

УДК 579.222:579.851.11

БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОЧВ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК

О. В. Ястребова^a, Л. Н. Ананьина^a, Е. Г. Плотникова^{a,b}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

^b Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Из почв района солеразработок (г. Березники, Пермский край) методом накопительных культур выделено семь штаммов бактерий рода *Bacillus*. По результатам анализа REP- и BOX-ПЦР большинство выделенных штаммов входят в одну геномогруппу (I), штаммы SN501, И10b и И12b различаются между собой по REP- и BOX-ДНК профилям и выделены в три геномогруппы (II, III и IV, соответственно). Принадлежность штаммов SN501, И10b и И12b к разным геномогруппам подтверждена результатами рестрикционного анализа амплифицированных рибосомальных ДНК (ARDRA). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штаммы И12b, И23 и И27 являются представителями рода *Bacillus*, штамм И10b принадлежит к роду *Paenibacillus*. Большинство штаммов растет при 9-11% NaCl в среде культивирования и в щелочных условиях (pH 7.0-9.0). Штамм *Bacillus* sp. SN501 растет на нафталине как единственном источнике углерода и энергии при концентрации NaCl 5%.

Введение

Бактерии рода *Bacillus* представлены грамположительными, аэробными, каталазоположительными, палочковидными клетками, образующими овальные эндоспores, высокоустойчивые ко многим неблагоприятным воздействиям. Бактерии данного рода широко распространены в почвенных, водных экосистемах и варьируют по физиологическим свойствам. Ряд галофильных и алкалофильных штаммов рода *Bacillus* выделен из соленых и содовых озер (Nielsen et al., 1995; Vargas et al., 2005; Lim et al., 2006); термофильные штаммы *Bacillus thermophleovorans* (Annweiler et al., 2000) и *Bacillus* sp. JF8 (Shimura et al., 1999) изолированы при 60°C с использованием нафталина в качестве субстрата. Из нефтезагрязненных почв и донных отложений выделен ряд штаммов *Bacillus* spp., использующих фенантрен (Doddamani, Ninpekar, 2000) и дизельное топливо в качестве единственного источника углерода (Stapleton et al., 2000). Данная группа бактерий представляет интерес в связи с высоким биотехнологическим потенциалом для получения осмопротектерных соединений; создания препаратов для очистки почв и стоков со сложным, полихимическим характером загрязнения (Margesin, Schinner, 2001; Zhuang et al., 2002).

Цель работы – характеристика бактерий рода *Bacillus*, выделенных из засоленных почв.

Методы исследования

Бактериальные культуры. В работе использованы бактериальные штаммы, выделенные из почв и донных отложений, загрязненных отходами соледобывающего предприятия БКРУ-1 г. Березники (Пермский край), обозначенные SN501, И10b, И12b, И23, И26, И27, И28.

Среды и условия культивирования. Бактерии выращивались в минеральной среде Раймонда (Розанова, Назина, 1982) с разным содержанием хлорида натрия (от 3 до 20%). В качестве полноценной среды использовали среду Раймонда при добавлении триптона (5 г/л) и дрожжевого экстракта (2.5 г/л). При культивировании в жидкой минеральной среде нафталин, фенантрен, гентизат и орто-фталат использовали как субстраты в концентрации 1 г/л, салицилат – в концентрации 0.5 г/л. При выращивании бактерий на агаризованной среде нафталин, фенол, жидкие алифатические углеводороды (октан, декан, пентадекан) и дизельное топливо добавляли на крышку перевернутой чашки Петри. Культивирование проводили при температуре 28°C.

Изучение физиологических свойств бактерий. Устойчивость к NaCl (3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 17, 20%) определяли на полноценной агаризованной минеральной среде Раймонда. Рост учитывали на 7-й день.

Рост при разных значениях pH определяли при концентрации Na⁺ 0.8–0.85 М в буферных системах (для pH 5 – ацетатный буфер, для pH 7–8 –

фосфатный буфер, для pH 9–10 – трис-HCl буфер) (Методы общей бактериологии, 1983), приготовленных на основе минеральной среды Раймонда, содержащей глюкозу в качестве источника углерода и энергии. Штаммы культивировались на агаризованной среде при pH 5, 7, 8, 9, 10. Рост учитывали на 7-й день.

Идентификация бактерий. Культуральные, морфологические и биохимические свойства изучали согласно руководств «Определитель бактерий Берджи» (1997) и «Методы общей бактериологии» (1983). Морфологию и жизненный цикл бактерий изучали у выращенных на агаризованной среде 12–72-часовых культур с использованием световой микроскопии (фазовый контраст).

Аmplification гена 16S рНК. Для амплификации использовали бактериальные праймеры 27F и 1492R. Амплификацию проводили так, как описано у Е.Ю. Гавриш с соавт. (2004).

Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рНК. Секвенирование гена 16S рНК, амплифицированного с использованием универсальных бактериальных праймеров (Гавриш и др., 2004), проводили с применением набора реактивов CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBASE 1000 (JSC GE Healthcare, США).

Филогенетический анализ. При предварительном анализе нуклеотидной последовательности гена 16S рНК использовали программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Далее нуклеотидную последовательность 16S рДНК изучаемого изолята сравнивали с нуклеотидными последовательностями типовых штаммов близкородственных видов с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) и корректировали вручную. Эволюционное расстояние, выраженное как число замен на 100 нуклеотидов, рассчитывали согласно Jukes, Cantor (1969). Построение филогенетического дерева производили с помощью пакета программ TREECON (van de Peer, DeWachter, 1994) с использованием метода «neighbor-joining» (NEIGHBOR). Статистическую достоверность ветвления («bootstrap-анализ») оценивали с использованием соответствующей функции программы TREECON на основе 1000 альтернативных деревьев.

REP-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся экстрагенетических палиндромных последовательностей ДНК) и **ВОХ-ПЦР** (полимеразная цепная реакция повторяющихся Вох-элементов) проводили по методу J. Versalovic et al. (1994). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле, приготовленном на 1 x TBE буфере (Маниатис и др., 1984).

Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции. 5 мкл ПЦР продукта 16S рДНК были обрабо-

таны 1 ед. рестрикционных ферментов *HhaI*, *MseI*, *HaeIII* (Fermentas, Литва) с использованием для каждой эндонуклеазы рекомендованного буфера и при соответствующем температурном режиме (Scortichini et al., 2002). Фрагменты рестрикции разделяли электрофорезом в 1.2% агарозном геле.

Результаты и их обсуждение

При использовании метода накопительных культур из почв, загрязненных отходами химических и соледобывающего производств (г. Березники, Пермский край), выделен ряд штаммов грамположительных бактерий, способных к деградации различных алифатических и ароматических углеводородов (Плотникова и др., 2001; Плотникова и др., 2007).

Семь штаммов были идентифицированы как представители рода *Bacillus*. Данные штаммы имели круглые, гладкие, непрозрачные колонии бледно-желтого цвета. Клетки штаммов – грамположительные, аэробные палочки, каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Образуют округлые, расположенные на концах клеток споры.

Проведена сравнительная характеристика исследуемых штаммов с использованием методов REP-ПЦР и ВОХ-ПЦР (рис. 1, 2). Анализ полученных профилей фрагментов ДНК выявил, что штаммы И23, И26 и И27 входят в одну геномную группу (I группа). Штаммы SN501, И10b и И12b не входят в данную геномную группу, различаются между собой по REP- и ВОХ-ДНК профилям, они выделены в три геномные группы (II, III и IV группы соответственно) (рис. 1, 2).

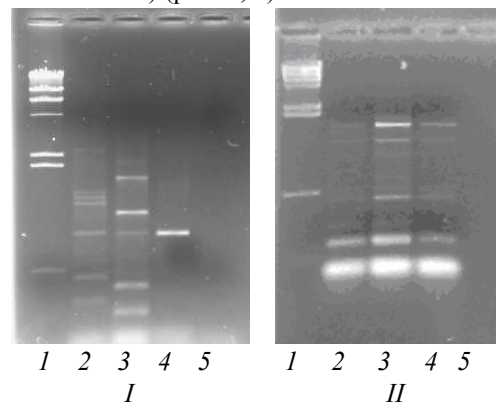
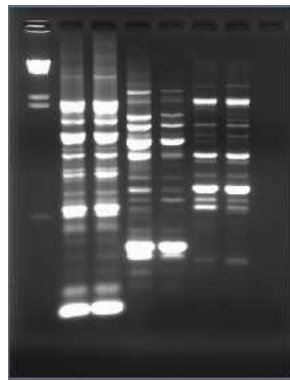


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов REP-ПЦР штаммов *Bacillus* spp.:

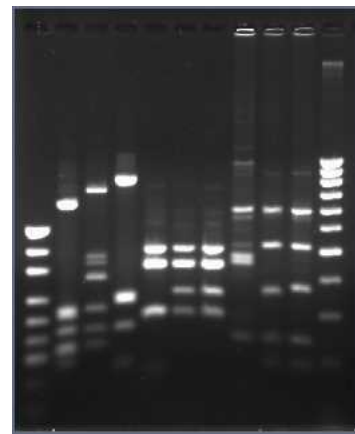
- I: 1 – маркер λ HindIII; 2 – SN501; 3 – I10b; 4 – I12b; 5 – отрицательный контроль;
II: 1 – маркер λ HindIII; 2 – И23; 3 – И26; 4 – И27; 5 – отрицательный контроль

Результаты рестриционного анализа амплифицированных рибосомальных ДНК (ARDRA) с использованием рестриктаз *MboI*, *HhaI* и *MseI* подтвердили принадлежность штаммов SN501, И10b и И12b к разным геномным группам (рис. 3).



1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ВОХ-ПЦР штаммов *Bacillus* spp.:
1 – маркер λ HindIII; 2, 3 – SN501; 4, 5 – И10b; 6, 7 – И12b; 8 – отрицательный контроль



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Рис. 3. Электрофореграмма гидролиза ПЦР-продуктов амплификации 16S рДНК, обработанных эндонуклеазами рестрикции *Mbo*I (2 – 4), *Hha*I (5 – 7), *Mse*I (8 – 10):
1 – маркер длин фрагментов рUC19 DNA/*Msp*I; 2, 5, 8 – штамм SN501; 3, 6, 9 – штамм И10b; 4, 7, 10 – штамм И12b; 11 – маркер длин фрагментов 1kb DNA Ladder (Life Technologies, США)

У штаммов И10b, И12b, И23 и И27 определены нуклеотидные последовательности 16S рДНК. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штаммы И12b, И23 и И27 являются представителями рода *Bacillus*. На филогенетическом древе изоляты по-

падают в разные 16S рДНК-группы бацилл (Ash et al., 1991): штаммы И23 и И27 группируются с представителями 1-й группы, а штамм И12b образует кластер с видами 6-й группы (рис. 4).

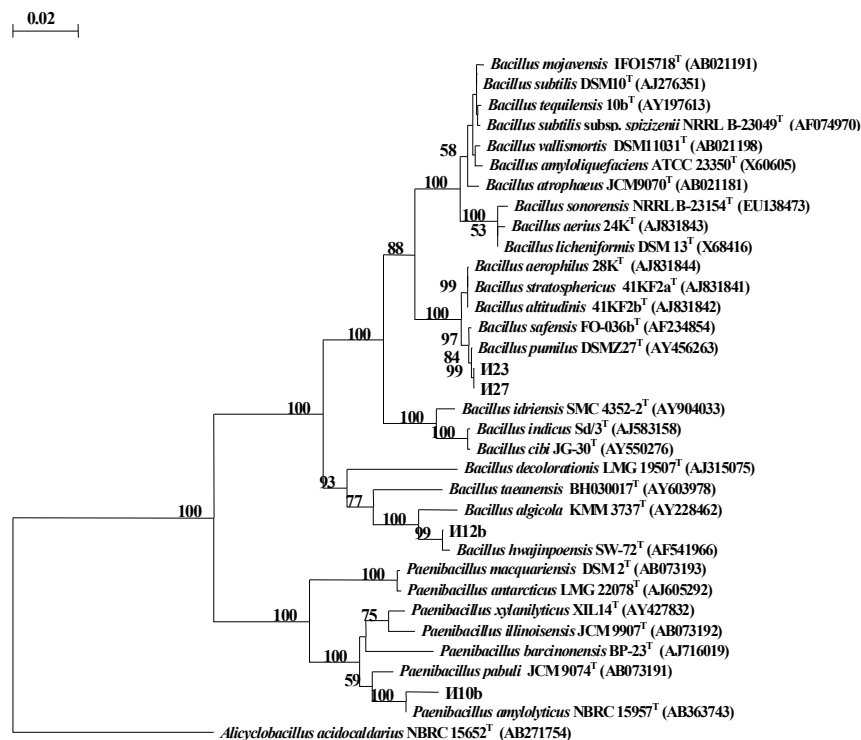


Рис. 4. Филогенетическое древо, построенное с использованием метода «neighbor-joining», основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S рДНК видов родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, близкородственных исследуемым штаммам. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%)

Максимальный уровень 16S рДНК сходства, составляющий 99.5%, штаммы И23 и И27 имеют с

видами *Bacillus pumilus* и *Bacillus safensis*, а изолят И12b – с видом *Bacillus hwasinpoensis*. На данном

этапе работы штаммы идентифицированы как *Bacillus* spp.

Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма И10b выявил принадлежность его к роду *Paenibacillus*, который был предложен для объединения видов, относящихся к 3-й 16S рДНК-группе рода *Bacillus* (Ash et al., 1994). Наибольший уровень сходства (98%) изолят имеет с *Paenibacillus amylolyticus*. Штамм идентифицирован как *Paenibacillus* sp.

Исследована способность выделенных штаммов к росту на различных ароматических и алифатических углеводородах. Установлено, что штаммы И10b и И12b используют дизельное топливо, нафталин и декан в качестве субстрата. Штаммы И23, И26, И27 и И28 растут на дизельном топливе и пентадекане. Штамм SN501 способен к росту на нафталине, фенантрене, салицилате, орто-фталате, а также на феноле и октане.

Установлено, что оптимальными для роста выделенных штаммов являются температуры в диапазоне 24–28°C. Большинство штаммов хорошо растет при щелочных значениях pH (до 9.0) среды культивирования, а штамм И23 – при pH 7.0–10.0. Изоляты способны к росту в полноценной среде в условиях повышенных концентраций хлорида натрия: до 9% – штаммы SN501, И10b, И12b, И23, И27 и до 11% – штаммы И26, И28. Штамм SN501 растет на нафталине при концентрации NaCl в среде культивирования – до 5%.

Работа поддержана грантами РФФИ-Урал №07-04-96078_a и РФФИ-Урал №07-04-97625_офи.

Библиографический список

- Гавриш, Е.Ю. Три новых вида бревибактерий – *Brevibacterium antigium* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. и *Brevibacterium permense* sp. nov. / Е.Ю. Гавриш, В.И. Краузова, Н.В. Потехина, С.Г. Карасев, Е.Г. Плотникова, О.В. Алтынцева, Л.А. Коростелева, Л.И. Евтушенко // Микробиология. 2004. Т. 73, № 2. С. 218–225.
- Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж.Сэмбрук // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 390с.
- Методы общей бактериологии / пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардт и др. Т. 1–3. М.: Мир, 1983.
- Определитель бактерий Берджи / пер. с англ.; под ред. Дж. Хоулта и др. Т. 1, 2. М.: Мир, 1997.
- Плотникова, Е.Г. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок / Е.Г. Плотникова, О.В. Алтынцева, И.А. Кошелева, И.Ф. Пунтус, А.Е. Филонов, Е.Ю. Гавриш, В.А. Демаков, А.М. Боронин // Микробиология. 2001. Т. 70, № 1. С. 61–69.
- Плотникова, Е.Г. Разнообразие и функционирование микроорганизмов из техногенных почв района солеразработок Верхнекамья / Е.Г. Плотникова, Л.Н. Ананьина, О.В. Ястребова, Д.О. Рыбкина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы конгресса. Ч. 2. М., 2007. С. 135.
- Розанова, Е.П. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах / Е.П. Розанова, Т.Н. Назина // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Annweiler, E. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans* / E. Annweiler, H.H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrok, C. Garms, S. Franke, W. Francke, W. Michaelis // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. P. 518–523.
- Ash, C. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit - ribosomal RNA sequences / C. Ash, J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, M.D. Collins // Lett. Appl. Microbiol. Vol. 13. P. 202–206.
- Ash, C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test / C. Ash, F.G. Priest, M.D. Collins // Antonie van Leeuwenhoek. 1993. Vol. 64. P. 253–260.
- Doddamani, H.P. Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species / H.P. Doddamani, H.Z. Ninnekar // Curr. Microbiol. 2000. Vol. 41. P. 11–14.
- Jukes, T.H. Evolution of protein molecules / T.H. Jukes, C.R. Cantor // Mamallian protein metabolism / Ed. H.N. Munro New York: Academic press. 1969. P. 21–132.
- Lim, J.-M. *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium, isolated from a salt lake in China / J.-M. Lim, C.O. Jeon, S.-M. Lee, J.-C. Lee, L.-H. Xu, C.-L. Jiang, C.-J. Kim // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. Vol. 56. P. 373–377.
- Margesin, R. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology / R. Margesin, F. Schinner // Extremophiles. 2001. Vol. 5. P. 73–83.
- Nielsen, P. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains; proposal for nine new species / P. Nielsen, D. Fritze, F.G. Priest // Microbiology. 1995. Vol. 141. P. 1745–1761.
- Scortichini, M. Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae* / M. Scortichini, U. Marchesi, M.-P. Rossi, P.D. Prospero // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 476–484.
- Shimura, M. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene / M. Shimura, G. Mukerjee-Dhar, K. Kimbara, H. Nagato, H. Kihohara, T. Hatta // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 178. P. 87–93.
- Stapleton, R.D. Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contami-

- nated aquifers / R.D. Stapleton, N.G. Bright, G.S. Saylor // *Microb. Ecol.* 2000. Vol. 39. P. 211–221.
- Thompson, J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- van de Peer, Y. TREECON for Windows a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. van de Peer, R. DeWachter // *Comput. Appl. Biosci.* 1994. Vol. 10. P. 569–570.
- Vargas, A.V. *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkalophilic, halotolerant bacterium isolated from Ke-nyan soda lake / A.V. Vargas, O.D. Delgado, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. Vol. 55. P. 899–902.
- Versalovic, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic, M. Schneider, F.J. de Bruijn, J.R. Lupski // *Meth. Mol. Cell. Biol.* 1994. Vol. 5. P. 25–40.
- Zhuang, W.Q. *Bacillus naphthalinovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation / W.Q. Zhuang, J.-H. Tay, A.M. Maszenan, S.T.L. Tay // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 58. P. 547–553.

Поступила в редакцию 10.04.2008

Bacteria of the genus *Bacillus* isolated from soils in the area of salt mining

O.V. Yastrebova, L.N. Ananyina, E.G. Plotnikova

Using method of enrichment culture seven bacterial strains of genus *Bacillus* have been isolated from soils in the area of salt mining. The analysis of REP- and BOX-PCR showed that the majority of the isolated strains formed one genomic group (I), strains SN501, I10b and I12b differed between each other in the REP- and BOX-DNA profiles and formed three genomic groups (II, III and IV respectively). Strains SN501, I10b and I12b distinguished among each other in the ARDRA profiles and represented different genomic groups. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences indicated that strains I12b, I23 and I27 belonged to the genus *Bacillus*, strain I10b belonged to the genus *Paenibacillus*. The majority of the strains grew at 9–11% NaCl in cultural medium and under the alkaline conditions (pH 7.0–9.0). The strain *Bacillus* sp. SN501 grew on naphthalene as the sole source of carbon and energy at 5% of NaCl.