

УДК 579.87: 579.222.2: 579.222.4: 579.25

НОВЫЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ ШТАММЫ– ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА РОДА *RHODOCOCCLUS*

Д. О. Егорова^а, И. О. Коршунова^б, Е. Г. Плотникова^{а,б}

^а Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: info@iegm.ru

^б Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: biodin@psu.ru

Из образцов техногенно-минеральных образований солеразработок (Березники, Пермский край) выделено 6 штаммов-деструкторов бифенила. На основании морфо-физиологических свойств и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммы идентифицированы как *Rhodococcus* sp. Установлено, что штаммы используют в качестве единственного источника углерода и энергии ряд моно- и полиароматических соединений, а также их хлорированные и гидроксильные производные. Показана способность штаммов использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии в условиях повышенного содержания хлорида натрия в среде.

Ключевые слова: засоленные почвы, почвенные бактерии, анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, *Rhodococcus*, биодеструкторы, галотолерантность, бифенил

Введение

Активное развитие химической и электротехнической промышленности в XX в. привело к загрязнению обширных территорий особо опасными для животных и человека соединениями ароматического ряда – полихлорированными бифенилами (ПХБ). Полихлорированные бифенилы отличаются повышенной устойчивостью к деструктивному действию физических и химических факторов (высокие и низкие температуры, воздействие кислот и щелочей). Согласно Стокгольмской Конвенции (<http://www.unep.org>), полихлорированные бифенилы должны быть полностью выведены из производства; обширные территории, загрязненные данными поллютантами подлежат восстановлению, а ПХБ, находящиеся в местах складирования, должны быть утилизированы. Основную роль в разложении ПХБ в естественных условиях играет бактериальная микрофлора почв и донных отложений (Unterman, 1996; Pieper, 2005; Васильева, Стрижакова, 2007; Seeger, Pieper, 2010).

В течение последних десятилетий описано значительное количество бактерий, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, осуществляющих деструкцию ПХБ (Unterman, 1996; Seeger, Pieper, 2010). Стоит отметить, что известно лишь несколько штаммов, эффективно разлагающих широкий спектр полихлорированных бифенилов (Billingsley et al., 1997; Kim, Picardal, 2001; Pieper, 2005). Активность штаммов по отношению к ПХБ обуславливается наличием метаболических систем разложения незамещенного бифенила (Martinkova

et al., 2008; Seeger, Pieper, 2010). В связи с этим целесообразен поиск новых штаммов-деструкторов ПХБ на основе отбора штаммов, способных активно утилизировать бифенил.

В реальных условиях загрязнение окружающей среды носит комбинированный характер. Присутствие в почвах широкого спектра органических поллютантов, а также таких экстремальных факторов как повышенная минерализация, присутствие тяжелых металлов, высокий или низкий уровень рН – обуславливает стресс у бактерий и приводит к ингибированию процессов деструкции ароматических соединений (Martinkova et al., 2008). В связи с вышесказанным, бактерии, обладающие устойчивостью к стрессовым условиям среды и высокой деструктивной активностью по отношению к органическим поллютантам, представляют интерес для использования их в экобиотехнологиях.

Цель работы – изучение грамположительных бактерий-деструкторов бифенила, выделенных из техногенно-минеральных образований (Березники, Пермский край).

Материалы и методы

Среды и условия выделения штаммов-деструкторов

В работе использовали минеральную среду Раймонда (г/л): NH_4NO_3 – 2.0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, KH_2PO_4 – 2.0, Na_2HPO_4 – 3.0, Na_2CO_3 – 0.1, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 (Розанова, Назина, 1982) и ее модификации: а) с добавлением 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта – в качестве полноценной среды; б) с добавлением $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.001 г/л,

MnSO₄·5H₂O – 0.002 г/л – в качестве минеральной среды при исследовании ростовых характеристик чистых культур. NaCl вносили в среды до конечной концентрации (%): 3, 5, 6, 9. Для получения агаризованных сред вносили агар («Sigma») 15 г/л.

Выделение штаммов деструкторов проводили методом накопительного культивирования. Образцы техногенно-минеральных образований (ТМО) (10 г/л) были помещены в 250 мл колбы с 100 мл основной среды Раймонда (3% NaCl) с бифенилом, в качестве ростового субстрата. Накопительные культуры инкубировали в течение 1 месяца на термокачалке (100 об/мин) при температуре 28°C. Чистые культуры штаммов-деструкторов выделяли путем высева из накопительных культур на агаризованную среду Раймонда с 3% NaCl с бифенилом, чистоту культур контролировали путем высева на полноценную агаризованную среду Раймонда (3% NaCl).

Определение таксономического положения изолированных штаммов

Морфологические и физиологические признаки микроорганизмов изучали по общепринятым методикам (Методы..., 1983; Методы..., 1991). Амплификацию генов 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F и 1492R (Tiigola et al., 2002). Секвенирование продуктов амплификации осуществляли с помощью набора реактивов DYEamic ET Dye Terminator Cycle sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBASE 1000 (JSC GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), TREECON (van de Peer, DeWachter, 1994), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>).

Ростовые характеристики штаммов

Ростовые характеристики штаммов изучали в жидкой минеральной среде Раймонда (3% NaCl) с бифенилом (1г/л) в качестве источника углерода и энергии. Штамм выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 100 мл минеральной среды при температуре 28°C и аэрации на шейкере со скоростью 120 об/мин. Оптическую плотность культур измеряли на спектрофотометре BioSpec-mini (Shimadzu) при длине волны 540 нм. Расчет удельной скорости роста (μ) культуры и время удвоения (t_d) производили по стандартным формулам.

Устойчивость бактерий к содержанию в среде культивирования NaCl

Устойчивость бактерий к содержанию в среде культивирования NaCl определяли на агаризованной и в жидкой минеральных средах с бифенилом (1 г/л) в качестве ростового субстрата. Концентрация хлорида натрия в среде составляла от 0 до 9%. Рост бактерий учитывали на седьмые сутки.

Субстратная специфичность штаммов

Субстратную специфичность штаммов изучали при выращивании на минеральной среде Раймонда с 3% NaCl (Плотникова и др., 2006). В качестве единственного источника углерода и энергии использовали фенантрен, нафталин, бифенил и ряд карбоновых кислот: бензойную, гентизиновую, *пара*-гидроксibenзой-ную (ПГБК), 2- и 4-хлорбензойные (2ХБК, 4ХБК), *орто*-фталевую.

Статистическая обработка результатов

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Методом накопительного культивирования из образцов ТМО были выделены шесть штаммов бактерий. Штаммы ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10, ЕК-11 и ЕК-12 при росте на полноценной среде формировали круглые колонии с гладкой, блестящей поверхностью, непрозрачные, светло-бежевые, с гладким краем. Изолированные бактерии – аэробы, клетки неподвижные, не образуют спор, характеризуются выраженной каталазной активностью. Для исследуемых бактерий характерен трехстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочковидные, нитевидные или ветвящиеся клетки – кокки).

У штаммов ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10 и ЕК-11 определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК длиной 666, 589, 511, 682 и 582 п.н., соответственно, и проведено их сравнение с гомологичными последовательностями, имеющимися в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ и на сервере EzTaxon. Выявлена филогенетическая близость штаммов ЕК-7 и ЕК-10 с типовым штаммом *Rhodococcus wratislavenensis* NCIMB 13082^T, штаммов ЕК-9, ЕК-11 – с *Rhodococcus opacus* DSM 43205^T, штамма ЕК8 – с *Rhodococcus percolatus* MBS1^T. На данном этапе исследований изолированные бактерии отнесены к роду *Rhodococcus*.

Изучена способность штаммов к росту моно- и полиароматических углеводов (табл. 1). Известно, что представители рода *Rhodococcus* способны разлагать широкий спектр органических

поллютантов, в том числе, ароматические углеводороды и их хлорированные производные (Seto et al., 1995; Martinkova et al., 2008). Изолированные нами штаммы проявляли способность использовать в качестве единственного источника углерода и энергии моно- (бензойная, гентиизиновая, орто-фталевая кислоты) и полиароматические (фенантрен, нафталин, бифенил) углеводороды, а так же

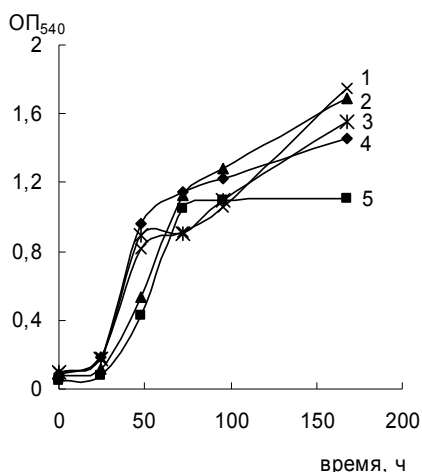
их хлор- и гидроксипроизводные (4ХБК, 2ХБК, ПГБК). Установлено, что штаммы ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10 и ЕК-12 способны расти в жидкой минеральной среде Раймонда (3% NaCl) с бифенилом в качестве единственного источника углерода и энергии (рисунок). Рост культур характеризовался непродолжительной подготовительной фазой.

Таблица 1

Рост штаммов рода *Rhodococcus* на ароматических субстратах

Штамм	Фенан- трен	Бифе- нил	Нафта- лин	Бензоат	Генти- зат	о- фталат	ПГБК	4ХБК	2ХБК
ЕК-7	++	++++	++	+	++	+++	++++	+	++
ЕК-8	++	++++	++	+	++	++++	++++	+	++
ЕК-9	++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++
ЕК-10	++	++++	+++	+	++	++	++++	+	++
ЕК-11	++	++++	+++	+	++	++	++++	+	++
ЕК-12	++	++++	++	+	++	++	++++	+	++

«++++» – колонии размером более 0.3 см, «+++» – колонии размером 0.2–0.3 см, «++» – колонии размером 0.1–0.2 см, «+» – колонии размером менее 0.1 см.



Рост штаммов *Rhodococcus* sp. на бифениле (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии при 3% NaCl в среде:

1 – ЕК-10; 2 – К-9; 3 – ЕК-12; 4 – ЕК-7; 5 – ЕК-8

Для всех исследуемых штаммов была отмечена значительная оптическая плотность культуры при достижении стационарной фазы роста (ОП₅₄₀ 1.0–1.2 ед.).

В табл. 2 приведены параметры роста родококков в минеральной среде с бифенилом. Высокая удельная скорость роста штаммов свидетельствует об эффективном использовании бифенила в качестве ростового субстрата.

Физиологические характеристики роста исследуемых штаммов сопоставимы с таковыми параметрами описанного нами ранее штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus ruber* P25 (=ИЭГМ 896) (Рыбкина, 2003).

Изучено влияние NaCl на способность изолированных штаммов использовать бифенил в качестве источника углерода и энергии (табл. 3).

Таблица 2
Ростовые характеристики штаммов-деструкторов бифенила

Штамм	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Время удвоения, ч
ЕК-7	0.069±0.002	10.0±0.1
ЕК-8	0.053±0.002	13.0±0.2
ЕК-9	0.046±0.004	15.0±0.2
ЕК-10	0.064±0.003	10.5±0.1
ЕК-12	0.069±0.005	10.0±0.1

Установлено, что максимальный уровень минерализации, при котором штаммы проявляли свои деструктивные свойства, при культивировании в жидкой среде составил 5%, а на агаризованной – 6%. В литературе встречаются лишь единичные сведения по бактериальному разложению бифенила в условиях повышенной минерализации среды. Так известно, что штамм *Dyella ginsengisoli* LA-4 использовал бифенил как ростовой субстрат при содержании NaCl в среде до 3% и проявлял деструктивные свойства по отношению к данному субстрату при минерализации среды до 10% (Li et al., 2009). Для штаммов рода *Rhodococcus* способность расти на бифениле в жидкой минеральной среде, в присутствии высоких концентраций хлорида натрия описана впервые. В тоже время, известны факты разложения родококками бензола и нафталина в условиях повышенной осмолярности среды (Luz et al., 1997, Плотникова и др., 2001, 2006).

Следует отметить, что исследуемые штаммы растут в минеральных средах с бифенилом как в присутствии хлорида натрия, так и в его отсутствие. Данные результаты позволяют отнести исследуемые штаммы к галотолерантным микроорга-

низмам, по классификации Кашнера (Кашнер, 1981).

Таблица 3

Рост штаммов рода *Rhodococcus* на бифениле при различном содержании NaCl в среде

Штамм	Содержание NaCl в агаризованной среде, %				Содержание NaCl в жидкой среде, %			
	0	3	6	9	0	3	5	6
ЕК-7	++++*	++++	++	–	++++**	++++	+	–
ЕК-8	++++	++++	++	–	++++	++++	+	–
ЕК-9	++++	++++	++	–	++++	++++	+	–
ЕК-10	++++	++++	++	–	++++	++++	+	–
ЕК-11	++++	++++	++	–	++++	++++	+	–
ЕК-12	++++	++++	++	–	++++	++++	+	–

* «++++» – колонии размером более 0.3 см, «+++» – колонии размером 0.2–0.3 см, «++» – колонии размером 0.1–0.2 см, «+» – колонии размером менее 0.1 см, «–» – нет роста, ** «++++» – ОП₅₄₀ > 1.5; «+++» – ОП₅₄₀ 1.0–1.5; «++» – ОП₅₄₀ 0.5–1.0; «+» – ОП₅₄₀ < 0.5; «–» – нет роста.

Заключение

На современном этапе развития технологий восстановления загрязненных территорий становится очевидным тот факт, что эффективная очистка почв возможно только при использовании в составе биопрепаратов бактериальных штаммов, проявляющих свои деградативные свойства в отношении поллютантов не только в оптимальных, но и в экстремальных условиях.

Выделенные галотолерантные штаммы *Rhodococcus* sp. ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10, ЕК-11 и ЕК-12 обладают широким спектром деградативной активности в отношении ароматических соединений. Установлено, что исследуемые штаммы используют в качестве ростовых субстратов как моно-, так и полиароматические углеводороды, а также их хлор- и гидроксипроизводные. Особый интерес представляет тот факт, что штаммы утилизируют бифенил в условиях осмотического стресса, вызванного повышенным содержанием хлорида натрия в среде культивирования.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале описанных штаммов для использования в биотехнологиях очистки окружающей среды от ароматических соединений. Будут продолжены исследования по изучению деструктивных свойств изолированных штаммов *Rhodococcus* spp. в отношении полихлорированных бифенилов.

Работа поддержана грантами ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Библиографический список

Васильева, Г.К. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами / Г.К. Васильева, Е.П. Стрижакова // Микробиология. 2007. Т. 76. №6. С. 725–741.
Кашнер, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Д. Кашнер. М.: Мир, 1981. 390 с.

Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардт [и др.]. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.

Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Звягинцева Д. Г. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.

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 др.] // Микробиология. 2001. Т. 70. С. 61–70.

Плотникова, Е.Г. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина, Л.Н. Ананьина, О.В. [и др.] // Экология. 2006. №4. С. 261–268.

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

Рыбкина, Д.О. Исследование аэробных бактерий, разлагающих полихлорированные бифенилы и хлорбензойные кислоты: Дис... канд. биол. наук: 03.00.07 / Рыбкина Дарья Олеговна. Пермь, 2003. 181 с.

Billingsley, K.A. Studies on the transformation of selected polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* strain LB400 / K.A. Billingsley, S.M. Backus, O.P. Ward // Can. J. Microbiol. 1997. Vol. 43. P. 782–788.

Kim, S. Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source / S. Kim, F.W. Picardal // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 64. P. 1953–1955.

Li, A. Characterization of a newly isolated biphenyl-degrading bacterium, *Dyella ginsengisoli* LA-4 / A. Li, Y. Qu, J. Zhou, F. Ma // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. Vol. 159. P. 687–695.

Luz, M. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene / M. Luz, F. Paje, A. Brett [et al.] // Microbiology. 1997. Vol. 143. P. 2975–2981.

Martinkova, L. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martinkova, B. Uhnakova, M.

- Patek [et al.] // Environ. Int. 2009. Vol. 35. P. 162–177.
- Pieper, D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 67. P. 170–191.
- Seeger, M. Genetics of biphenyl biodegradation and co-metabolism of PCBs / M. Seeger, D.H. Pieper // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010. 4699 p.
- Seto, M. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / M. Seto, K. Kimbara, M. Shimura // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. P. 3353–3358.
- Thompson, J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / D.G. Higgins, T.J. Gibson // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.
- Tirola, M.A. Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. Strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system / M.A. Tirola, M.K. Mannisto, J.A. Puhakka, M.S. Kulomaa // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 173–180.
- Unterman, R. A history of PCB biodegradation // Bioremediation. Principles and Applications / Eds. R.L. Crawford, D.L. Crawford. Cambridge University Press, New York, 1996. P. 209–253.
- 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. De Wachter // Comput. Appl. Biosci. 1994. Vol. 10. P. 569–570.

Поступила в редакцию 23.03.2010

New halotolerant strains of the genus *Rhodococcus* – degraders of biphenyl

D. O. Egorova, candidate of biology, research scientist

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 614081, Perm, Golev str, 13; info@iegm.ru; (342)2446712

I. O. Korshunova, student

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru

E. G. Plotnikova, candidate of biology, senior scientist

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 614081, Perm, Golev str, 13; info@iegm.ru

Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990; biodin@psu.ru

Using a method of enrichment culture, six biphenyl-degrading bacterial strains have been isolated. The analysis of their morphology, physiology and 16S rDNA sequences indicated that these isolates belonged to the genus *Rhodococcus*. The strains were able to use mono- and polyaromatic hydrocarbons and its chloro- and hydroxyl-derivatives as a sole carbon and energy source. The strains were able to use biphenyl as a sole carbon and energy source in the presence of elevated levels of NaCl in the culture medium.

Key words: saline soils; soil bacteria; analysis of 16S rRNA gene; *Rhodococcus*; biodestructors; halotolerance; biphenyl.

Егорова Дарья Олеговна, кандидат биологических наук, научный сотрудник
ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

Коршунова Ирина Олеговна, студент
ГОУВПО «Пермский государственный университет»

Плотникова Елена Генриховна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ГУ РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»
ГОУВПО «Пермский государственный университет»