

УДК 579:678.049.4

## БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ОРТО-ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ОТХОДОВ КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Е. С. Пастухова, Д. О. Егорова, О. В. Ястребова, Е. Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, Голева,13; info@iegm.ru

Из образцов техногенно-минеральных образований района солеразработок (г. Березники, Пермский край) выделено восемь галотолерантных штаммов-деструкторов орто-фталата. На основании морфологических, биохимических свойств и анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК четыре изолята были отнесены к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Установлено, что штаммы-деструкторы орто-фталата способны к росту на различных ароматических углеводородах и продуктах их разложения. Показана способность штаммов рода *Rhodococcus* использовать орто-фталат в качестве ростового субстрата в условиях повышенного содержания хлорида натрия в среде.

**Ключевые слова:** орто-фталат; бактерии-деструкторы; REP-ПЦР; BOX-ПЦР; определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

### Введение

Фталаты представляют собой производные фталевой кислоты, которая существует в виде трех изомерных форм: орто-изомер (фталевая кислота), мета-изомер (изофталевая кислота) и пара-изомер (терефталевая кислота), структурно различающиеся радикалами R, R' сложноэфирной группы (рис. 1). Фталаты широко используются в качестве пластификаторов, при синтезе полиэфирных волокон и полиэтилена. Выявлены гепатотоксичные, тератогенные и канцерогенные свойства этих соединений (Liang et al., 2008). Фталаты отнесены к группе суперэкотоксикантов (стойким органическим загрязнителям, СОЗ), к которым в настоящее время предъявляются наиболее жесткие экологические требования (Стокгольмская конвенция. <http://www.unep.org>).

Фталаты обнаружены в отходах горнодобывающей промышленности, в том числе в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах отходов калийного производства (разработки Верхнекамского месторождения солей, Пермский край). Учитывая полное отсутствие этих соединений в породах галогенных формаций, высокий уровень загрязнения отходов данного производства обусловлен использованием в технологическом цикле обогащения калийных руд целой гаммы реагентов (оксиэтилированные жирные кислоты, нефтепродукты, диоксидные спирты и др.), продуктами трансформации которых и являются фталаты (Бачурин, Одинцова, 2006).

Известны бактерии, способные осуществлять разложение фталатов. Среди таких организмов вы-

явлены представители родов *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Delftia*, *Acinetobacter* (Liang et al., 2008). На рис. 1 представлены метаболические пути разложения эфиров фталевой кислоты, сочетающие два процесса: первичная биodeградация диэфиров фталата до моноэфиров и последующая их деструкция до орто-фталевой кислоты. Разложение орто-фталевой кислоты аэробными бактериями осуществляется через образование протокатеховой кислоты (ПКК), в качестве основного метаболита, до основных продуктов жизнедеятельности микробной клетки (Vamsee-Krishna et al., 2006).

Цель работы – исследование разнообразия бактерий-деструкторов орто-фталевой кислоты, выделенных из глинисто-солевых шламов района солеразработок.

### Материалы и методы исследования

Образцы техногенно-минеральных образований (ТМО) были отобраны из шламохранилища предприятия БКРУ1 ОАО «Уралкалий» (г. Березники). В составе исследуемых образцов обнаружены органические соединения различного строения, в том числе углеводороды (алифатические, нафтовые, ароматические) и фталаты (Бачурин, Одинцова, 2006).

### Метод накопительных культур

Для выделения штаммов микроорганизмов использовали метод накопительного культивирования. Образцы ТМО (1 г) были помещены в 250 мл

колбы со 100 мл минеральной среды Раймонда (МР), содержащей 3% NaCl (Розанова, Назина, 1982). В качестве единственного источника углерода и энергии был использован орто-фталат (1 г/л). Инкубация проводилась в течение двух недель на термокачалке (100 об./мин.) при температуре 28°C. Из накопительных культур путем высева на ага-

зованную МР (АМР), содержащую 1 г/л орто-фталата, выделяли чистые культуры микроорганизмов. Чистота культур контролировалась путем высева на агаризованную богатую среду Раймонда (АБР), в составе которой присутствуют триптон (5,0 г/л) и дрожжевой экстракт (2,5 г/л).

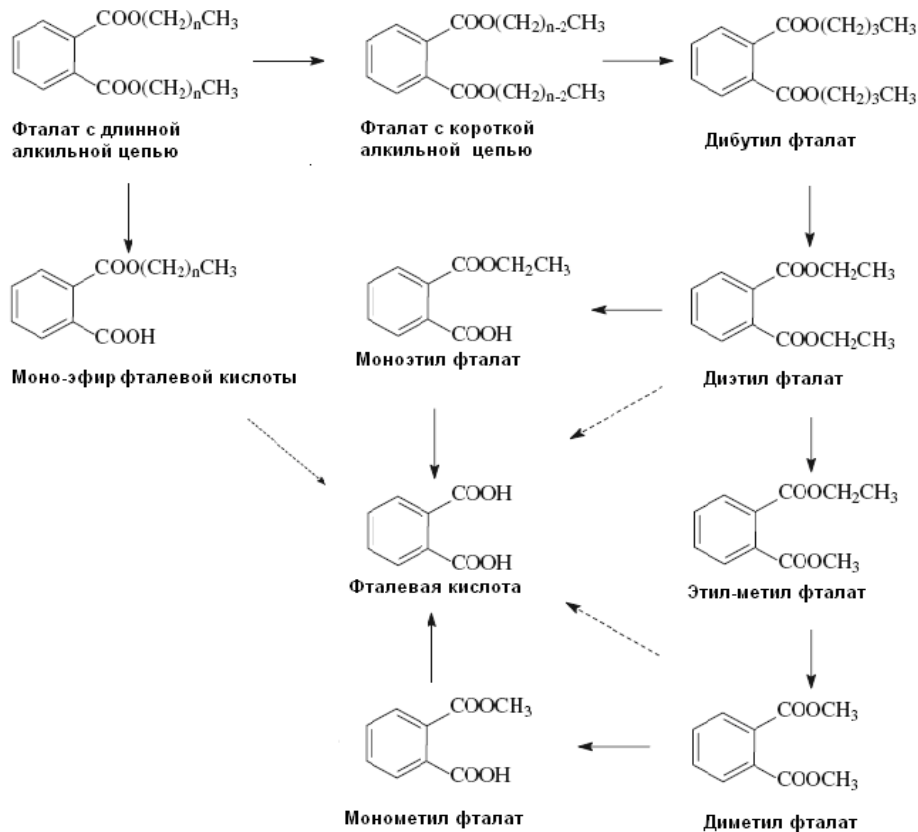


Рис. 1. Пути бактериальной деградации фталатов (Liang et al., 2008)

### Изучение физиологических и биodeградативных свойств бактерий

Устойчивость бактерий к повышенной солености среды (концентрация NaCl от 3 до 15%) определяли при культивировании на АБР и АМР (орто-фталат, 1 г/л). При изучении биodeградативных свойств бактерии выращивали на АМР (концентрация NaCl 3%), используя в качестве единственного источника углерода и энергии одно из следующих соединений: *para*-гидроксибензойную кислоту (ПГБК), протокатеховую кислоту (ПКК), салицилат, бензоат, гентизат, орто-фталат (концентрация в среде 1 г/л); а также нафталин, бифенил, бензол, толуол, фенол (бактерии выращивали в парах, добавляя вещества на крышку перевернутой чашки Петри). Рост бактерий на агаризованных средах учитывали на седьмые сутки. Оценка роста проводилась по формированию колоний: слабый рост «+» – колонии размером менее 1 мм; средний рост «++» – колонии размером 1–2 мм; хороший рост «+++» – колонии размером более 3 мм.

Ростовые характеристики штаммов-деструкторов изучали в жидкой минеральной среде Раймонда с 3% NaCl и орто-фталатом (1 г/л) в качестве источника углерода и энергии. Штаммы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 50 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», Япония) при длине волны 540 нм.

### Типирование и таксономическое положение изолированных штаммов

Типирование бактериальных штаммов проводили методом REP-ПЦР и BOX-ПЦР (Versalovic, 1994). Продукты реакции разделяли при электрофоретической разгонке в 1,5% агарозном геле, приготовленном на 1 x TBE буфере (Маниатис и др., 1984).

Предварительную идентификацию изолятов осуществляли на основании изучения их морфологических, биохимических свойств (Определитель

бактерий Берджи, 1997; Методы общей бактериологии, 1983), а также путем анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых бактерий.

Определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, амплифицированных с использованием универсальных бактериальных праймеров (Гавриш и др., 2004), проводили с применением набора реактивов SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе MegaBACE 1000 (JSC GE «Healthcare», США). Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК изучаемых изолятов сравнивали с нуклеотидными последователь-

ностями типовых штаммов близкородственных видов из баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>).

## Результаты и анализ

### Выделение, типирование и идентификация изолятов

Из образцов ТМО методом накопительного культивирования было выделено восемь штаммов бактерий, отличавшихся морфологическими и биохимическими признаками (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика штаммов бактерий, выделенных из ТМО

Штамм	Морфология колоний	Морфология клеток	Грампринад- лежность (КОН тест)	Наличие ка- талазы	Наличие оксидазы
КТ112-7	Светло-розовые, круглые, гладкие, неблестящие, размер 1–3 мм	Мелкие кокки, одиночные/ пары/ цепочки	+	+	–
КТ1131	Светло-розовые, круглые, гладкие, блестящие, размер 2–3 мм	Кокки, одиночные/ пары/ цепочки (4, 8 клеток)	+	+	–
КТ1132	Светло-желтые, круглые, гладкие, блестящие, размер 2–4 мм	Мелкие одиночные кокки	–	+	–
КТ15412	Светло-розовые, круглые, гладкие, блестящие, размер 1–2 мм.	Кокки, одиночные/ пары/ цепочки из 4 клеток	+	+	–
КТ1612	Желто-оранжевые, округлые, с неровным краем, размер 2–3 мм.	Мелкие палочки, подвижные	–	+	–
РО2	Кремевые, округлые, с неровным краем, блестящие, размер 4–8 мм.	Мелкие палочки, подвижные	+	+	–
РО11	Светло-розовые, круглые, гладкие, блестящие, размер 1–2 мм.	Кокки, одиночные/ пары/ цепочки из 4 клеток	+	+	–
РО12	Ярко-оранжевые, круглые, гладкие, блестящие, размер 1–2 мм.	Мелкие кокки, одиночные/ пары/ цепочки из 4 клеток	+	+	–

Проведена сравнительная характеристика выделенных штаммов с использованием методов РЕР-ПЦР и ВОХ-ПЦР. Анализ полученных РЕР-ПЦР профилей фрагментов геномной ДНК исследуемых штаммов показал, что грамположительные штаммы КТ112-7, КТ15412, КТ1131, характеризующиеся сходными морфологическими признаками (табл. 1), принадлежат к трем геномогруппам (рис. 2А). Штамм КТ1131 имеет подобный ПЦР-профиль со штаммом КТ81, изолированным из нафталиновой накопительной культуры (данные не приводятся), что предполагает идентичность выделенных штаммов.

Анализ ВОХ-ПЦР профилей подтвердил принадлежность штаммов КТ112-7 и КТ1131 к геномогруппам I и II соответственно. Фингерпринт грамтрицательного штамма КТ1612 имеет значительные отличия от таковых грамположительных изолятов (рис. 2Б).

У штаммов КТ112-7, КТ1131 (геномогруппы I и II), КТ1612 и РО2 были определены нуклеотид-

ные последовательности фрагмента гена 16S рРНК (табл. 2).

Таким образом, штаммы-деструкторы ортофталата из ТМО, сформировавшихся в шламоотстойниках соледобывающего производства, характеризуются таксономическим разнообразием: выявлены актинобактерии рода *Rhodococcus*, споровые бактерии рода *Bacillus* и протеобактерии рода *Pseudomonas*.

### Устойчивость бактерий-деструкторов к повышенной солености среды

Бактерии способны к росту как при отсутствии в среде хлорида натрия, так и при повышенной солености (табл. 3), на основании чего они были отнесены к галотолерантным/галофильным микроорганизмам (Кашнер, 1981). Так, пять штаммов росли в диапазоне концентраций NaCl от 0% до 6%, штамм *Pseudomonas* sp. КТ1612 – до 7%, грамположительный штамм КТ15412 – до 8%, а

штамм *Vacillus* sp. PO2 – до 15% соли на богатой агаризованной среде Раймонда.

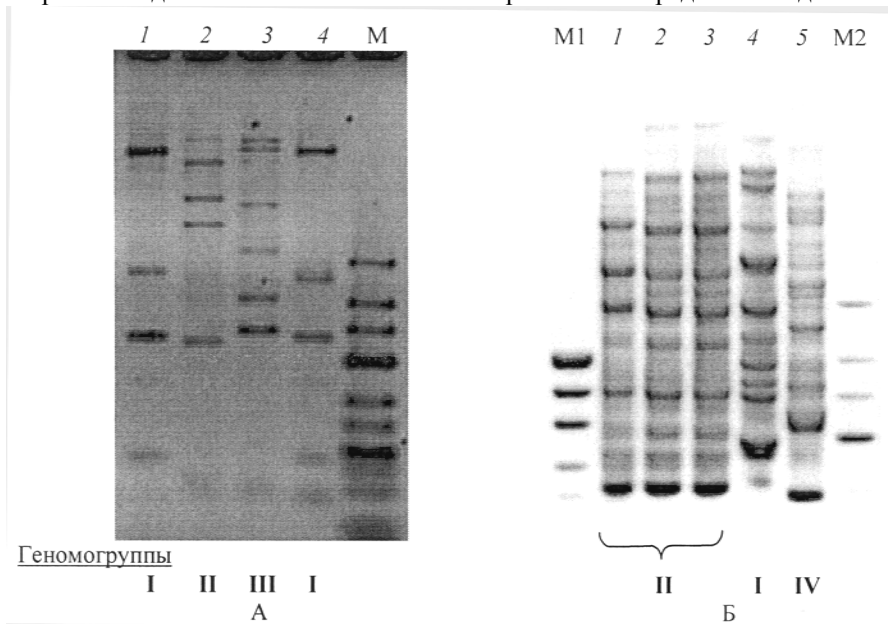


Рис. 2. (А) Электрофореграмма продуктов РЕР-ПЦР штаммов-деструкторов:

1 – КТ1131; 2 – КТ112-7; 3 – КТ15412; 4 – КТ81 (штамм-деструктор нафталина); М – маркер Gene Ruler DNA Ladder Low Range («Fermentas», Литва)

(Б) Электрофореграмма продуктов ВОХ-ПЦР штаммов-деструкторов:

М1 – pUC19 DNA/MspI (*Hpa*II) Marker, 23 («Fermentas», Литва); 1, 2, 3 – клоны штамма КТ112-7; 4 – КТ1131; 5 – КТ1612; М2 – маркер Gene Ruler DNA Ladder Low Range («Fermentas», Литва)

Таблица 2  
Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК бактерий-деструкторов орто-фталата

Штамм	Размер нуклеотидной последовательности, п.н.	Типовые штаммы из международной базы данных GenBank	Сходство (%)
КТ112-7	1400	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>1</sup>	100
КТ1131	682	<i>Rhodococcus erythropolis</i> NBCC 100887 <sup>1</sup>	99,7
КТ1612	885	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> КММ 1447 <sup>1</sup>	98,1
РО2	568	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 <sup>1</sup>	99,4

На минеральной агаризованной среде с орто-фталатом в качестве субстрата исследуемые штаммы росли как без добавления соли, так и при содержании хлорида натрия в среде: штамм

КТ1132 – до 3%, штаммы КТ112-7, КТ1131, КТ15412, КТ1612, РО11 – до 6%, штаммы РО2 и РО12 – до 9% соли (табл. 3).

Таблица 3

Рост бактерий в присутствии различных концентраций хлорида натрия

Штамм	Концентрация NaCl (%), среда АБР										Концентрация NaCl (%), АМР, орто-фталат			
	Без NaCl	3	5	6	7	8	9	10	12	15	Без NaCl	3	6	9
КТ112-7	++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-
КТ1131	++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	-
КТ1132	++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-
КТ15412	++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	+++	++	++	-
КТ1612	++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	-
РО2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
РО11	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-
РО12	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	++	+++	++	-

Примечание. «+» – слабый рост; «++» – средний рост; «+++» – хороший рост; «-» – отсутствие роста бактерий.

### Деструкция ароматических углеводов изолированными бактериями

Исследуемые штаммы были выделены из накопительных культур, где *орто*-фталат добавлялся в качестве субстрата. Показано, что максимальная оптическая плотность (ОП<sub>540</sub>) индивидуальных культур (штаммов КТ1131, КТ1132, КТ15412), растущих в жидкой минеральной среде Раймонда на *орто*-фталате, составляла 0,2 о.е. Наиболее эффективный рост при перечисленных выше условиях наблюдался у штамма КТ112-7 (ОП<sub>540</sub> = 0,85 о.е.).

Микробная деструкция многих полиароматиче-

ских соединений осуществляется через образование *орто*-фталевой кислоты (Seo et al., 2009). Нами было установлено, что выделенные бактериидеструкторы способны к росту на различных ароматических углеводородах и продуктах их разложения (табл. 4). Все культуры росли на бензоле, толуоле, феноле, *пара*-гидроксибензойной и протокатеховой кислотах. Активный штамм-деструктор *орто*-фталата КТ112-7, в отличие от других штаммов, обладает наиболее широкой субстратной специфичностью и характеризуется интенсивным ростом на бифениле, нафталине, бензоате, гентизате (табл. 4).

Таблица 4

Рост бактерий на различных ароматических углеводородах

Штамм	Субстрат									
	Бензол	Толуол	Фенол	Биф.	Наф.	Бензоат	Сал.	Гент.	ПГБК	ПКК
КТ112-7	+++	++	+++	+++	+++	+++	–	+++	+++	++
КТ1131	++	++	+++	+++	–	–	+	++	++	+++
КТ1132	++	++	++	+	–	н.о	–	++	н.о	+++
КТ15412	+++	++	+++	–	–	+++	+	+++	+++	+++
КТ1612	++	+++	+++	+	+	+	–	–	+++	+++
РО2	++	+++	+++	+	+	+	+	–	+++	+++
РО11	++	++	+++	+	+	+++	+	++	+++	+++
РО12	+	++	++	–	–	+++	++	++	+++	++

Рост бактерий: «+» – слабый, «++» – средний, «+++» – хороший; «–» – отсутствие роста; Биф. – бифенил; Наф. – нафталин; Сал. – салицилат; Гент. – гентизат, ПГБК – *пара*-гидроксибензойная кислота; ПКК – протокатеховая кислота.

### Заключение

В исследуемых образцах техногенно-минеральных образований района разработок Верхнекамского месторождения солей обнаружены грамположительные и грамотрицательные бактерии-деструкторы *орто*-фталата, отличающиеся по физиологическим, деструктивным характеристикам и таксономическому положению. На основании фенотипических и генетических особенностей четыре изолята были отнесены к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Было показано, что исследуемые штаммы являются галотолерантными/галофильными бактериями и, кроме того, штаммы рода *Rhodococcus* способны использовать *орто*-фталат как единственный источник углерода и энергии в условиях повышенной солености среды (при содержании NaCl до 9%). Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего исследования выделенных бактерий, в том числе с целью изучения возможности их использования при очистке засоленных почв, грунтов, водоемов от стойких органических загрязнителей (фталатов, полиароматических углеводов).

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», проект «Исследование метаболизма токсичных органических соединений у аэробных бактерий, анализ генетических и ферментных систем биотрансфор-

мации» (ГР №01200963682), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

### Библиографический список

- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Стойкие органические загрязнители в отходах горного производства // Совр. экол. проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2006. Ч. 2. С. 7–9.
- Гавриш Е. Ю., Краузова В.И., Помехина Н.В. и др. Три новых вида бревибактерий – *Brevibacterium antiguum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. и *Brevibacterium permense* sp. nov. // Микробиология. 2004. Т. 73, № 2. С. 218–225.
- Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 390 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 390 с.
- Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардт и др. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.
- Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Холта и др. М.: Мир, 1997. Т. 1–2.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Liang D.-W., Zhang T., Fang H. et al. Phthalates biodegradation in the environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 80. P. 183–198.

Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2009. Vol. 6. P. 278–309.

Vamsee-Krishna C., Mohan Y., Phale P.S. Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas sp.* PPD and *Acinetobacter lwoffii* ISP4 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 72. P. 1263–1269.

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

Поступила в редакцию 06.07.2010

### Bacteria-destructors of *ortho*-phthalic acid isolated

**E. S. Pastukhova**, PhD-student

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

**O. V. Yastrebova**, candidate of biology, research scientist

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

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, 614081, Russia, Perm, Golev str, 13; info@iegm.ru; (342) 2807442

Using method of enrichment culture eight *ortho*-phthalate-degrading bacterial strains have been isolated from the potassium production wastes. The analysis of morphology, physiology and 16S rRNA gene sequences indicated that isolates belonged to the genera *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*. Strains were found to grow on different aromatic hydrocarbons and their degradation products. Strains were able to use as a sole source of carbon and energy *ortho*-phthalic acid in the presence of high level of NaCl in cultural medium.

**Key words:** *ortho*-phthalate; bacteria-destructors; REP-PCR; BOX-PCR; 16S rRNA gene sequence.

Пастухова Екатерина Сергеевна, аспирант

Егорова Дарья Олеговна, кандидат биологических наук, научный сотрудник

Ястребова Ольга Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник

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