаммов-деструкторов нафталина пути с образованием салицилата и катехола в качестве ключевых метаболитов и расщеплением катехола по мета- и орто-пути (рис. 1). Утилизация фенантрена штаммом В1 возможна с образо-

ванием 1,2-дигидрокси-нафталина и салицилата в качестве основных метаболитов, а штаммом *A. globiformis* SF27 - с образованием 1-гидрокси-2-нафтоата, 2-карбокисбензальдегида и орто-фталата в качестве ключевых метаболитов без участия ферментов утилизации нафталина (Kiyohara et al., 1976; Iwabuchi, Narayama, 1998).

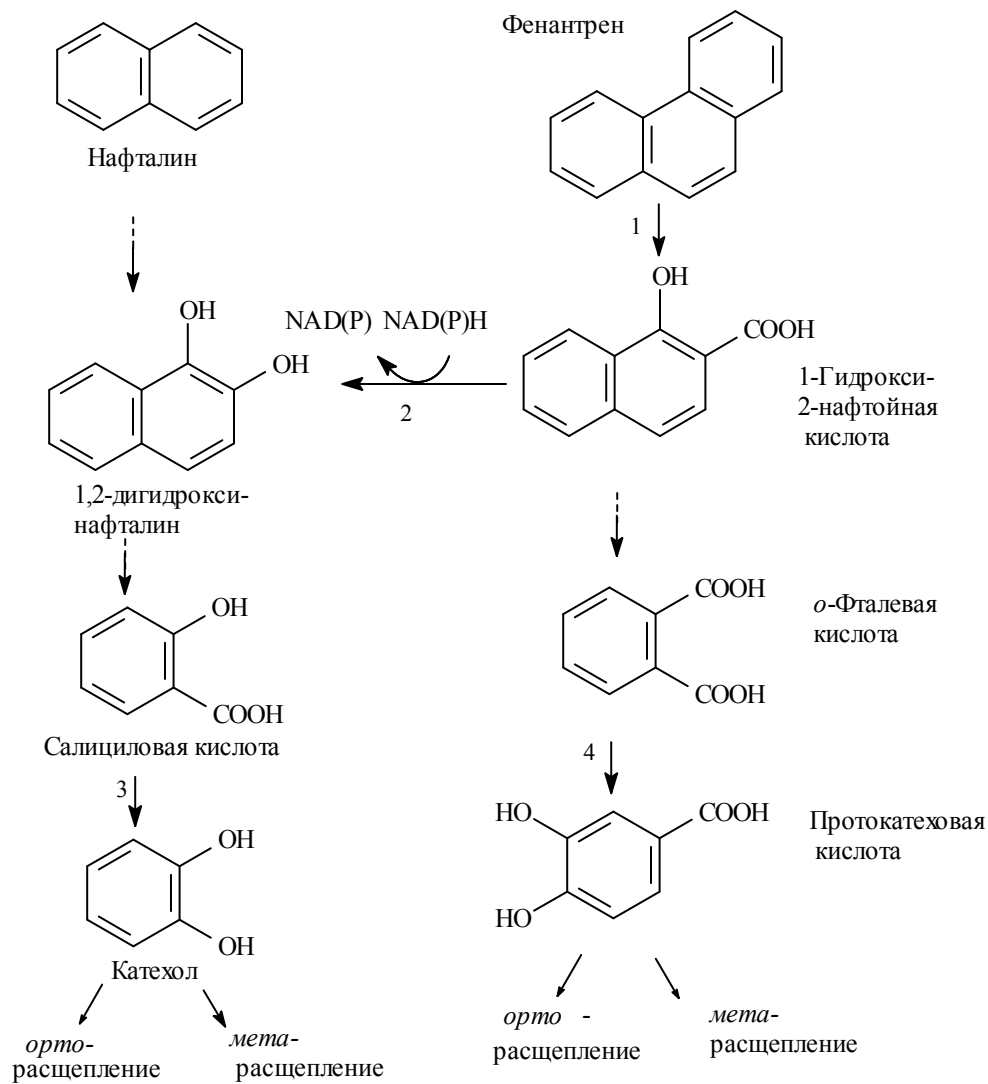


Рис. 1. Метаболические пути биодegradации нафталина и фенантрена (Yen, Serdar, 1988; Iwabuchi, Narayama, 1998): 1 – фенантрен диоксигеназа; 2 – 1-гидрокси-2-нафтоат гидроксилаза; 3 – салицилат 1-гидроксилаза; 4 – *o*-фталат гидроксилаза

### Рост бактерий-деструкторов при повышенных концентрациях хлорида натрия

Установлено, что все выделенные штаммы-деструкторы ПАУ рода *Artrrobacter* способны к росту как на средах, не содержащих хлорид натрия, так и на средах с повышенным содержанием NaCl: до 2 М – на полноценной среде и до 1 М – на минеральной среде с нафталином в качестве субстрата. Полученные результаты позволяют отнести исследуемые штаммы к умеренно галотолерантным микроорганизмам, по классификации Кашнера (Кашнер, 1981).

Из литературных источников известна способность ряда грамположительных бактерий к утилизации алифатических и моноароматических со-

единений в условиях повышенной минерализации среды (Luz et al., 1997). Нами изучено влияние различных концентраций NaCl на способность штамма *A. globiformis* SF27 к росту и деструкции фенантрена (рис. 2 А, В). Как показали результаты опыта, повышение концентрации NaCl в среде культивирования штамма SF27 до 0.4 М приводило к снижению максимального значения оптической плотности культуры по сравнению с культурой в контроле, однако количество жизнеспособных клеток культуры оставалось на уровне контроля. В присутствии 0.7 М NaCl в ростовой среде наблюдалось значительное снижение оптической плотности и количества жизнеспособных клеток культуры, а также увеличение лаг-фазы роста культуры. Повышение концентрации NaCl в среде

культивирования до 1 М ингибировало рост штамма на фенантрене, однако при определении количества колониеобразующих единиц выявлены жизнеспособные клетки (рис. 2 А, В).

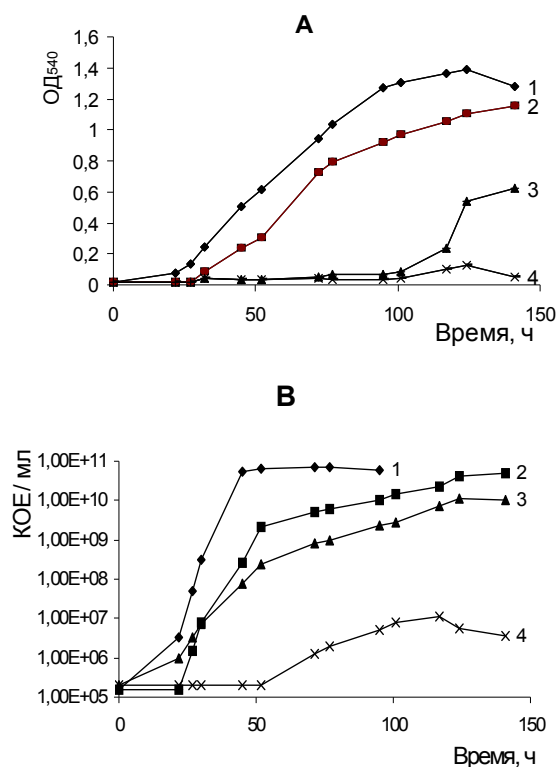


Рис. 2. Рост *Arthrobacter globiformis* SF27 в минеральной среде с фенантrenom при разных концентрациях NaCl (M): 1 – контроль (без NaCl); 2 – 0.4 M; 3 – 0.7 M; 4 – 1 M

Влияние засоления среды на ростовые характеристики штамма *Arthrobacter globiformis* SF27 изучалось в сравнении со штаммом *Arthrobacter globiformis* КЗТ-1, выделенным из огородной почвы Подмосковья (Зайцев, Карасевич, 1981). Культивирование штаммов проводилось на среде Раймонда с добавлением триптона и дрожжевого экстракта в качестве субстратов. При увеличении концентрации NaCl в ростовой среде штамма *A. globiformis* SF27 до 0.4 M наблюдались более высокие значения оптической плотности культуры по сравнению с показателями, зарегистрированными при культивировании в условиях обычной минерализации (рис. 3 А, В). При концентрации 1 M NaCl максимальная оптическая плотность культуры штамма SF27 достигала уровня контроля, но за более продолжительный период. Значения оптической плотности для штамма КЗТ-1 при данной концентрации NaCl были существенно ниже, чем при выращивании в среде с обычной

минерализацией. При повышении содержания NaCl в ростовой среде до 1.5 M отмечалось снижение максимальной оптической плотности культуры штамма SF27 в 2 раза, по сравнению с контролем, а также увеличение лаг-фазы. В присутствии 1.5 M NaCl в среде культивирования рост штамма *Arthrobacter globiformis* КЗТ-1 практически отсутствовал (рис. 3 А, В).

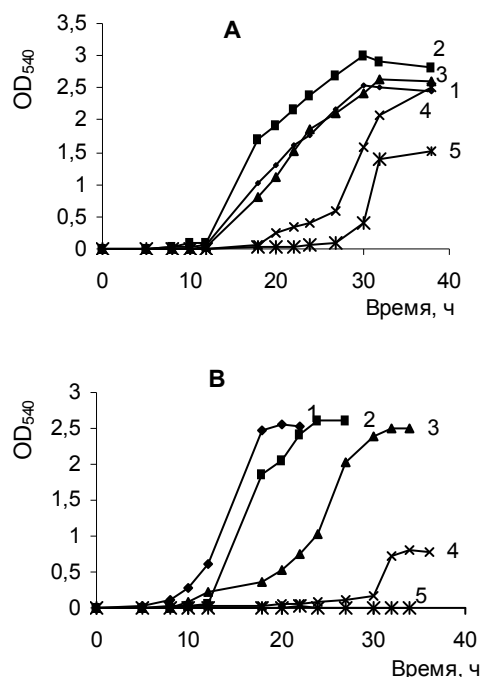


Рис. 3. Рост штаммов *Arthrobacter globiformis* SF27 (А) и КЗТ-1 (В) в полноценной среде при разных концентрациях NaCl (M): 1 – контроль (без NaCl); 2 – 0.4 M; 3 – 0.7 M; 4 – 1 M; 5 – 1.5 M

Из полученных данных следует, что выделенный из почвы с повышенной минерализацией фенантрен-деградирующий штамм *Arthrobacter globiformis* SF27 способен к росту на фенантрене при концентрации NaCl в ростовой среде до 0.7 M и является более устойчивым к высокой минерализации среды, чем представитель того же вида *Arthrobacter globiformis* КЗТ-1, выделенный из подмосковной почвы.

Ростовые характеристики штамма *Arthrobacter* sp. В45, выделенного из нафталинутилизирующего сообщества микроорганизмов, исследовались в минеральной среде Раймонда разной минерализации. В качестве субстрата был использован нафталин (рис. 4).

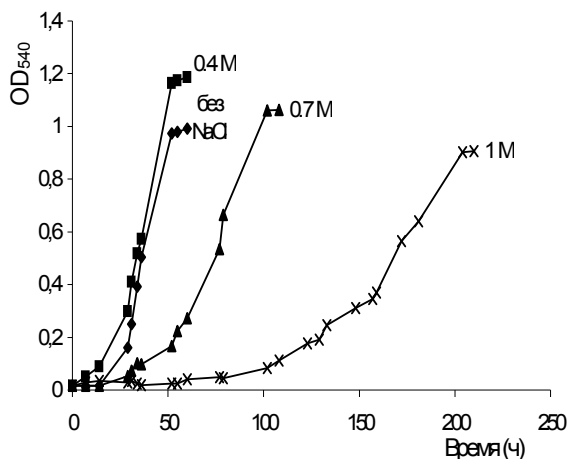


Рис. 4. Рост штамма *Arthrobacter globiformis* B45 в минеральной среде с нафталином при разных концентрациях NaCl (М)

Опыты показали, что присутствие в среде культивирования NaCl в концентрации 0.4М приводило к небольшому увеличению значений оптической плотности культуры. В литературе описано стимулирующее воздействие небольших концентраций хлорида натрия (1-2%) на ростовые характеристики грамположительных штаммов (Плакунов и др., 1999). В присутствии 1 М NaCl наблюдалось увеличение лаг-фазы роста и снижение ростовых показателей культуры. В то же время сообщество микроорганизмов, включающее штаммы *Arthrobacter* sp. B45 и B1, способно к утилизации нафталина при концентрации NaCl в среде культивирования до 1.5 М (Алтынцева, 2001).

#### Роль плазмид в деградации ПАУ

У большинства описанных в литературе штаммов-деструкторов гены, контролирующие разложение нафталина и фенантрена, расположены в плаزمидях (Кочетков, Боронин, 1984; Yen, Serdar, 1988;).

Нами был проведен анализ на наличие плазмидной ДНК штамма-деструктора нафталина *A. nicotiane* SN17 и штаммов-деструкторов нафталина и фенантрена *A. globiformis* DF14 и SF27.

Анализ электрофореграмм показал, что штамм *A. nicotiane* SN17 содержит плазмиду размером около 85 тпн. В штаммах *A. globiformis* DF14 и SF27 зарегистрированы плазмиды размером около 120 тпн.

Известно, что способность к деструкции различных ксенобиотиков бактериями рода *Arthrobacter* также часто определяется плазмидными генами (Furukawa, Chakrabarty, 1982; Eaton, 2001). В наших исследованиях при обработке клеток штамма *A. globiformis* SF27 митомидином С в концентрации 0.6 мкг/мл были получены элиминантные штаммы. Установлено, что элиминанты не

способны к росту на нафталине, фенантрена и 1-гидрокси-2-нафтоате; в то же время они сохраняют способность к росту на салицилате. Полученные данные позволяют предположить, что ферменты первичной атаки ароматического кольца фенантрена и 1-гидрокси-2-нафтоата, а также ферменты утилизации нафталина до салицилата у штамма *A. globiformis* SF27 кодируются плазмидными генами.

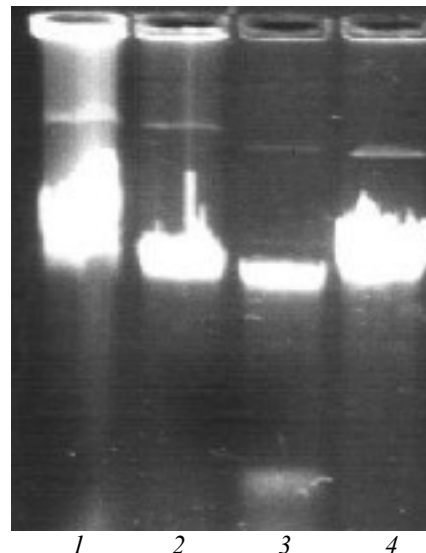


Рис. 5. Электрофореграмма плазмидной ДНК: 1 – pSF27; 2 – pDF14; 3 – pSN17; 4 – NAH7 (83 тпн)

#### Заключение

Выделенные из почв и донных отложений, загрязненных отходами химических и соледобывающего производств, бактерии рода *Arthrobacter* имеют большой деградативный потенциал. Установлено, что все исследованные штаммы являются деструкторами нафталина и осуществляют его утилизацию по описанному в литературе для ряда штаммов рода *Pseudomonas* пути с образованием салицилата и катехола (Yen., Serdar, 1988). Штамм *Arthrobacter globiformis* SF27, вероятно, способен к деградации фенантрена через 1-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2-карбоксібензальдегид и орто-фталат без участия ферментов утилизации нафталина (Kiyohara, Nagao, 1976; Iwabuchi, Nagayama, 1998).

Выделенные бактерии-деструкторы ПАУ рода *Arthrobacter* являются умеренно галотолерантными бактериями (Кашнер, 1981) и способны к росту на нафталине при концентрации 1 М хлорида натрия в среде культивирования. Установлено, что все исследованные штаммы на полноценной среде способны к росту при более высоких концентрациях NaCl, чем на минеральной среде с нафталином. Из литературных данных известно, что аминокислоты могут выступать в качестве осмопротекторов и накапливаться клетками ряда галотолерантных штаммов при повышенном засолении

среды (Galinski, 1993). Штамм *Arthrobacter globiformis* SF27 способен к утилизации фенантрена при концентрации NaCl до 1 М и растет при более высоких концентрациях хлорида натрия, чем штамм *A. globiformis* КЗТ1, выделенный из подмосковной почвы.

Три штамма SN17, SF27 и DF14 содержат плазмиды большого размера. В эксперименте по элиминации плазмиды *A. globiformis* SF27 получены данные, позволяющие предположить, что ферменты первичной атаки ароматического кольца фенантрена и 1-гидрокси-2-нафтоата, а также ферменты утилизации нафталина до салицилата у данного штамма кодируются плазмидными генами.

На основании полученных результатов можно утверждать, что выделенные бактерии-деструкторы нафталина и фенантрена рода *Arthrobacter* адаптированы к росту и утилизации ароматических субстратов в условиях повышенной минерализации среды и являются перспективными для использования при биоремедиации почв и стоков с повышенным содержанием солей.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал №04-04-96042.

### Список литературы

- Алтынцева О.В. Галотолерантные бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов: Дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2001. 139 с.
- Бабькин М.М. и др. Плазмиды различных штаммов *Pseudomonas spheroides* // Молек. генет. микроорг. и вирусов. 1984. № 7. С. 23–28.
- Зайцев Г.М., Карасевич Ю. Н. Утилизация 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Arthrobacter globiformis* // Микробиология. 1981. Т. 50. С. 35–40.
- Кочетков В.В., Боронин А.М. Сравнительное изучение плазмид, контролирующих биodeградацию нафталина культурой *Pseudomonas* // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 639–644.
- Кашинер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 365 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 390 с.
- Методы общей бактериологии / Пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардт и др. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.
- Плакунов В.К. и др. Взаимосвязь кинетики роста и дыхания у родококков в присутствии высоких концентраций солей // Микробиология. 1999. Т. 68, № 1. С. 40–44.
- Плотникова Е.Г. и др. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. 2001. Т. 70, № 1. С. 61–69.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология, 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. // Appl. Environm. Microbiol. 1993. Vol. 59, № 6. P. 1927–1930.
- Boonchan S., Britz M.L., Stanley G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures // Appl. Environm. Microbiol. 2000. Vol. 66, № 3. P. 1007–1017.
- Furukawa K., Chakrabarty A.M. Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 44. P. 619–629.
- Galinski E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection // Experientia. 1993. Vol. 49. P. 487–496.
- Eaton R. W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. P. 3689–3703.
- Iwabuchi T., Harayama S. Biochemical and genetic characterization of *trans*-2-carboxy-benzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioides* strain // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 945–949.
- Kanaly R. A., Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria // J. Bacteriol. 2000. Vol. 182, № 8. P. 2059–2067.
- Kästner M, Breuer-Jammali M, Mahro B. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil // Appl Environ Microbiol. 1998. Vol. 64, № 1. P. 359–362.
- Keuth S., Rehm H.-J. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil // Applied Microbiology and Biotechnology. 1991. Vol. 34. P. 804–808.
- Kiyohara H. Nagao K., Nomi R. Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by *Aeromonas* sp. // Agric. Biol. Chem. 1976. Vol. 40. P. 1075–1082.
- Laurie Andrew D., Gareth Lloyd-Jones The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism // J. Bacteriol. 1999 Vol. 181. P. 531–540.
- Luz M., Paje F. Brett A., Neilan A., Couperwite I. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 2975–2981.
- Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder // Analit. Biochem. 1982. Vol. 121. P. 382.

- Rheinwald J., Chakrabarty A.M., Gunsalus I.C. A transmissible plasmids controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. Vol. 70. P. 885–889.
- Yen K.M., Serdar C.M. Genetic of naphthalene catabolism in pseudomonads. CRC // Crit. Rev. Microbiol. 1988. Vol. 15. P. 247–268.

Поступила в редакцию 05.06.2006

### **Halotolerant bacteria of the genus *Arthrobacter*, capable of growth on polycyclic aromatic hydrocarbons**

O.V. Yastrebova, E.G. Plotnikova

Using method of enrichment culture five bacterial strains of genus *Arthrobacter* that were able to grow on naphthalene as a sole source of carbon and energy at 1M NaCl have been isolated from soils and bottom sediments from the area of salt mining. *A. globiformis* strain SF27 utilized phenanthrene in 1 M NaCl presence. Pathways of phenanthrene degradation by *Arthrobacter* sp. B1 via formation of 1,2-dihydroxynaphthalene and salicylate and by *A. globiformis* SF27 – via 1-hydroxy-2-naphthoate, 2-carboxybenzaldehyde and ortho-phthalate. Plasmids of 120 kb and 85 kb were detected in *A. globiformis* strains DF14, SF27 and *A. nicotianae* strain SN17.