

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КОРСАКОВА Екатерина Сергеевна

**КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ АЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ
ИЗ РАЙОНА ПРОМЫШЛЕННЫХ РАЗРАБОТОК
ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ**

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Е. Г. Плотникова

Пермь – 2014

СОДЕРЖАНИЕ	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Промышленные разработки Верхнекамского месторождения солей.....	11
1.2 Экстремофильные микроорганизмы, способные существовать в условиях высокой минерализации среды.....	15
1.2.1 Общая характеристика бактерий семейства <i>Halomonadaceae</i>	21
1.2.2 Галофильные и галотолерантные бактерии из ризосферы растений.....	25
1.3 Биodeградация моно(поли)ароматических углеводов	28
1.3.1 Разложение нафталина бактериями.....	29
1.3.2 Разложение <i>орто</i> -фталевой кислоты бактериями.....	35
1.3.3 Разложение бензойной кислоты бактериями	40
1.3.4 Галотолерантные и галофильные бактерии-деструкторы стойких органических загрязнителей.....	43
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
2.1 Образцы исследования	49
2.2 Среда и условия культивирования бактерий.....	53
2.3 Методы выделения бактерий.....	53
2.4 Определение ростовых характеристик.....	54
2.4.1 Рост бактерий на ароматических углеводородах.....	55
2.4.2 Рост бактерий при изменении осмолярности среды или концентрации субстрата.....	55
2.5 Разложение ароматических углеводов бактериями.....	56
2.6 Морфологическая и физиолого-биохимическая идентификация бактерий.....	57
2.7 Молекулярно-генетические методы.....	58
2.7.1 Подготовка проб ДНК для ПЦР.....	58

2.7.2 Амплификация гена 16S рРНК.....	59
2.7.3 Амплификация функциональных генов.....	59
2.7.4 Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК	60
2.7.5 Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ.....	60
2.7.6 ДНК-типирование.....	61
2.7.7 Рестрикционный анализ амплифицированных рибосомальных ДНК..	61
2.7.8 Плазмидная ДНК.....	61
2.7.9 Денатурирующий градиентный гель электрофорез.....	62
2.8 Статистическая обработка результатов.....	63
Глава 3. БАКТЕРИИ ИЗ ЗАЛЕЖЕЙ СОЛЕЙ (ВЕРХНЕКАМСКОЕ МЕСТОРОЖДЕНИЕ).....	64
3.1 Бактерии, выделенные из образцов сильвинита и каменной соли (рудник СКПРУ-1, ОАО «Уралкалий», г. Соликамск).....	64
3.2 Микроорганизмы в образце каменной соли, выявленные методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ).....	67
Глава 4. БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ГАЛИТОВЫХ ОТХОДОВ, ГРУНТА, ПОЧВЫ И РАССОЛОСБОРНИКОВ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК.....	69
4.1 Бактерии, выделенные из галитовых отходов района солеразработок (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск).....	69
4.2 Бактерии из образцов грунта, отобранных вблизи солеотвалов Соликамского рудоуправления (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск).....	72
4.3 Бактерии, выделенные из образцов воды, соляных отложений со дна рассолосборника (СКПРУ-2, ОАО «Уралкалий», г. Соликамск).....	75
4.4 Бактерии, выделенные из ризосферы растений, произрастающих вблизи солеотвалов (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск).....	78

Глава 5. ГАЛОФИЛЬНЫЕ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ОТХОДОВ (ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ) КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА ОАО «УРАЛКАЛИЙ».....	88
5.1 Культивируемые галотолерантные бактерии из ТМО шламохранилища БКПРУ-2 ОАО «Уралкалий».....	88
5.2 Культивируемые галофильные бактерии из ТМО шламохранилища БКПРУ-2 ОАО «Уралкалий».....	94
5.3 Культивируемые бактерии-деструкторы из ТМО шламохранилища БКПРУ-1 ОАО «Уралкалий».....	96
5.4 Галотолерантный штамм <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> KT112-7 – деструктор моно(поли)ароматических углеводов.....	100
5.4.1 Идентификация и геномные исследования.....	100
5.4.2 Деградационная активность.....	101
5.4.3 Деструкция ароматических углеводов при разной солености среды.....	104
5.4.4 Функциональные гены деструкции ароматических соединений.....	107
5.4.5 Метаболические пути деструкции <i>орто</i> -ФК и БК у штамма <i>R. wratislaviensis</i> KT112-7.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ.....	115
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Галофильные и галотолерантные микроорганизмы, способные к активной жизнедеятельности в широком диапазоне концентраций солей, имеют весьма широкое распространение. Они обнаружены в природных биотопах (океаны и моря, гиперсоленые озера, солончаковые почвы и т.д.) и антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации (Benlloch *et al.*, 2002; Hedi *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2006; Singh, 2012; Xiang *et al.*, 2008). Галофильные и галотолерантные микроорганизмы - представители трех доменов *Bacteria*, *Archaea* и *Eukarya* (Oren, 2008), используют стратегии, при помощи которых могут противостоять воздействиям высоких концентраций солей: накопление неорганических ионов внутри клеток или активное удаление солей из цитоплазмы за счет накопления высоких концентраций органических молекул – осмолитов.

Район промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей (ВКМКС) (г. Березники, г. Соликамск, Пермский край) объединяет как природные, так и антропогенные, сформировавшиеся в процессе добычи солей, микробоценозы. ВКМКС представляет собой многопластовую толщу соленосных отложений с пластами сильвинита и каменной соли (Белкин, 2008). При промышленной добыче и переработке солей на поверхности грунта складировются отходы производства в шламохранилищах и галитовых отвалах, содержание хлорида натрия в последних составляет более 90%. Растворение материала солеотвалов приводит к появлению зон засоления в радиусе 1-5 м, а в понижениях, прилегающих к подножью, образуются озера с соленой водой (рассолосборники) (Бабошко, Бачурин, 2009; Шубин, 2005).

Кроме того, в отходах (глинисто-солевых шламах, избыточных маточных рассолах) следодобывающего производства предприятий ОАО «Уралкалий» были обнаружены стойкие органические загрязнители, а именно моно(поли)ароматические углеводороды и их производные, галогенсодержащие органические соединения и фталаты (Бачурин, Одинцова, 2009). Данные

соединения, обладающие устойчивостью к внешним воздействиям, токсичностью, канцерогенными свойствами, представляют существенную опасность для здоровья человека и биосферы в целом (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.html>). Таким образом, в районе соледобычи при комплексной нагрузке (высокий уровень минерализации и токсичные поллютанты) возникают условия для выживания уникальных галофильных и галотолерантных микроорганизмов, в том числе способных разлагать широкий спектр экотоксикантов.

Ранее из почв района солеразработок ВКМКС были выделены и охарактеризованы бактерии-деструкторы ПАУ (нафталина, фенантрена) родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* (Плотникова и др., 2001, 2011; Ястребова и др., 2009). В составе полученного из техногеннозасоленной/загрязненной почвы консорциума, метаболизирующего нафталин, выявлены галотолерантные деструкторы рода *Rhodococcus* и галофильные бактерии сем. *Halomonadaceae*, представители которых были описаны в качестве нового рода *Salinicola* (Ананьина и др., 2007). Описаны новые таксоны архей и прокариот, выделенные из продуктов флотационного обогащения калийных минералов и техногенных вод шламохранилища ОАО «Уралкалий» на территории ВКМКС (г. Соликамск, Пермский край) (Реутских, Саралов, 2012; Саралов и др., 2012а; Саралов и др., 2012б; Saralov *et al.*, 2013).

Однако до настоящего времени не было проведено комплексной оценки таксономического (филогенетического) и функционального разнообразия микроорганизмов из природных (ископаемых залежей солей) и техногенных экосистем района разработок ВКМКС. Следует отметить, что галофильные и галотолерантные бактерии характеризуются высоким биотехнологическим потенциалом. Так, осмопротекторные соединения, накапливающиеся клетками для их стабилизации и защитного эффекта, нашли широкое применение в косметической промышленности, а также в качестве криопротекторов (Garrity *et al.*, 2005). Кроме того, солеустойчивые бактерии, способные разлагать широкий спектр ароматических соединений, перспективны для разработки

экобиотехнологий (например, для очистки почв, донных отложений, шламов, характеризующихся высоким уровнем солености) (Singh, 2012). Поэтому исследование культивируемых бактерий с уникальными физиолого-биохимическими свойствами с целью их дальнейшего использования в биотехнологических целях является важным и перспективным направлением исследований.

Цель настоящего исследования – изучение таксономического и функционального разнообразия аэробных органотрофных бактерий из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей.

Основные задачи исследования

1. Выделение и идентификация аэробных бактерий из ископаемых залежей солей и техногенных экосистем территории промышленных разработок ВКМКС.
2. Оценка таксономического (филогенетического) разнообразия галофильных бактерий сем. *Halomonadaceae* из подземных (природных) и наземных (техногенных) экосистем района солеразработок.
3. Исследование бактериального состава ризосферы растений, произрастающих на засоленных почвах территории калийного производства (г. Соликамск).
4. Характеристика аэробных галотолерантных бактерий-деструкторов моно(поли)ароматических соединений, выделенных из отходов (техногенно-минеральных образований) калийного производства (г. Березники).

Научная новизна

Впервые изучено таксономическое (филогенетическое) разнообразие галофильных бактерий в подземных соляных залежах и наземных техногенных объектах промышленных разработок солей на территории России (Верхнекамское месторождения калийно-магниевых солей, Пермский край). Обнаружены представители 40 родов (более 120 видов) бактерий, входящих в состав 24 семейств 4 филумов «*Proteobacteria*», «*Actinobacteria*», «*Bacteroidetes*» и «*Firmicutes*». Выявлены потенциальные представители новых родов и видов в составе классов *Flavobacteriia* и *Gamma proteobacteria*. Показано повсеместное

распространение на территории ВКМКС (ископаемых залежах солей, продуктах их технологической обработки, отходах производства и техногеннозасоленных почвах) протеобактерий семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*). Представители рода *Chromohalobacter* (сем. *Halomonadaceae*) доминировали в образцах руд (сильвинит, каменная соль) и наземных высокоминерализованных образцах (галитовые отходы, донные отложения рассолосборников). Обнаружены бактерии порядка *Actinomycetales*, являющиеся активными деструкторами ароматических углеводов, присутствующих в отходах солепроизводства. Выделен и описан галотолерантный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ АС 2631D), деструктор моно(поли)ароматических углеводов.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты выполненного исследования расширяют представления о разнообразии галофильных и галотолерантных бактерий техногеннозасоленных/загрязненных районов промышленных разработок месторождений калийно-магниевых солей. Информация о бактериальных культурах, способных к деструкции ароматических соединений (стойких органических загрязнителей) при высокой минерализации среды, может быть использована как основа для создания новых подходов к разработке методов биоремедиации экстремальных экосистем. Создана рабочая коллекция галотолерантных/галофильных бактерий (157 штаммов), перспективных для фундаментальных исследований и использования в биотехнологиях. Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, перспективный для разработки новых экобиотехнологий, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН под номером ВКМ АС 2631D. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК 12 штаммов бактерий, выделенных из ризосферы растений, произрастающих на засоленных почвах района соледобычи, депонированы в базе данных GenBank под номерами KF010924 - 28, KC992726 - 31, KC538827.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Галофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*) имеют повсеместное распространение в районе промышленных разработок ВКМКС (Пермский край) – как в ископаемых залежах солей, так и на техногеннозасоленных территориях. Доминирующими культивируемыми бактериями в образцах руд (сильвинит, каменная соль) и наземных высокоминерализованных объектах (галитовые отходы, донные отложения рассолосборников) являются представители рода *Chromohalobacter*.

2. Техногенное засоление почвы оказывает влияние на формирование микробного сообщества ризосферы растений, произрастающих в районе складирования отходов предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край). Доминирующими группами в ризосфере являются бактерии семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas* и *Salinicola*) и галотолерантные бактерии классов *Actinobacteria* и *Bacilli*.

3. В отходах (техногенно-минеральных образованиях) калийного производства (г. Березники, Пермский край) преобладают актинобактерии порядка *Actinomycetales* – деструкторы токсичных органических соединений. Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ АС 2631D) способен разлагать нафталин, орто-фталевую и бензойную кислоты в присутствии повышенных концентраций хлорида натрия.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на II, III и V Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз – Россия», Пермь, 2009, Нижний Новгород, 2010, Тверь, 2012; Международной Научной Конференции «Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний», Кишинев, Молдова, 2011; I Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии», Пермь, 2011; 14-й, 16-й и 17-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»,

Пушино, 2010, 2012, 2013; Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии», Пушино, 2012; VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», Саратов, 2012; VIII Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 2012; Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2013», Тула, 2013; 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, 2013.

По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 28 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 169 литературных источников, из них 47 на русском языке и 122 зарубежных, и приложения.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН и является частью исследований, проводимых по теме «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экосистем и практической деятельности человека» (номер государственной регистрации НИР 01201353247). Исследования поддержаны проектом Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (номер гос. регистрации в ЦИТиС №01200963682), грантом РФФИ-Урал №11-04-96028-р_урал_a, а также научным проектом молодых ученых УрО РАН №13-4-НП-448. Научные положения и выводы полностью базируются на результатах собственных исследований автора.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Промышленные разработки Верхнекамского месторождения солей

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВКМКС) является одним из крупнейших среди месторождений, разрабатываемых в мире. В его недрах месторождения (данные на 01.01.2005 г.) сосредоточено 163,4 млрд. т. калийно-магниевых солей и 17,1 млрд. т. натриевых солей.

ВКМКС представляет собой многопластовую соляную толщу, которая подразделяется на подстилающую *каменную соль*, *калийную залежь* и *покровную каменную соль*. Калийная залежь состоит из *сильвинитовой* и *карналлитовой* зон общей мощностью от 41 до 120 м, средней – 71,2 м. Из полезных ископаемых наиболее распространены сильвинитовые, в меньшей степени – карналлитовые и смешанные породы. Содержание K_2O в солях изменяется от 11,03 до 24,41%, MgO от 1,69 до 10,36%.

Глубина отработки рабочих пластов солей составляет 250 – 380 м. Добытая руда обогащается флотационными и галургическим способами на обогатительных фабриках рудоуправлений ОАО «Уралкалий», г. Березники, г. Соликамск, Пермский край (рисунок 1). *Отходы производства* используются на закладку выработанного пространства гидравлическим и сухим способами с целью поддержания водозащитной толщи для предотвращения затопления рудников и уменьшения деформаций земной поверхности. Добыча и обогащение калийных солей невозможны без *галитовых отходов и глинистых шламов*. ОАО «Уралкалий» ежегодно производит 17-19 млн. т. отходов. На долю Березниковско-Соликамского промышленного узла приходится более 60% от ежегодно образующихся отходов на территории края. Таким образом, породные отвалы вокруг г. Соликамска и г. Березники ежегодно пополняются на миллионы тонн калийных, магниевых, натриевых солей и приводят к сильнейшему засолению природных экосистем, земельных угодий (Косков, Сулима, 2000).

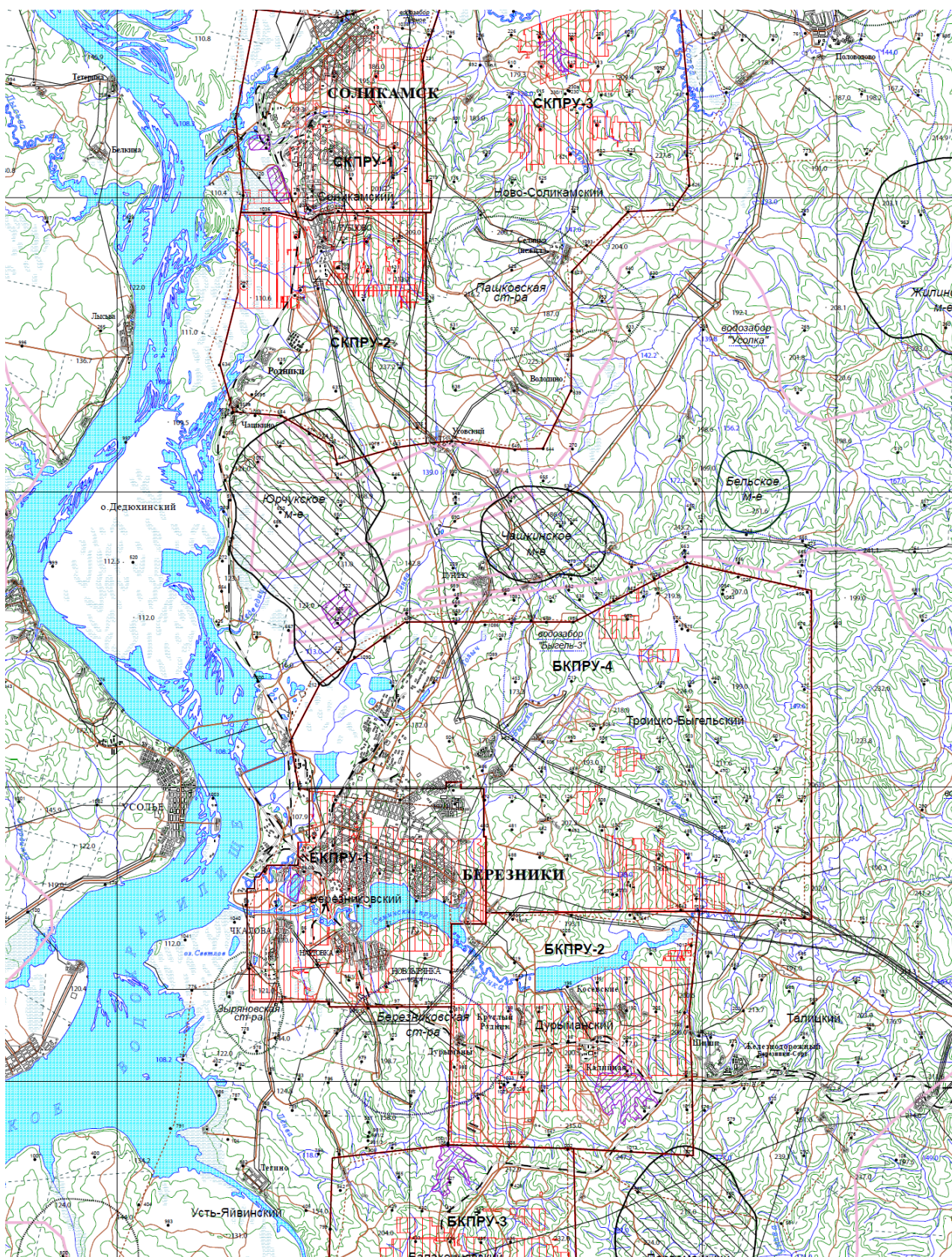


Рисунок 1. Карта территориального расположения Верхнекамского месторождения солей и участков рудоуправлений соледобывающего предприятия ОАО «Уралкалий», гг. Березники и Соликамск, Пермский край (http://berezniki-gaz.narod.ru/31102006/karta100_green.pdf).

Образующиеся в процессе обогащения глинисто-солевые шламы представляют собой сложные поликомпонентные **техногенно-минеральные образования** (ТМО), содержащие широкий спектр токсичных микрокомпонентов и органических соединений. Складирование глинисто-солевых шламов на поверхности приводит к тому, что под воздействием различных гипергенных факторов происходит существенная геохимическая трансформация данных ТМО, часто сопровождающаяся усилением интенсивности выноса поллютантов в окружающую среду (Бабошко, Бачурин, 2011). Помимо твердых галитовых отходов, складированных на поверхности в виде солеотвалов, применяемые технологии обогащения калийных руд сопровождаются образованием глинисто-солевых шламов и избыточных рассолов, для хранения которых требуется сооружение специальных гидротехнических сооружений – **шламохранилищ**. Для их размещения требуются значительные земельные ресурсы – суммарные площади солеотвалов и шламохранилищ составляют более 1000 га. Шламохранилища являются постоянным источником загрязнения гидросферы. Открытый сброс промстоков в поверхностную гидросеть и фильтрация рассолов в грунтовые воды приводят к формированию обширных ореолов засоления гидросферы, создающих угрозу источникам хозяйственно-бытового водоснабжения. Несмотря на проводимые мероприятия по гидроизоляции шламохранилищ, объемы фильтрационных утечек рассолов, даже по официальным данным, достигают в отдельных случаях сотни тысяч кубометров в год (Бабошко, Бачурин, 2004).

Воздействие грунтовых вод и атмосферных осадков приводит к образованию **рассолосборников** – озер с соленой водой, формирующихся в понижениях у подножья солеотвалов, в которых происходит осаждение солей (Шубин, 2005). Организация площадок для складирования солеотвалов приводит к перемешиванию и выравниванию грунтов, в результате чего уничтожаются природные почвы и формируются **техногенные поверхностные образования** (ТПО), выполняющие их функцию. Подобные ТПО, находящиеся на расстоянии 1-5 м от солеотвалов, характеризуются высокой степенью засоления.

ТПО, расположенные в радиусе нескольких десятков метров, имеют преимущественно слабую и среднюю засоленность хлоридом натрия (Еремченко, Лымарь, 2007). При формировании данных территорий большая часть природной растительности уничтожается, и на ее месте формируются сообщества синантропных видов растений. Растительные сообщества, произрастающие на расстоянии 1-5 м возле солеотвалов, характеризуются слабым проективным покрытием (10-30%) и низким видовым разнообразием (не более 10 видов). Характерными видами являлись бескильница расставленная (*Puccinella distans* (Jacq.) Parl.), латук татарский (*Lactuca tatarica* (L.) C.A. Mey.), клоповник широколистный (*Lepidium latifolium* L.), марь сизая (*Chenopodium glaucum* L.), кроме того, встречались злаки (пырей ползучий (*Agropyron repens* L.), вейник наземный (*Calamagrostis epigeois* (L.) Roth) и маревые (лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.) и лебеда красивоплодная (*A. calotheca* (Rafn) Fr.), представители разнотравья (нивяник обыкновенный (*Leucanthemum vulgare* Lam.), полынь обыкновенная (*Artemisia vulgaris* L.), ястребинка зонтичная (*Hieracium umbellatum* L.) (Еремченко, Лымарь, 2007; Лымарь, Еремченко, 2005; Кусакина и др., 2013).

Засоление почвы и воды в результате деятельности калийных комбинатов Верхнекамского промышленного региона сопровождается загрязнением тяжелыми металлами и ксенобиотиками, поступающими в окружающую среду с отходами ряда промышленных предприятий. Так, в составе калийных отходов наряду с природными органическими соединениями зафиксировано присутствие технологических флотореагентов, а именно оксиэтилированных жирных кислот, алифатических аминов, диоксановых спиртов, сульфонов. Водорастворимые комплексы отходов калийного производства обогащены битумозными и углеводородными соединениями, в составе которых присутствуют сверхнормативные концентрации алифатических галогенсодержащих структур ряда C₉-C₁₈, фталевой кислоты и ее эфиров, на долю которых приходится 74-89% углеводородной фракции. Полиароматические углеводороды высокоминерализованных отходов соледобывающего предприятия в основном

представлены нафталинами, антраценами, фенантренами, бензфлуоренами, хризенами, периленами и др. (Бачурин, Одинцова, 2009).

Таким образом, на территории разработок ВКМКС образуются измененные условия обитания, не типичные для данных мест. В таких условиях селекция направлена на формирование уникальных микробных сообществ, в состав которых входят не только галофильные микроорганизмы, но и галотолерантные бактерии-деструкторы (Плотникова и др., 2001).

1.2 Экстремофильные микроорганизмы, способные существовать в условиях высокой минерализации среды

Микроорганизмы способны к активной жизнедеятельности в широком диапазоне концентраций солей. Они обнаружены в природных биотопах (океаны и моря, гиперсоленые озера, солончаковые почвы и т.д.), антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации, и представлены различными видами бактерий, архей, цианобактерий, зелеными водорослями или дрожжами (Benlloch *et al.*, 2002; Hedi *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2006; Singh, 2012; Xiang *et al.*, 2008).

Для характеристики подобных микроорганизмов используют широко распространенную классификацию Кашнера по способности к росту в присутствии различных концентраций солей, согласно которой прокариот можно дифференцировать на негалофильные, а также слабо-, умеренно- и экстремально галофильные микроорганизмы (Кашнер, 1981).

Биохимическая основа галофильного образа жизни микроорганизмов – высокое содержание хлористого натрия в клетке, часто достигающее концентрации NaCl в среде культивирования. Очевидно, что некоторые ферменты крайне галофильных микроорганизмов в процессе эволюции адаптировались к высоким концентрациям хлорида натрия и успешно функционируют в этих условиях. Более того, подобные энзимы проявляют свою максимальную активность при концентрации NaCl 24%. Имеются данные о том, что ионы Na^+

необходимы представителям галофильных микроорганизмов для поглощения из среды растворённых веществ (Ventosa, 1998).

Так как высокие концентрации солей приводят к потерям воды в процессе осмоса, микроорганизмам для выживания в условиях солевого стресса необходимо поддерживать внутри клеток высокое осмотическое давление. Известны два способа, посредством которых микроорганизмы противостоят воздействиям высоких концентраций солей. Первый включает создание «соли в цитоплазме», т.е. накопление неорганических ионов внутри клеток в концентрациях, сравнимых с внешними, а второй – активное удаление солей из цитоплазмы, когда тургорное давление создается за счет накопления высоких концентраций органических молекул – осмолитов (совместимые регуляторы) (Деткова, Болтянская, 2007; Морозкина и др., 2010).

Галофильные археи порядка *Halobacteriales* и анаэробные галофильные бактерии порядка *Haloanaerobiales*, накапливающие соль в цитоплазме, характеризуются высокими (молярными) концентрациями KCl внутри клеток. В клетках *Natroniella acetigena* внутриклеточная концентрация ионов K^+ составляет около 0,9 М, что на несколько порядков превышает его содержание в среде. Величина концентрационных градиентов веществ, проникающих через цитоплазматическую мембрану, а также ионный состав цитоплазмы клеток определяются механизмом действия различных ионных помп и ряда транспортных белков. У таких микроорганизмов клеточные компоненты и белки адаптированы к высоким концентрациям солей, а многие ферментные реакции устойчивы к NaCl и зависят от высоких концентраций ионов K^+ (Морозкина и др., 2010).

Большинство галотолерантных и галофильных микроорганизмов поддерживают осмотический баланс с помощью синтеза или транспорта из внешней среды высокомолекулярных спиртов (глицерин, арабит), сахаров и их производных (сахароза, трегалоза, гликозилглицерин), аминокислот и их производных, а также четырехзамещенных аминов (глицинбетаин, эктоин, гидроксиэктоин). Эти низкомолекулярные компоненты в высоких концентрациях

хорошо растворимы в воде и, в большинстве случаев, не заряжены или являются цвиттерионами при физиологических значениях pH. Количество синтезируемых молекул зависит от концентрации солей в окружающей среде. Как правило, микроорганизмы, реализующие стратегию «совместимые регуляторы», поддерживают низкие или умеренные внутриклеточные концентрации ионов Na^+ , K^+ и СГ. У галофильных бактерий вывод ионов Na^+ из клеток осуществляется при помощи Na^+/H^+ -антипортеров, использующих протонный электрохимический градиент в качестве движущей силы. Некоторые бактерии, накапливающие органические молекулы, могут содержать и молярные внутриклеточные концентрации Na^+ и K^+ , используя сочетание двух способов адаптации к высоким концентрациям солей. При невысоких концентрациях соли в среде (не более 0,5 М) у галофильного штамма *Halomonas elongata* наблюдается накопление в цитоплазме ионов калия, тогда как при увеличении минерализации среды основным осмолитом становится эктоин. Внутриклеточные белки этого галофила содержат больше остатков кислых аминокислот, по сравнению с негалофильными штаммами, что также указывает на сочетание двух способов адаптации (Морозкина и др., 2010).

Таксономическое разнообразие галофильных/галотолерантных микроорганизмов. Микроорганизмы, способные существовать в условиях повышенной минерализации среды можно обнаружить практически во всех таксономических группах. Так, в царстве *Bacteria* присутствуют галофильные микроорганизмы филумов «*Cyanobacteria*», «*Proteobacteria*», «*Firmicutes*», «*Actinobacteria*» и «*Bacteroidetes*». В царстве *Archaea* наиболее солеустойчивые микроорганизмы представлены классом *Halobacteria*. Семейство *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*) почти исключительно содержит галофильных представителей (Oren, 2008). Бактерии филумов «*Firmicutes*» и «*Proteobacteria*» преобладают среди культивируемых микроорганизмов самых разнообразных гиперсоленых местообитаний (Hedi *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2008). В ряде других исследований сообщалось о выделении из засоленных экосистем бактерий

филума «*Actinobacteria*» (Jiang *et al.*, 2006), «*Bacteroidetes*» (Benlloch *et al.*, 2002; Oren, 2008) и «*Proteobacteria*» (Benlloch *et al.*, 2002).

Исследователи из Китая в 2011 г. изолировали ряд галофильных и галотолерантных бактерий из почвенных образцов, отобранных вокруг природного соленого озера провинции Сычуань в Китае. Изученные штаммы оказались представителями филума «*Firmicutes*» (родов *Halalkalibacillus*, *Virgibacillus*, *Marinococcus*, *Salimicrobium*, *Halobacillus* и *Alkalibacillus*) и филума «*Proteobacteria*» класса *Gammaproteobacteria* (родов *Halomonas*, *Idiomarina*, *Chromohalobacter* и *Halovibrio*) (Tang *et al.*, 2011). Ранее Xiang с коллегами сообщали о выделении из гиперсоленых водных образцов данного озера провинции Сычуань бактерий таксономических групп: филума «*Proteobacteria*» класса *Gammaproteobacteria* (род *Halomonas*) и филума «*Firmicutes*» (родов *Planococcus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus*) (Xiang *et al.*, 2008).

Бактерии сходных таксономических групп были выявлены и на других территориях с повышенным содержанием солей. Так, например, на засоленных почвенных участках, а также в прилегающих к ним высокоминерализованных водных эконишах Китая, Кореи, Монголии в большинстве случаев были обнаружены бактерии филума «*Firmicutes*» порядка *Bacilliales* семейства *Bacillaceae* (родов *Alkalibacillus*, *Halobacillus*, *Halovibrio*, *Marinococcus*, *Salimicrobium*). С территории засоленного озера Pulicat в Индии группой исследователей под руководством Н. Sahay в 2011 г. были изолированы грамположительные бактерии филума «*Firmicutes*» семейства *Bacillaceae* родов *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Rummelibacillus*, *Salimicrobium*, *Alkalibacillus* и *Halobacillus*. Кроме вышеперечисленных таксонов также были выделены грамотрицательные бактерии филума «*Proteobacteria*» класса *Gammaproteobacteria*, принадлежащие роду *Halomonas*, близкородственные видам *H. salina*, *H. shengliensis*, *H. salifodinae*, *H. pacifica*, *H. aquamarina* и *H. halophila* (Sahay *et al.*, 2011). Филогенетический анализ на основе последовательностей гена 16S рРНК, проведенный группой иранских исследователей, показал, что бактерии, изолированные из водных и почвенных образцов соленого озера Urmia в Иране,

принадлежали к двум основным филумам: «*Proteobacteria*» класс *Gammaproteobacteria* (92% от общего количества изолятов), в том числе бактерии родов *Salicola* (46%), *Pseudomonas* (13,5%), *Marinobacter* (11%), *Idiomarina* (11%) и *Halomonas* (8%), а также филума «*Firmicutes*» (8% от общего количества изолятов), в том числе бактерии родов *Bacillus* (5%) и *Halobacillus* (3%) (Zununi-Vahed *et al.*, 2011). Кроме того, представители вышеперечисленных филумов были обнаружены в образцах солончаковых почв Национального заповедника дикой природы в Cherokee (Oklahoma, США), а именно – граммотрицательные бактерии родов *Halomonas*, *Idiomarina*, *Salinivibrio* (филум «*Proteobacteria*» класс *Gammaproteobacteria*) и грамположительные бактерии родов *Bacillus*, *Salibacillus*, *Oceanobacillus* и *Halobacillus* (филум «*Firmicutes*»). Помимо изолятов вышеперечисленных таксонов были обнаружены также представители филума «*Bacteroidetes*» (Caton *et al.*, 2004).

Данные по метагеномному анализу засоленных почв (на примере высокоминерализованных территорий провинции Тайвань, Китай) показывают наличие микроорганизмов наиболее характерных доминантных филумов, представители которых были идентифицированы как бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteobacterium*, *Acidovorax*, *Chondromyces* (*Mycobacteriales*), *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, и *Janthinobacterium*. При этом бактерии рода *Pseudomonas* составляли 13% от всего микробного разнообразия (Lin *et al.*, 2013).

В экосистемах, подверженных антропогенному воздействию (например, промышленных солеварнях), филогенетический состав микроорганизмов принципиально не меняется. Встречаются все те же спорообразующие бактерии филума «*Firmicutes*» (родов *Halobacillus*, *Salimicrobium*, *Virgibacillus*) и филума «*Proteobacteria*» класса *Gammaproteobacteria*, зачастую представленным галофильными бактериями семейства *Halomonadaceae* порядка *Oceanospirillales* (родов *Halomonas* и *Chromohalobacter*) (Tang *et al.*, 2011).

Среди актинобактерий антропогенных экосистем (филума «*Actinobacteria*» класса *Actinobacteria* порядка *Actinomycetales*) по данным филогенетического анализа последовательностей 16S рДНК, проведенного Р.А. Jose и S.R.D. Jebakumar в 2012 году на примере промышленной солеварни в Индии, преимущественное положение занимают представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Saccharopolyspora* и *Nocardiopsis*. Наиболее многочисленная группа актиномицетов была близкородственна бактериям родов *Streptomyces* и *Micromonospora* (Jose *et al.*, 2012). Преобладание данных родов актинобактерий наблюдалось ранее на засоленных почвах (Zvyagintsev *et al.*, 2008).

Кроме бактериальной составляющей основным компонентом микробной биомассы таких сред как морские экосистемы, гиперсоленые озера и прилегающие к ним участки почвы, территории промышленной соледобычи и солеварен являются галофильные археи порядка *Halobacteriales* семейства *Halobacteriaceae* (Oren, 2002). Экстремофильные галофильные археи данного семейства, как правило, представлены родами *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halococcus* и *Halorubrum* (Borgne *et al.*, 2008).

На территории Российской Федерации значительный массив галофильных и галотолерантных бактерий, а также экстремофильных архей обнаруживают в антропогенно-загрязненных районах промышленной добычи солевых отложений, происхождение которых приурочено к Пермскому периоду. Одним из таких районов является Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей, расположенное на территории Пермского края. Из образцов почв, грунтов и донных отложений (р. Зырянка), загрязненных отходами соледобывающего производства предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Березники), в 2001 г. были выделены бактериальные культуры родов *Pseudomonas* (филум «*Proteobacteria*» класс *Gamma proteobacteria*), *Rhodococcus*, *Arthrobacter* (филум «*Actinobacteria*» класс *Actinobacteria* порядок *Actinomycetales*) и *Bacillus* (филум «*Firmicutes*») (Плотникова и др., 2001). Изолированы галотолерантные актинобактерии родов *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и

спорообразующие бактерии филума «*Firmicutes*» (родов *Paenibacillus* и *Bacillus*), которые были способны к деструкции стойких ароматических загрязнителей (Плотникова и др., 2006; Плотникова и др., 2011; Ястребова и др., 2008).

Кроме того, из почвы района солеразработок ВКМКС (г. Березники) были выделены грамотрицательные умеренно галофильные бактерии, описанные как представители нового рода *Salinicola* семейства *Halomonadaceae* (типовой штамм *Salinicola socius* SMB35^T), растущие в широком диапазоне солёности среды (5-300 г/л NaCl) (Ананьина, 2007).

Из продуктов флотационного обогащения калийных минералов и техногенных вод шламохранилища ОАО «Уралкалий» (г. Соликамск) были изолированы грамотрицательные бактерии рода *Arhodomonas* (филум «*Proteobacteria*» класс *Gammaproteobacteria*) и грамположительные бактерии рода *Exiguobacterium* (филум «*Firmicutes*») (Реутских, Саралов, 2012; Саралов и др., 2012а). Также в работах А. И. Саралова с коллегами сообщается о выделении архей «*Halarchaeum solikamskense*» RS94^T и «*Haloferax chudinovii*» RS75^T из вышеупомянутого местообитания (Саралов и др., 2012б; Saralov *et al.*, 2013).

Среди галофильных и галотолерантных бактерий значительный интерес представляют грамотрицательные бактерии семейства *Halomonadaceae*, населяющие широкий спектр засоленных экосистем и способных расти в присутствии значительных концентраций солей. Представителей данной таксономической группы микроорганизмов обнаруживают практически во всех высокоминерализованных биотопах.

1.2.1 Общая характеристика бактерий семейства *Halomonadaceae*

Впервые семейство *Halomonadaceae* было описано в 1988 году P.D. Franzmann при объединении умеренно галофильных и морских бактерий родов *Deleya* и *Halomonas* (Franzmann, 1988).

Семейство *Halomonadaceae* входит в класс *Gammaproteobacteria* и согласно базе данных «List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature»

(<http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonadaceae.html>) включает роды *Aidingimonas*, *Carnimonas*, *Chromohalobacter*, *Cobetia*, *Halomonas*, *Halotalea*, *Kushneria*, *Modicisalibacter*, *Salinicola*, *Zymobacter*.

С момента создания семейства *Halomonadaceae* его систематика была под постоянным пересмотром. Из-за очевидного отсутствия основных отличительных фенотипических черт, многие из его современных видов ранее были отнесены к другим родам. Реорганизация среди этих видов началась в середине 1990-х годов с помощью сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК.

В 2010 году R. de la Haba с соавторами провел филогенетическое изучение семейства *Halomonadaceae* на основе полных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и 23S рРНК (de la Haba, 2010). Было показано, что в пределах данного семейства наблюдается высокая гетерогенность. Уровень генетического сходства между представителями сем. *Halomonadaceae* составляет 92,6-100% (рисунок 2).

Бактерии сем. *Halomonadaceae* обнаружены в микробоценозах засоленных экосистем, характеризующихся разными физико-химическими свойствами (аэрация, солёность, pH и температура). К таким экосистемам относятся океаны и моря, засоленные почвы, образовавшиеся естественным образом солёные озёра, солончаковые котловины и т.д. Ряд бактерий данного семейства выделен из продуктов питания, пальмового сока, муниципальных сточных вод, биоплёнок фресок (de la Haba, 2010). В настоящее время нет сведений о патогенности бактерий сем. *Halomonadaceae*.

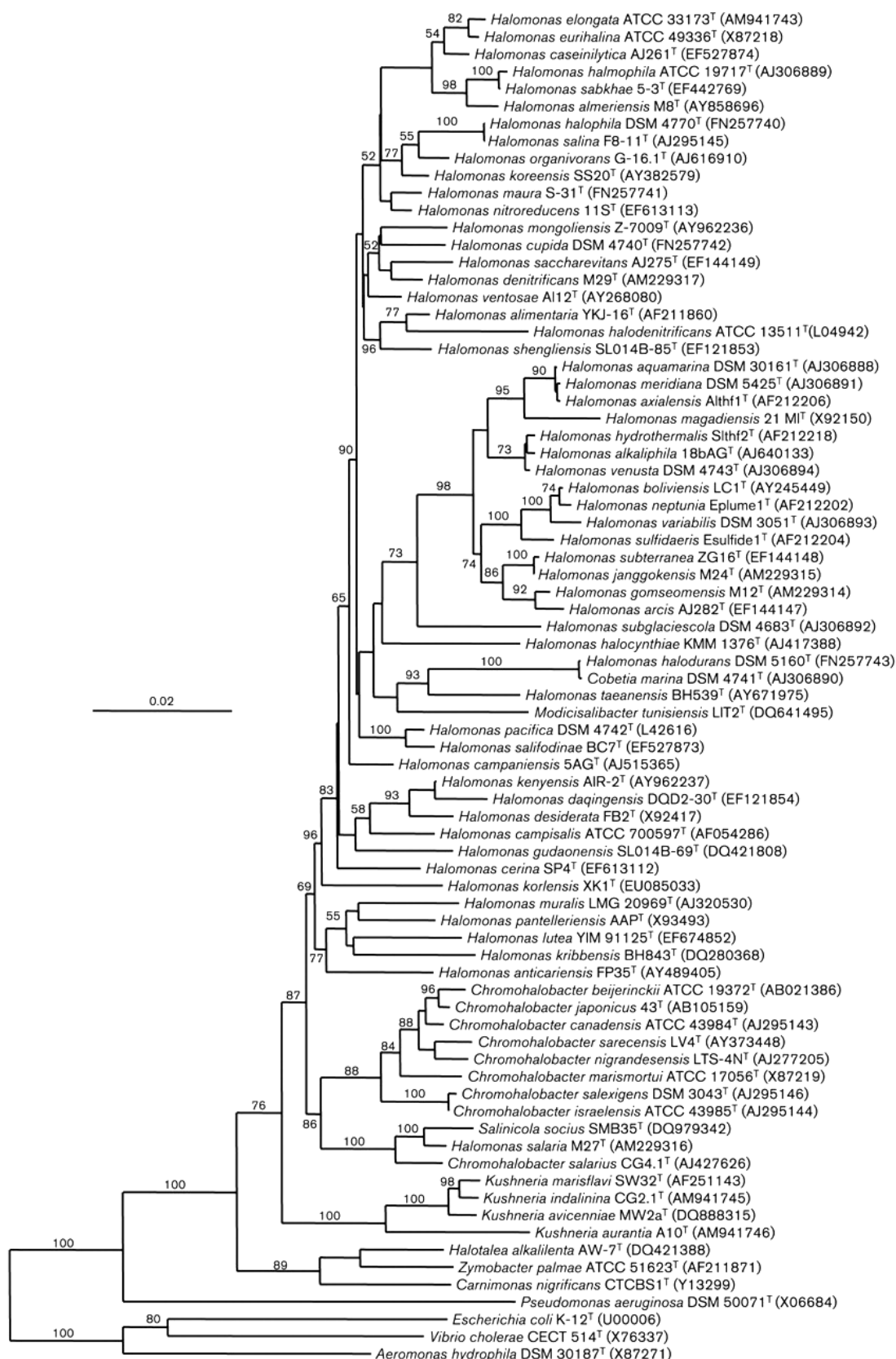


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода neighbor-joining, основанное на сравнении последовательности гена 16S рРНК, показывающее филогенетические отношения между представителями семейства *Halomonadaceae*. В скобках указаны номера в GenBank. Показаны значения «bootstrap»-анализа выше 50% (de la Haba *et al.*, 2010a).

Из литературных данных известно, что галомонады выделены из различных эколого-географических зон, таких как континентальные шельфовые осадки, связанные с Антарктикой, глубоководное морское дно Тихого океана, Великие Солёные озёра штата Оклахомы, озеро Тескоко (Мексика), Гавайский архипелаг, тропические экосистемы, арктические моря. Галотолерантные микроорганизмы в гидротермальных и пелагических водах Северного и Южного полушарий Тихого океана составляют более 28% от общего микробного сообщества, среди которых наиболее часто встречаются бактерии рода *Halomonas* (Kaye, Baross, 2000).

Использование бактерий сем. *Halomonadaceae* в биотехнологических целях.

Синтез осмопротекторных веществ внутри клеток – одно из перспективных биотехнологических направлений использования представителей сем. *Halomonadaceae*. Подобные соединения накапливаются клетками для их стабилизации и защитного эффекта ферментов, нуклеиновых кислот, клеточных структур или целых клеток, на которые действуют низкая активность воды, температурный стресс и другие неблагоприятные условия (Garrity *et al.*, 2005; Knapp *et al.*, 1999; Mellado *et al.*, 2003).

В настоящее время осмопротекторы – эктоин и гидроксiekтоин нашли широкое применение в косметической промышленности. Обнаружено, что эктоин защищает кожу человека от вредного ультрафиолетового излучения, а также способствует защите ее микрофлоры от неблагоприятных факторов окружающей среды. Введение эктоина и его производных в состав косметических препаратов увеличивают их увлажняющую активность.

Штаммы некоторых видов рода *Halomonas* являются продуцентами экзополисахаридов, которые имеют различные функциональные свойства и, следовательно, различное использование, включающее иммуномодуляцию, биодетоксикацию тяжёлых металлов загрязнённых экосистем, эмульгирование сырой нефти, повышение вязкости в пищевых продуктах (Quesada, 2004).

Галомонады, также как и другие умеренно галофильные бактерии, могут использоваться для деградации токсичных соединений при высоких и средних

концентрациях солей, что даёт возможность ремедиации загрязнённых солёных экосистем (Mellado, Ventosa, 2003).

В 2013 году группа исследователей из Университета Гранады в Испании с помощью молекулярно-генетических методов обнаружила, что бактерии сем. *Halomonadaceae* являются продуцентами *N*-ацил-гомосеринлактона (*N*-acyl homoserine lacton - AHL), который отвечает за клеточное взаимодействие или «чувство кворума» - quorum-sensing (QS) клеток и взаимодействует с регуляторными белками, составляющими кластер LuxI-подобных белков. Было показано, что 29 из 43 исследованных видов сем. *Halomonadaceae* содержат гомологи LuxI-подобного белка, а значит, что QS-системы в данной филогенетической группе бактерий имеют повсеместное распространение. Проведенный филогенетический анализ, основанный на определении аминокислотных последовательностей LuxI-подобного белка, показал, что подобные молекулярные структуры видов бактерий сем. *Halomonadaceae* сгруппированы вместе и отличаются от последовательностей других таксонов класса *Gammaproteobacteria*, а также и от видов, принадлежащих к классам *Alphaproteobacteria* и *Betaproteobacteria*, и могут быть использованы в качестве нового филогенетического маркера для бактерий сем. *Halomonadaceae* (Tahrioui *et al.*, 2013).

1.2.2 Галофильные и галотолерантные бактерии из ризосферы растений

Жизненный цикл растений осуществляется в тесном контакте с микроорганизмами, которые либо угнетают развитие растения-хозяина, либо стимулируют его. Самые распространенные примеры таких взаимодействий приведены в таблице 1 (Проворов, 2009).

Микрофлора ризосферной почвы растений выполняет важные экологические функции деструктора органических соединений и является естественным барьером для патогенных микроорганизмов.

Наиболее изученные растительно-микробные симбиозы

Микросимбионты растений	Тип симбиоза	Формы симбиоза	Микросимбионты	Растения-хозяева	Механизмы взаимодействия
Бактерии	Трофический (фиксация N ₂)	Корневые (иногда стеблевые) клубеньки	Ризобии (роды <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i>) или актиномицеты (род <i>Frankia</i>)	Двудольные, относящиеся к 10 семействам клады Rosid I: около 90% видов Fabaceae и <i>Parasponia</i> из Ulmaceae (хозяева ризобий); Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae, Datisaceae (хозяева <i>Frankia</i>)	Инфицирование растений через корневые волоски или разрывы ризодермы; развитие клубеньков из примордиев, образуемых <i>de novo</i> в перикле (актиномицеты) или кортексе (ризобии); инфицирование растительных клеток и дифференцировка бактерий в клеточные формы, осуществляющие фиксацию N ₂ (бактероиды у ризобий, везикулы у <i>Frankia</i>)
		Другие внутриклеточные симбиозы	Цианобактерии <i>Nostoc</i>	Цветковое <i>Gunnera</i>	Инфицирование желёзок, находящихся у основания черешков; проникновение бактерий в растительные клетки*
		Эндوفитные системы	Грамотрицательные бактерии родов <i>Acetobacter</i> , <i>Azoarcus</i> , <i>Herbaspirillum</i>	Различные растения, главным образом злаки	Колонизация межклеточных пространств или сосудистых пучков; N ₂ -фиксация, иногда осуществляется не способными к размножению клеточными формами (<i>Azoarcus</i>)
		Внутриполостные симбиозы	Цианобактерии <i>Nostoc</i>	Голосеменные порядка Cuscutales (саговники)	Колонизация межклеточных пространств коралловидных корней*
	Защитный	Ризосферные ассоциации	Цианобактерии <i>Nostoc</i> (<i>Anabaena</i>)	Водный папоротник <i>Azolla</i>	Инфицирование полостей в водных листьях бактериями, которые передаются в ряду поколений растений (через метаспору)*
		Ризосферные ассоциации	Грамотрицательные бактерии родов <i>Azospirillum</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Enterobacter</i>	Различные растения	Колонизация ризосферы и ризопланов, активируемая корневыми экссудатами (иногда проникновение в наружные ткани корня); N ₂ -фиксация может сопровождаться синтезом бактериями фитогормонов
		Эндوفитные системы	Грамположительные кориневормные бактерии <i>Clavibacter toxicus</i>	Различные растения	Колонизация межклеточных пространств или сосудистых пучков (инфицирование посредством нематод рода <i>Angitia</i>), синтез токсинов (при инфицировании бактерий лигнотенными фагами)
		Ризосферные ассоциации	Различные бактерии (например, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. putida</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i>)	Различные растения	Колонизация ризосферы и ризопланов, активируемая корневыми экссудатами, синтез антибиотиков (феназинов), цианидов или литических ферментов (хитиназы), разрушающих клеточные стенки патогенов

В почве под влиянием корневых выделений растений и экзометаболитов ризосферных микроорганизмов формируется сложный комплекс биологически активных веществ. Формируется так называемый ризосферный эффект, при котором концентрация бактерий, обнаруженных в прикорневой зоне, значительно превышает их концентрацию в почве (Демченко, 2008).

Известно, что в ризосфере растений гумидного климата доминируют бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*), кроме того, для ризосферной зоны типичны бактерии родов *Agrobacterium* (класс *Alphaproteobacteria*), *Xanthomonas*, *Rhizobium* (класс *Gammaproteobacteria*) и *Flavobacterium* (класс *Flavobacteriia*) (Звягинцев и др., 1993; Schlöter *et al.*, 1997; Yanni *et al.*, 1997). Вышеперечисленные бактерии имеют симбиотические взаимоотношения с растениями (таблица 1).

Засоление почв и засуха являются одними из широко распространенных экологических стрессов, которые наиболее сильно влияют на рост растений. Некоторые виды рода *Halomonas*, выделенные из ризосферы растений засушливых и засоленных местообитаний, способны к продукции ауксина и сидерофоров, азотфиксации, солюбилизации фосфатов и проявляют дезаминазную активность. Под влиянием этих биохимических процессов снижается продукция этилена растениями и повышается их устойчивость к осмотическому стрессу (Argandonña *et al.*, 2005; Llamas *et al.*, 2006). В исследовании F. Mapelli с соавторами подробно изучена растительная ризосфера солероса, произрастающего в гиперсоленых экосистемах Туниса. С применением метода денатурирующего градиентного гель-электрофореза ученым удалось обнаружить высокое бактериальное разнообразие, связанное с корневой системой солероса. Из исследуемой ризосферы были выделены микроорганизмы и создана большая коллекция из 475 галофильных и галотолерантных бактерий. Двадцать изолированных штаммов рода *Halomonas* показали устойчивость к широкому набору абиотических стрессов и способность к успешной колонизации корней солероса в лабораторных условиях (Mapelli *et al.*, 2013).

Некоторые представители рода *Halomonas* могут выступать в качестве ростостимулирующих ризобактерий. Так, S. Tiwari с соавторами в своих исследованиях при оценке микробно-растительного взаимодействия наблюдали улучшение активности роста растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum*) после их инокуляции штаммом *Halomonas* sp. SL9 (GenBank FJ984532), изолированным из соленого озера Sambhar в Индии (Tiwari *et al.*, 2011).

Взаимоотношения растений и бактерий рода *Kushneria* изучены гораздо меньше, чем рода *Halomonas*. Однако, для штамма *Kushneria* sp. YCWA18 (GenBank GQ246216) показана способность к солюбилизации фосфатов, что увеличивает биодоступность фосфора в почве для растений (Zhu *et al.*, 2011).

1.3 Биodeградация моно(поли)ароматических углеводов

Биоразрушение (биodeградация) – это преобразование сложных веществ с помощью биологической активности. Это широкое понятие включает три более узких процесса:

- 1) трансформацию или незначительные изменения молекулы;
- 2) фрагментацию или разложение сложной молекулы на более простые соединения;
- 3) минерализацию или превращение сложного вещества в самые простые (H_2O , CO_2 , H_2 , NH_3 , CH_4 и т.д.).

Соединения, содержащие бензольное кольцо, одни из наиболее распространенных в природе. Термодинамическая стабильность бензольного кольца обуславливает устойчивость к химическому разложению соединений ароматического ряда в окружающей среде и их большую опасность для биосферы. Благодаря наличию широкого спектра катаболических путей биodeградации, микроорганизмы могут использовать различные органические соединения в качестве единственного источника углерода и энергии, в том числе и ароматического ряда (Hardwood, Parales, 1996).

Среди органических поллютантов особого внимания заслуживает группа суперэкоотоксикантов (стойких органических загрязнителей / СОЗ), к содержанию

которых в окружающей среде в настоящее время предъявляются наиболее жесткие экологические требования (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.html>). Большинство из этих соединений имеет искусственное и техногенное происхождение. В данную группу включают полициклические ароматические соединения, галогенуглеводороды и фталаты, которые присутствуют в высоких концентрациях в отходах соледобывающего производства (Бачурин, Одинцова, 2009). Опасность фталатов связана с их высокой летучестью и растворимостью в воде, что определяет значительные масштабы их эмиссии в окружающую среду. Фталаты и их метаболиты попадают в организм человека с пищей, через кожу и при вдыхании. Даже небольшие дозы фталатов могут приводить к изменению гормонального фона, нарушению работы печени и почек (Liang *et al.*, 2008)

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), в число которых входят нафталин, фенантрен, антрацен и др., также являются повсеместными загрязнителями окружающей среды. Подобные соединения содержатся в нефти, продуктах ее переработки, отходах коксохимического производства и образуются при неполном сгорании различных видов топлива. Многие ПАУ являются устойчивыми токсичными веществами, при разложении которых возможно накопление опасных метаболитов. Низкая растворимость данных соединений в воде способствует их накоплению в самых разнообразных эконических, прежде всего в почве и водных системах. Разложение ПАУ микроорганизмами осложняется низкой биодоступностью данных соединений вследствие плохой водной растворимости, которая уменьшается с увеличением числа ароматических колец, входящих в их состав (Holman *et al.*, 1999).

1.3.1 Разложение нафталина бактериями

Бактерии-деструкторы нафталина. Для исследования способности бактерий деградировать ПАУ в качестве модельного соединения часто используется нафталин. В настоящее время существует большой объем литературных данных о способности бактерий, принадлежащих к различным таксономическим группам, использовать нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии.

Полная утилизация данного субстрата до метаболитов основного обмена веществ или частичная трансформация описана для бактерий родов: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Polaromonas*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Marinobacter*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Cycloclasticus*, *Neptunomonas*, *Lutibacterium*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Vibrio* и *Micrococcus* (Garsia-Valdez *et al.*, 1988; Grund *et al.*, 1992; Seo, 2009; Zhou, 2013).

Благодаря проведенным многочисленным исследованиям стало известно, что штаммы-деструкторы ПАУ (нафталина) широко распространены в окружающей среде. Такие микроорганизмы изолированы из почв, морской воды, сточных вод и осадков в различных географических зонах. В последнее время довольно часто встречаются работы, в которых исследуется способность микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях, использовать в качестве субстрата нафталин и другие ПАУ.

Так, например, W.Q. Zhuang с коллегами изолировали из нефтезагрязненных морских отложений два аборигенных нафталин-утилизирующих штамма *Staphylococcus* sp. MN-005 и *Micrococcus* sp. MN-006, обладающих высокой скоростью роста на ароматических субстратах при повышенной минерализации среды (Zhuang *et al.*, 2003). Из антарктических почв, загрязненных нефтью, были выделены штаммы, утилизирующие нафталин при 8°C (Aislabie *et al.*, 2000). В то же время изолированы аэробные термофильные бактерии *Bacillus thermoleovorans* и *B. oleovorans*, использующие нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии при 60°C (Annweiler *et al.*, 2000). R.D. Stapleton с соавторами сообщили о биodeградации нафталина в экстремально кислых условиях (Stapleton *et al.*, 1998).

Кроме того, существует ряд публикаций о микроорганизмах, способных к разложению нафталина в условиях повышенной минерализации среды (Dyksterhouse *et al.*, 1995; Hedlund *et al.*, 1999; Chung, King, 2001; Kasai *et al.*, 2002). Из образцов почв, отобранных в районе солеразработок ВКМКС, были выделены бактерии-деструкторы нафталина родов *Arthrobacter*, *Brevibacterium* и *Rhodococcus* (класс *Actinobacteria*), способные к деструкции

нафталина и фенантрена в условиях повышенной концентрации хлорида натрия в среде культивирования (Плотникова и др., 2006; Плотникова и др. 2011; Anan'ina *et al.*, 2011). Описана ассоциация микроорганизмов SMB3, утилизирующая нафталин, в состав которой кроме бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus* входили умеренно галофильные бактерии рода *Salinicola* семейства *Halomonadaceae* и галотолерантные бактерии рода *Thalassospira* класса *Alphaproteobacteria* (Ананьина и др., 2007; Plotnikova *et al.*, 2011.).

Пути метаболизма деструкции нафталина у большинства бактерий включают три основных соединения: нафталин, как первое соединение различных метаболических путей, салициловая кислота и пирокатехин как «точки» дивергенции катаболических реакций. В связи с этим начальные ферменты катаболизма данных соединений – нафталин диоксигеназа, салицилат гидроксилаза, пирокатехин 1,2-диоксигеназа и пирокатехин 2,3-диоксигеназа названы ключевыми ферментами катаболизма нафталина (Старовойтов, 1985; Yumoto *et al.*, 2003).

Подготовительный метаболизм биodeградации нафталина проходит у разных микроорганизмов по общему, «верхнему пути», в процессе которого нафталин через три этапа расщепляется до салициловой кислоты (рисунок 3). Один из наиболее распространенных путей подготовительного метаболизма салициловой кислоты, так называемый «нижний» путь утилизации нафталина, при котором салицилат 1-гидроксилаза катализирует декарбоксилирование и гидроксилирование салицилата в присутствии НАДФ, что приводит к образованию пирокатехина.

Дальнейшее окисление пирокатехина может проходить различными путями (рисунок 3). Наличие в штамме пирокатехин 2,3-диоксигеназной активности приводит к расщеплению пирокатехина по *мета*-пути через образование 2-гидроксимуконowego полуальдегида до пирувата и ацетальдегида (Dagley, Gibson, 1965).

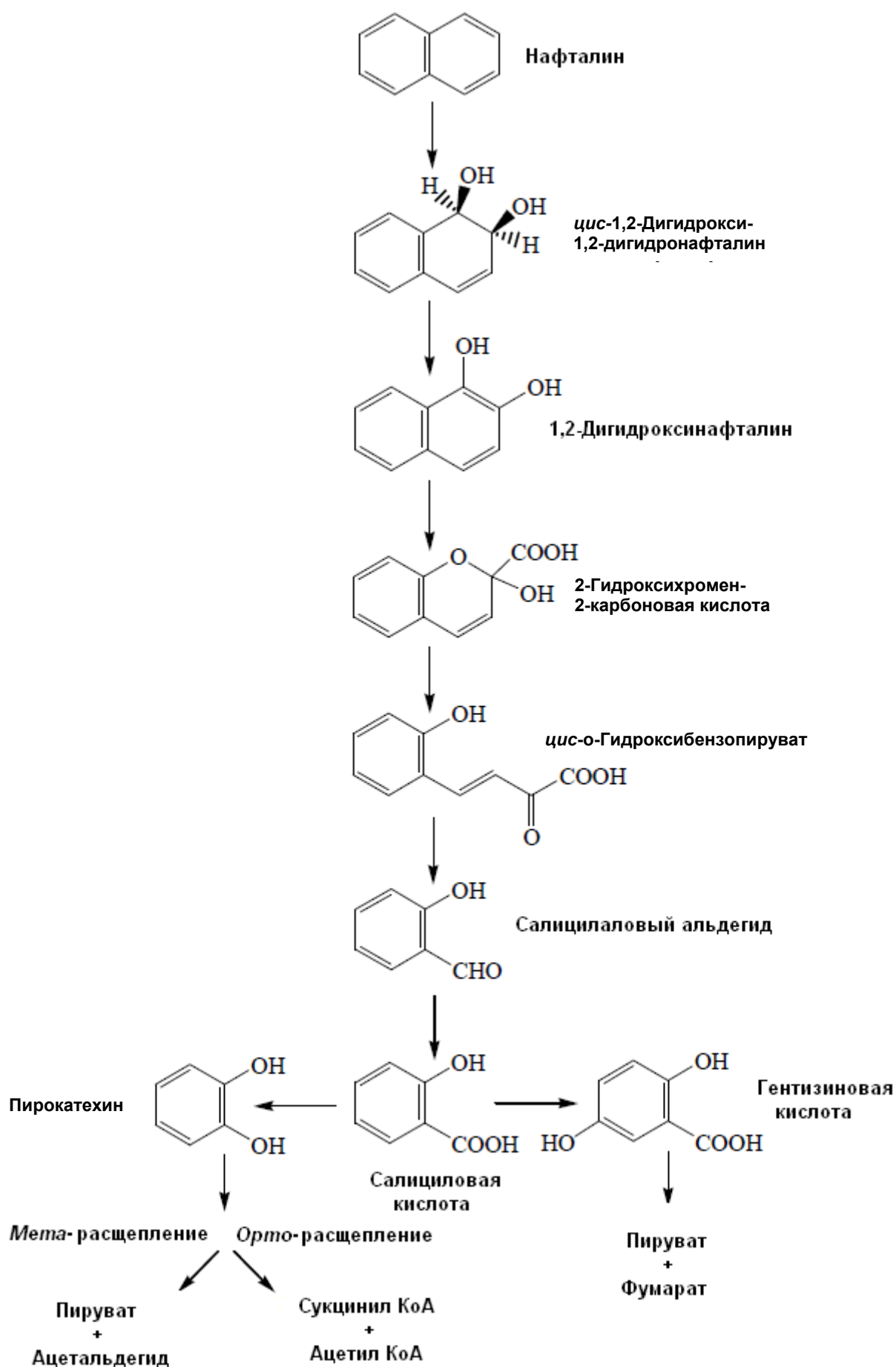


Рисунок 3. Метаболический путь деградации нафталина (Seo *et al.*, 2009).

В *орто*-пути пирокатехин 1,2-диоксигеназа катализирует образование *цис,цис*-муконата из пирокатехина, который затем превращается лактонизирующим ферментом в муконолактон, метаболизирующийся в сукцинил КоА и ацетил КоА другими ферментами *орто*-пути (рисунок 3). Ферменты *орто*-пути могут индуцироваться *цис,цис*-муконатом или одним из его метаболитов (Dagley, Gibson, 1965; Ornston, 1966).

Наиболее детально изучены метаболические пути и генетические системы деградации нафталина у грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* и близкородственных микроорганизмов (Балашова и др., 1997; Seo *et al.*, 2009). Известно, что гены, кодирующие ферменты деструкции нафталина, могут иметь хромосомальную или плазмидную локализацию (Боронин и др., 1989; Измалкова и др., 2005; Кошелева и др., 2003; Кулакова и др., 1989; Bosch *et al.*, 1999). Гены, ответственные за разложение нафталина (*nah*-гены), штамма *Pseudomonas putida* G7, кодирующие ферменты окисления нафталина и салицилата, объединены в два оперона и расположены на 37,5 т.п.н. регионе NAH7 плазмиды (Цой и др., 1997).

Для некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий описан другой «нижний» путь разложения салицилата – через образование гентизиновой кислоты (рисунок 3). Так, у штамма *Ralstonia* sp. U2 подробно исследован генетический контроль разложения нафталина через гентизат. U2. *nag*-Оперон содержит гены деградации нафталина, соответствующие генам «верхнего» пути окисления данного соединения штамма *P. putida* G7, в том же порядке (*nagAaGHAbAcAdBFCQEDJIKLMN*), за исключением двух дополнительных открытых рамок считывания между генами *nagAa* и *nagAb*, обозначенных *nagG*, *nagH* и ответственных за синтез структурных субъединиц салицилат 5-гидроксилазы. Гены *nagl*, *nagK*, и *nagL* кодируют ферменты катаболизма гентизата в фумарат и пируват: гентизат 1,2-диоксигеназу, фумарилпируват гидроксилазу, малеилпируват изомеразу, соответственно (Fuenmayor *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2003).

Данных о метаболических путях и об организации генов, кодирующих ферменты разложения нафталина, грамположительных микроорганизмов довольно мало. Для ряда штаммов рода *Rhodococcus* описаны пути деградации нафталина через гентизат (Kulakov *et al.*, 2005). Исследования штаммов *Rhodococcus* sp. NCIMB12038, P200 и P400 показали, что генетические системы деструкции нафталина существенно отличаются от таковых описанных ранее для грамотрицательных бактерий. Гены, кодирующие ферменты деструкции нафталина, не организованы в единый оперон. Обнаружено несколько транскрипционных единиц, которые отличаются у исследуемых штаммов. Оперон штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 содержит только гены *narAaAbB*, кодирующие α - и β -субъединицы нафталин диоксигеназы и нафталин *цис*-дигидродиол дегидрогеназу, соответственно. Во всех проанализированных штаммах были обнаружены гены *narR1* и *narR2*, расположенные перед геном *narAa* на расстоянии 1868 нуклеотидов. Показано, что *nar*-регион имеет плазмидную локализацию в штаммах *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 и P400, в случае штамма *Rhodococcus* sp. P200 гены *narAaAbB* расположены в хромосоме. У штаммов *Rhodococcus* sp. NCIMB12038, P200 и P400 гены *narAaAbB*, кодирующие каталитические компоненты нафталин диоксигеназы и нафталин *цис*-дигидродиол дегидрогеназы, индуцировались нафталином (Kulakov *et al.*, 2000, 2005; Andreoni *et al.*, 2000).

Как было показано Zhou с коллегами (Zhou *et al.*, 2001), *nar*-подобные гены широко распространены в деградирующих ПАУ бактериях и обнаружены в образцах почв, загрязненных (поли)ароматическими соединениями. *nar*-Гены, кодирующие α - и β -субъединицы терминальной оксигеназы из нафталин 1,2-диоксигеназы, были успешно амплифицированы у нафталин-деградирующих штаммов *Rhodococcus* spp. B13, B2-1, DB11 и SMB38, которые были выделены из района солеразработок ВКМКС. Показана высокая гомология (98,5-100%) исследованных *nar*-генов с таковыми известных штаммов-деструкторов нафталина рода *Rhodococcus* (Anan'ina *et al.*, 2011).

1.3.2 Разложение *орто*-фталевой кислоты бактериями

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.

Данные соединения отнесены к группе суперэкоотоксикантов (стойким органическим загрязнителям, СОЗ), к которым в настоящее время предъявляются наиболее жесткие экологические требования (Стокгольмская конвенция, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.html>). Фталаты широко используются в качестве пластификаторов, при синтезе полиэфирных волокон и полиэтилена. Кроме того, фталаты обнаружены и в отходах горнодобывающей промышленности, а именно в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах отходов калийного производства (разработки Верхнекамского месторождения солей, Пермский край) (Бачурин, Одинцова, 2009). Выявлены гепатотоксичные, тератогенные и канцерогенные свойства этих соединений (Liang *et al.*, 2008).

Бактерии-деструкторы фталатов и *орто*-фталевой кислоты. Многочисленные исследования показали, что микроорганизмы играют важную роль в биodeградации фталевых соединений. Большинство бактерий, способных осуществлять разложение фталатов, относятся к аэробам или факультативным анаэробам. Данные микроорганизмы являются в основном представителями царства *Bacteria*, а именно филумов «*Proteobacteria*», «*Actinobacteria*», «*Firmicutes*» и «*Bacteroidetes*». Среди них наиболее часто встречаются представители родов *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Bacillus*, *Delftia*, *Acinetobacter* (Liang *et al.*, 2008).

Пути метаболизма деструкции фталатов и *орто*-фталевой кислоты у бактерий. На рисунке 4 представлен метаболический путь разложения эфиров фталевой кислоты, сочетающий два процесса: первичная биodeградация диэфиров фталата до моноэфиров и последующая их деструкция до *орто*-фталевой кислоты (*орто*-ФК), которая является центральным интермедиатом пути деструкции большинства фталевых эфиров.

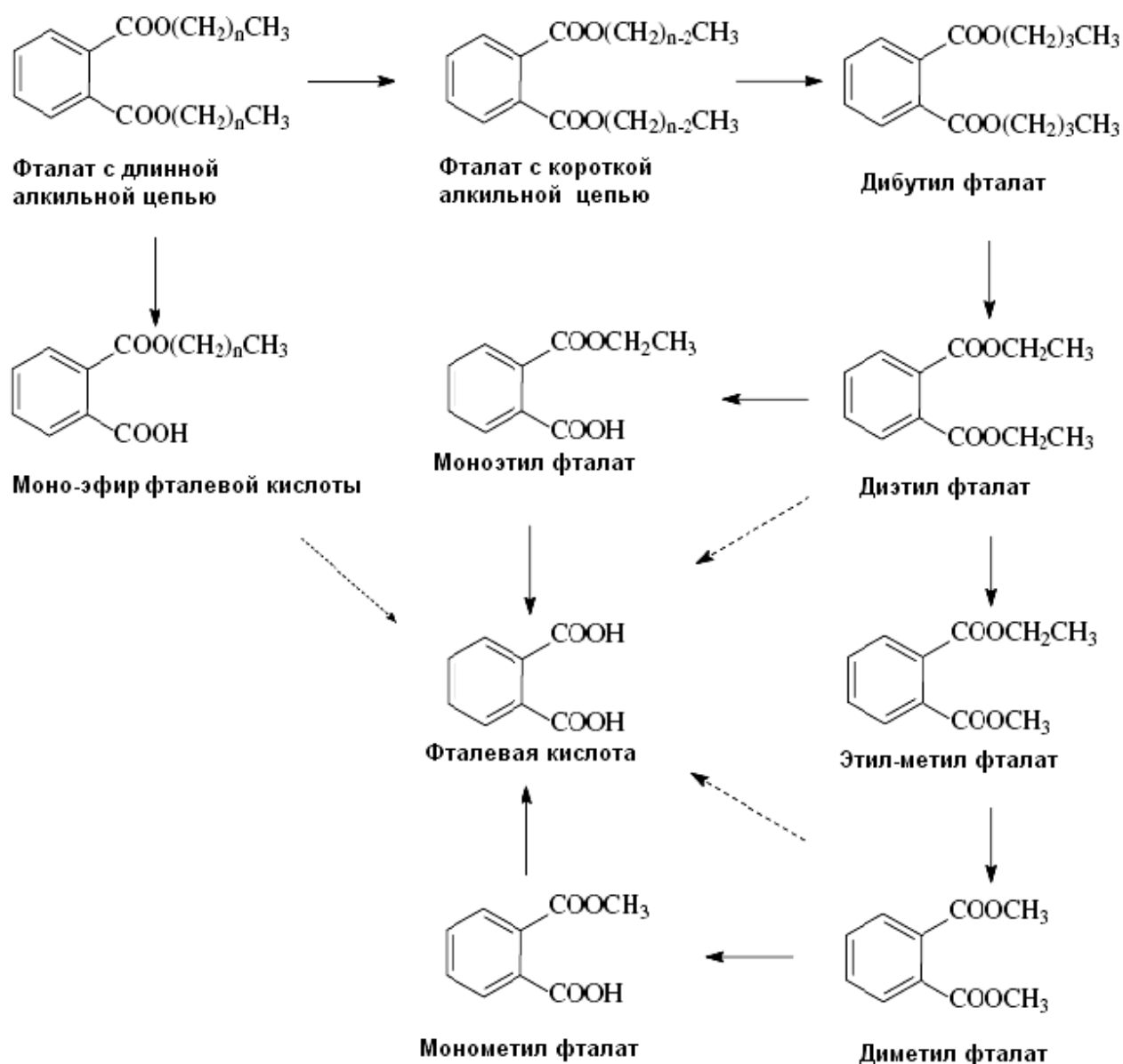


Рисунок 4. Метаболические пути бактериальной деструкции фталатов (Liang *et al.*, 2008).

Разложение *орто*-ФК аэробными бактериями происходит двумя путями, катализируемыми диоксигеназами, с образованием общего интермедиата – протокатеховой кислоты (ПКК) (рисунок 5). Для большинства грамотрицательных бактерий описано разложение *орто*-ФК через образование *цис*-4,5-дигидро-4,5-дигидроксифталата (катализируется диоксигеназой), который окисляется НАД-зависимой дегидрогеназой до 4,5-дигидроксифталата, и далее, в процессе декарбоксилирования 4,5-дигидроксифталата, образуется протокатехат (Liang *et al.*, 2008).

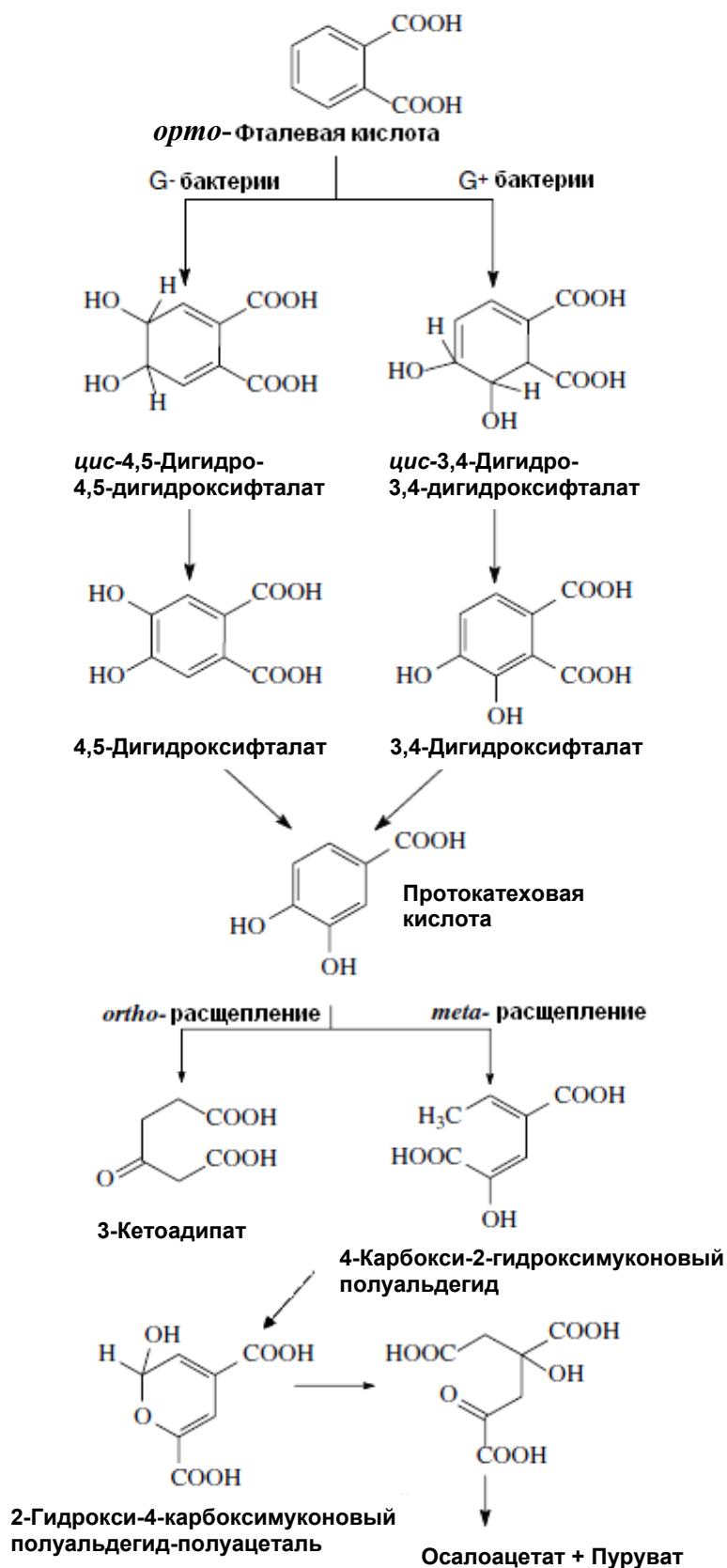


Рисунок 5. Пути бактериальной деструкции *орто*-фталевой кислоты в аэробных условиях (Liang *et al.*, 2008).

S. Murad с коллегами подробно изучили деструкцию *орто*-ФК почвенными микроорганизмами, принадлежащими роду *Pseudomonas*, под влиянием различных факторов (концентрация *орто*-фталата в среде культивирования, pH, температура, присутствие глюкозы). Было показано, что максимальный процент деградации *орто*-ФК наблюдался при 37°C, pH 8,0 и присутствии глюкозы в среде. Штамм *Pseudomonas* sp. P1 способен к росту на *орто*-ФК в диапазоне концентраций от 0,05 г/л до 2,8 г/л без глюкозы в среде культивирования и от 0,05 г/л до 2,9 г/л с добавлением глюкозы (Murad *et al.*, 2007).

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD и *Acinetobacter lwoffii* ISP4, выделенные из почвы методом накопительного культивирования, способны использовать изомеры фталевой кислоты (*орто*-, *мета*- и *пара*-фталевая кислоты) в качестве единственного источника углерода. На основе исследований метаболических путей деструкции фталевых кислот авторами было показано, что начальный этап разложения этих соединений инициируется специфичной гидроксимирующей диоксигеназой (кодируется геном *pchA*). Штамм *Pseudomonas* sp. PPD гидроксимирует *орто*-ФК до 4,5-дигидроксифталата. У исследуемых грамотрицательных бактерий гены, детерминирующие разложение *орто*-ФК, имеют плазмидную и хромосомную локализацию (Vamsee-Krishna *et al.*, 2006).

На рисунке 5 представлен метаболический путь разложения *орто*-фталевой кислоты, описанный для грамположительных бактерий, где *орто*-ФК преобразуется до протокатеховой кислоты через *цис*-3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталат и 3,4-дигидроксифталат. Далее ПКК метаболизируется через расщепление ферментами бензольного кольца по *орто*- или *мета*-пути. По *мета*-пути ПКК катализируется протокатехоат диоксигеназой до 4-карбокси-2-гидроксимуконического полуальдегида, затем преобразуется до 2-гидрокси-4-карбоксимуконического полуальдегид-полуацетата, далее до 4-оксалоцитрамалата и в конечном результате - до пирувата и оксалоацетата. По *орто*-пути, также известному как кетoadипатный путь, ПКК разлагается до 3-кетoadипата (Liang *et al.*, 2008).

Метаболический путь деструкции *орто*-ФК у грамположительных бактерий был подробно описан на примере штамма *Rhodococcus* sp. DK17, способного к разложению *орто*- и *пара*-изомера фталевой кислоты. Разложение *орто*-ФК штаммом DK17 на начальном этапе окисления катализируется фталат 3,4-диоксигеназой, кодируемой генами *ophA1A2A3A4*, до формирования 3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталата. Данный метаболит под действием *цис*-3,4-дигидрокси-3,4-дигидрофталат дегидрогеназы и 3,4-дигидроксифталат 2-декарбоксилазы трансформируется до протокатеховой кислоты, которая в дальнейшем разлагается протокатехоат 3,4-диоксигеназой (Choi *et al.*, 2005) (рисунок 6).

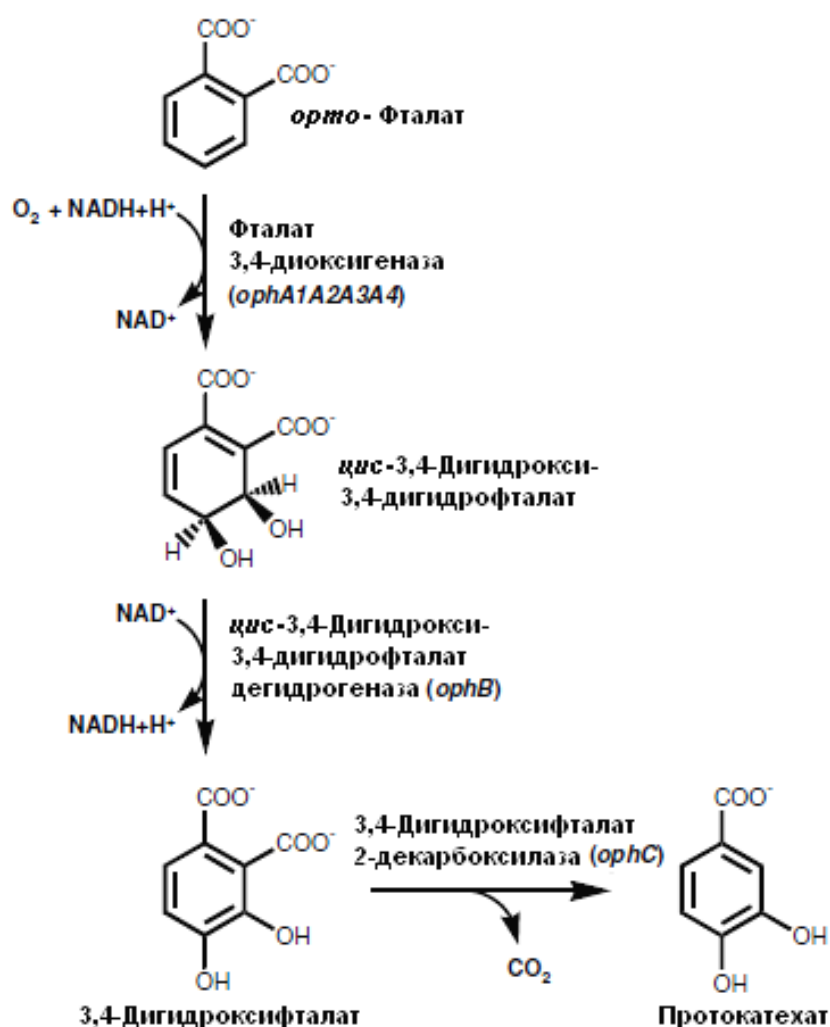


Рисунок 6. Метаболический путь бактериальной деструкции *орто*-фталевой кислоты штаммом *Rhodococcus* sp. DK17 (Choi *et al.*, 2005).

В результате изучения возможных путей деструкции *орто*-ФК штаммом *Rhodococcus* sp. DK17 было показано, что гены, кодирующие трансформацию *орто*-ФК в ПМК, организованы в виде двух отдельных оперонов, расположенных на расстоянии 6,7 т.п.н. друг от друга, и имеют плазмидную локализацию. Предполагаемый фталатный оперон содержит гены *ophA1–ophA2–orf0–ophB–ophA3–ophA4–ophC*, кодирующие компоненты большой и малой субъединиц терминальной оксигеназы, ферредоксина и ферредоксин редуктазы следующих ферментов: фталат 3,4-диоксигеназы, фталат дегидродиол дегидрогеназы и декарбоксилазы. У штамма *Rhodococcus* sp. DK17 выявлены три плазмиды pDK1, pDK2 и pDK3 размером 380 т.п.н., 330 т.п.н. и 750 т.п.н., соответственно, при этом фталатные опероны дублируются и располагаются на плазмидах pDK2 и pDK3 (Choi *et al.*, 2005).

1.3.3 Разложение бензойной кислоты бактериями

Бензойная кислота (БК) является широко распространенным ароматическим соединением и продуктом окислительного катаболизма многих ароматических углеводов. Данное соединение служит источником углерода для самых разнообразных микроорганизмов.

Бактерии-деструкторы бензойной кислоты. Способность к деструкции бензойной кислоты обнаружена у бактерий родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Nocardia* (Patrauchan *et al.*, 2005; Loh, Chua, 2002). Кроме того, изучена способность ряда грамотрицательных галофильных штаммов, в частности *Halomonas campisalis* и *Chromohalobacter* sp. HS-2, к утилизации бензоата в концентрации 1,6 г/л и 0,6 г/л, соответственно (Kim *et al.*, 2008; Oie *et al.*, 2007), а также грамположительных галотолерантных алкалофильных штаммов рода *Bacillus* утилизировать бензоат и *мета*-гидроксибензоат при содержании в среде культивирования более 3 г/л (Yumoto *et al.*, 2003).

Пути метаболизма деструкции бензойной кислоты у бактерий. У прокариот наиболее часто встречается метаболический путь разложения БК

(«классический» путь), при котором на первом этапе образуется *цис*-дигидродиол. Эту реакцию катализирует диоксигеназа бензойной кислоты. На втором этапе в результате окислительного декарбоксилирования, катализируемого дегидрогеназой, образуется пирокатехин (Patrauchan *et al.*, 2005). В дальнейшем пирокатехин метаболизируется путем *орто*- или *мета*-расщепления бензольного кольца пирокатехин 1,2-диоксигеназой и пирокатехин 2,3-диоксигеназой с получением *цис*, *цис*-муконата и 2-гидроксимуконического полуальдегида, соответственно (рисунок 7).

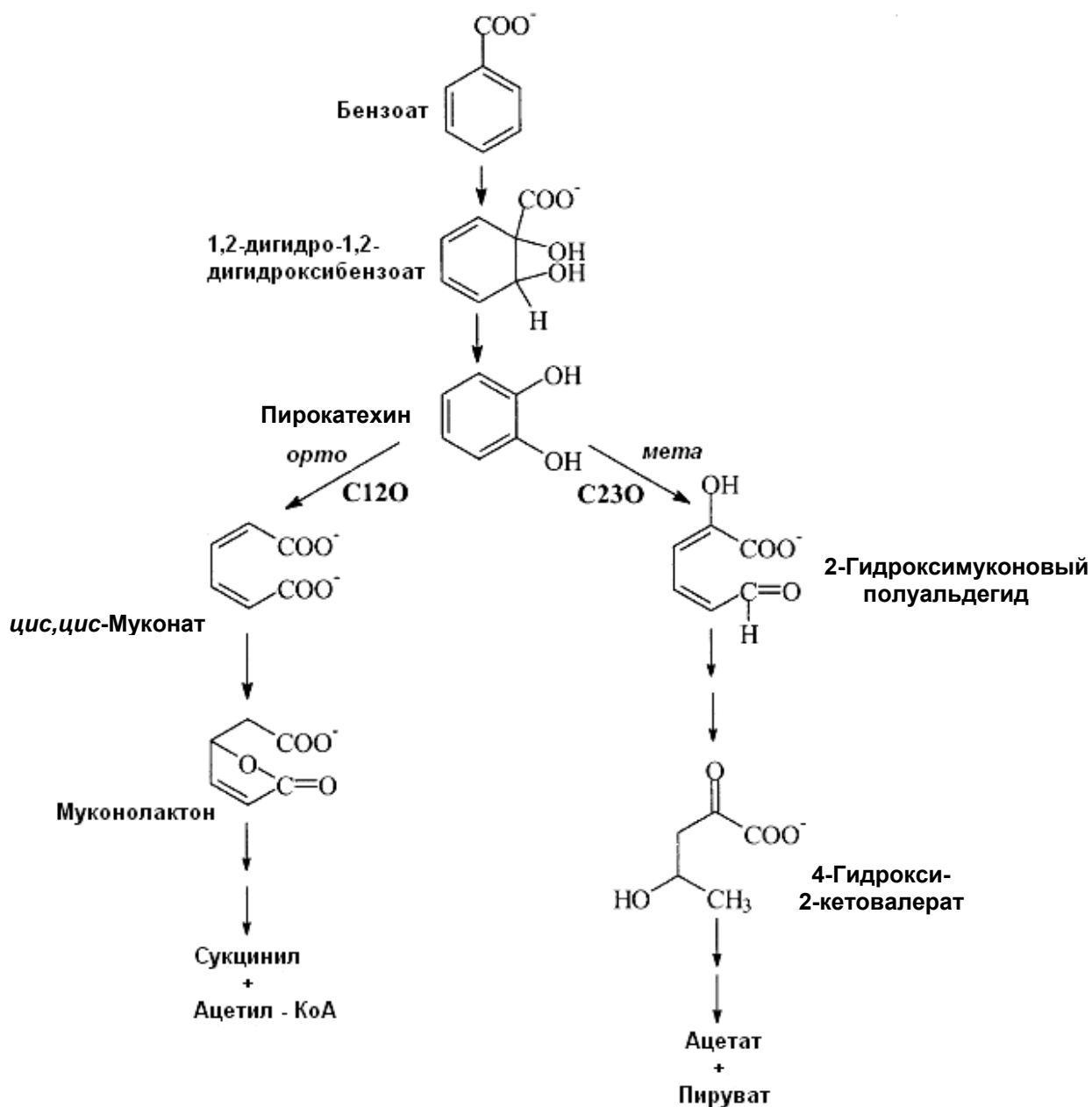


Рисунок 7. Метаболический путь деградации бензойной кислоты бактериями (Loh, Chua, 2002).

Разложение по *орто*-пути, также широко известному как β -кетoadипатный путь, широко распространено среди почвенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter* (Patrauchan *et al.*, 2005).

К.С. Loh и S.S. Chua подробно изучили метаболические пути деструкции при использовании в качестве субстрата бензоата натрия в различных концентрациях на примере штамма *Pseudomonas putida* ATCC 49451^T (рисунок 7). У исследованного штамма *Pseudomonas putida* ATCC 49451^T разложение бензоата осуществлялось как по *орто*-, так и по *мета*-пути, однако при концентрации субстрата меньше 200 мг/л деструкция соединения проходила через *орто*-расщепление, а при концентрации более 300 мг/л – через *мета*-расщепление (Loh, Chua, 2002).

Анализ литературных данных показал, что среди бактерий метаболический путь, при котором БК под действием бензоат 4-монооксигеназы окисляется до *пара*-гидроксибензойной кислоты (ПГБК), встречается крайне редко и описан для ряда грамотрицательных штаммов рода *Pseudomonas* и для штамма *Burkholderia* sp. 383 (GenBank CP000152). Стоит отметить, что у штамма *Burkholderia* sp. 383 трансформация БК осуществляется последовательно путем образования ПГБК, ПКК и пирокатехина (Reddy, Vaidyanathan, 1976).

Аэробный катаболизм бензоата также изучен у грамотрицательных протеобактерий *Azoarcus evansii* и грамположительных бактерий *Bacillus stearothermophilus*, при этом бензоат не был преобразован в оксibenzoат или гентизат. Бензоил-КоА является продуктом катаболизма бензоата у обоих видов микроорганизмов в аэробных условиях и в дальнейшем преобразуется в различные тиоэфиры-КоА в кислород- и НАДФН-зависимых реакциях. Эти данные свидетельствуют о новом аэробном пути катаболизма бензоата через КоА (Zaar *et al.*, 2001).

При изучении генома грамположительных бактерий на примере штамма *Rhodococcus* sp. RHA1 было выявлено четыре кластера генов, комплементарных консервативным участкам, ответственным за катаболизм бензоата. Хромосомные *ben*-гены кодируют различные диоксигеназы (*benABC*)

и дигидродиол дегидрогеназы (*benD*). Последовательность генома *Rhodococcus* sp. RHA1 содержит *ben*-оперон, включающий гены кодирования цитохрома P450 – монооксигеназу и редуктазу непосредственно перед *benA*. Редуктаза, кодируемая *fpr254A1*, содержит кластер 2Fe-2S и флавинаденин динуклеотид / NAD область. N-терминальные 22 аминокислоты *sur254A1*-кодированной оксигеназы имеют 85% сходства последовательности с N-концевым пептидом цитохрома P450_{2EP}, который катализирует деалкилирование 2-этоксифенола (Patrauchan *et al.*, 2005).

1.3.4 Галотолерантные и галофильные бактерии-деструкторы стойких органических загрязнителей

В настоящее время весьма актуальными становятся исследования аборигенных микроорганизмов, обитающих в условиях высоких концентраций солей и способных осуществлять разложение поллютантов, так как применение неадаптированных штаммов и сообществ микроорганизмов для очистки высокоминерализованных объектов не эффективно. Наряду с этим имеются лишь ограниченные и несистематизированные данные о способности галотолерантных и галофильных бактерий к деструкции и трансформации токсичных ксенобиотиков при высокой концентрации соли в среде обитания. Встречаются опубликованные результаты о микроорганизмах (архебактериях и эубактериях), выделенных из разных высокоминерализованных сред (засоленных почв, солончаковых болот, высокоминерализованных озер и источников, морей и районов нефтедобычи) и способных осуществлять разложение алифатических, моно- и полиароматических углеводородов (Oren, 1992; Ventosa, Nieto, 1995; Margesin, Schinner, 2001).

Неоднократно сообщалось, что биodeградационный потенциал экстремальных галофилов довольно ограничен, так как в большинстве случаев метаболическая активность и бактериальное разнообразие уменьшаются по мере увеличения концентрации соли. Однако после длительного культивирования можно наблюдать увеличение степени деградации и количества

метаболизированных углеводов, что обусловлено адаптацией микробных консорциумов к высокой концентрации соли в среде. Тем не менее, имеются и противоположные результаты исследований, что говорит о сложности микробных сообществ и специфику загрязненных мест (Borgne *et al.*, 2008).

Таблица 2

Галофильные и галотолерантные бактерии-деструкторы стойких органических соединений

Исследованные бактерии	Спектр разлагаемых субстратов	Ссылка
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Фенол	Bastos <i>et al.</i> , 2000
<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. и <i>Pseudomonas</i> sp.	Нафталин и антрацен	Ashok <i>et al.</i> , 1995
<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. и <i>Rhodococcus</i> sp.	<i>n</i> -Алканы нефти	Бердичевская, 1989; Милехина и др., 1991; Плакунов и др., 1999
<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. и <i>Rhodococcus</i> sp.	Нафталин и фенантрен	Плотникова и др., 2001
<i>Arthrobacter</i> sp. SF27	Нафталин, гентизат, фенантрен, 1-гидрокси-2-нафтоат, <i>орто</i> -ФК	Плотникова и др., 2011
<i>Arthrobacter</i> sp. SN17	Нафталин, бифенил, моноароматические и алифатические углеводороды	Плотникова и др., 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	Нефть, алканы и ПАУ	Manoj <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus</i> sp. И23, И27	Дизельное топливо, пентадекан	Ястребова и др., 2008
<i>Chromohalobacter marimortui</i>	Фосфоноацетат, 2-аминоэтил, 3-аминопропил, 4-аминобутил-, метил-и этил-фосфонаты	Sylvie Le Borgne, 2008
<i>Cycloclasticus</i> sp.	Нафталин и фенантрен	Dyksterhouse <i>et al.</i> , 1995; Geiselbrecht <i>et al.</i> , 1996; 1998; Kasai <i>et al.</i> , 2002
<i>Dietzia maris</i> и <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Смеси парафинов (C ₁₄ -C ₁₈)	Звягинцева и др., 2001
<i>Haloferax</i> sp.	Бензоат, циннамат и фенилпропионат	Emerson <i>et al.</i> , 1994
<i>Halomonas campisalis</i>	Фенол	Alva, Peyton, 2003
<i>Halomonas organivorans</i>	Бензойная, ПГБК, циннамическая, салициловая, фенилпропионовая и <i>пара</i> -аминосалициловая кислоты	García <i>et al.</i> , 2004
<i>Halomonas</i> sp.	Фенол	Hinteregger, Streichsbier, 1997
<i>Lutibacterium anuloederans</i>	Дву- и трехкольцевые ароматические углеводороды	Chung <i>et al.</i> , 2001
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Алифатические и ароматические углеводороды	Gauthier <i>et al.</i> , 1992

**Галофильные и галотолерантные бактерии-деструкторы
стойких органических загрязнителей**

Исследованные бактерии	Спектр разлагаемых субстратов	Ссылка
<i>Micromonospora</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp. и <i>Rhodococcus</i> sp.	Алифатические и ароматические нитрилы	Colquhoun <i>et al.</i> , 1998
<i>Neptunomonas naphthovorans</i>	Нафталин, фенантрен, аценафтен	Hedlund <i>et al.</i> , 1999
<i>Paenibacillus</i> sp.	Нафталин и фенантрен	Daane <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus</i> sp. И10b	Дизельное топливо, нафталин и декан	Ястребова и др., 2008
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	C ₅ -C ₁₆ углеводороды	de Carvalho <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhodococcus</i> sp.	Бензол	Luz <i>et al.</i> , 1997
<i>Roseobacter</i> sp.	Бензоат, <i>para</i> -оксибензоат, салицилат, протокатехат	Buchan <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces albiacalis</i>	Сырая нефть и продукты ее переработки	Кузнецов и др., 1992
<i>Vibrio cyclotrophicus</i> 2P44	Нафталин, фенантрен, бифенил, аценафтен, флюорен, антрацен и флюорантен	Hedlund <i>et al.</i> , 2001

Утилизация ароматических и алифатических углеводородов обнаружена у ряда морских организмов. Представитель нового вида и рода – экстремально галотолерантный микроорганизм *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, растущий в пределах 0,08-3,5 М NaCl, осуществляет деструкцию алифатических и ароматических углеводородов (Gauthier *et al.*, 1992). Кроме того, данный микроорганизм имеет и другие характеристики, такие как психрофильность, алкалифильность, термотолерантность и устойчивость к тяжелым металлам, которые делают его универсальным и весьма интересным для возможного практического применения в биотехнологии (Borgne *et al.*, 2008).

Из глубоководных морских осадков были выделены актиномицеты родов *Micromonospora*, *Streptomyces* и *Rhodococcus*, использующие алифатические и ароматические нитрилы в качестве субстрата и растущие на 20 мМ ацетонитрила в жидкой минеральной среде при солености 0-40 г/л (Colquhoun *et al.*, 1998). Исследованы штаммы группы *Roseobacter*, способные к росту на бензоате, *para*-оксибензоате, салицилате, протокатехате и ряде

других моноароматических соединений с максимальной скоростью роста при 0,25-0,50 М NaCl (Buchan *et al.*, 2000; Borgne *et al.*, 2008).

Способность к деградации нафталина, фенантрена, бифенила, аценафтена, флюорена, антрацена и флюорантена обнаружена у штамма *Vibrio cyclotrophicus* P-2P44 (Hedlund *et al.*, 2001). Описана утилизация нафталина и его метилированных производных, фенантрена, а также кометаболизм аценафтена культурой *Neptunomonas naphthovorans* NAG-2N-113 (Hedlund *et al.*, 1999). Бактерии *Lutibacterium anuloederans* способны использовать дву- и трехкольцевые ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии (Chung *et al.*, 2001). Для роста данных микроорганизмов, обладающих широким субстратным рядом утилизируемых ПАУ, необходимо свыше 10 г/л NaCl. Особую роль в биоремедиации морских экосистем играют бактерии рода *Cycloclasticus*, осуществляющие деструкцию нафталина и фенантрена (Dyksterhouse *et al.*, 1995; Geiselbrecht *et al.*, 1996, 1998; Kasai *et al.*, 2002).

Изучена способность некоторых почвенных эубактерий к утилизации различных алифатических и ароматических углеводородов в условиях высокой минерализации среды. *Halomonas organivorans* способен использовать широкий спектр органических соединений в присутствии 100 г/л NaCl (бензойную, *пара*-гидроксибензойную, циннамическую, салициловую, фенилпропионовую и *пара*-аминосалициловую кислоты) (García *et al.*, 2004). Другой представитель семейства *Halomonadaceae* разлагал 0,1 г/л фенола при концентрации 10-140 г/л NaCl (Hinteregger, Streichsbier, 1997). *Alcaligenes faecalis*, изолированный из почвы джунглей Амазонии (Бразилия), осуществлял разложение 7,5 мМ фенола при 56 г/л NaCl за 4 дня (Bastos *et al.*, 2000). Почвенные бактерии *Rhodococcus* sp., толерантные к 60 г/л NaCl, утилизировали бензол (Luz *et al.*, 1997). Штамм *Rhodococcus erythropolis* DCL14, выделенный из почвы, сохранял метаболическую активность в отношении C₅-C₁₆ углеводов при 25 г/л хлорида натрия (Carvalho *et al.*, 2005). Способность к деструкции нафталина и фенантрена обнаружена у ризосферных бактерий солончаковых болот рода *Paenibacillus* (Daane *et al.*, 2002). Четыре бактериальных

штамма, принадлежащих родам *Micrococcus*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes*, выдерживали 75 г/л NaCl и могли расти на 1 г/л нафталина и антрацена (Ashok *et al.*, 1995). Недавно описан штамм DHT, близкородственный *Bacillus licheniformis*, утилизирующий сырую нефть, алканы и ПАУ в пределах 0-100 г/л солености среды (Manoj *et al.*, 2007).

Грамотрицательные галофильные микроорганизмы, близкородственные по гену 16S рНК с бактериями *Chromohalobacter marimortui*, могут использовать для роста фосфоноацетат, 2-аминоэтил, 3-аминопропил, 4-аминобутил-, метил- и этил-фосфонаты в качестве источников фосфора. Данные изоляты оптимально растут при 100 г/л NaCl, при этом скорость роста на различных фосфоновых кислотах снижалась при повышении концентрации соли (Borgne *et al.*, 2008). Описаны умеренно галофильные изоляты из теплых высокоминерализованных источников, проявляющие высокую активность по отношению к органофосфорным соединениям в присутствии 50 г/л NaCl (Defrank, Cheng, 1991). *Halomonas campisalis*, изолированный из озера Soap Lake (США), способен разлагать фенол при содержании 0-150 г/л NaCl (Alva, Peyton, 2003).

Археи, выделенные из пластовых вод Бондюжского нефтяного месторождения (Россия), активно трансформировали *n*-алканы состава C₁₀-C₃₀ сырой нефти в присутствии 300 г/л NaCl (Куличевская и др., 1991). Галофильный штамм архей *Haloferax* sp. D1227 способен использовать бензоат, циннамат и фенилпропионат в качестве источников углерода и энергии (Emerson *et al.*, 1994). Неидентифицированный галофильный архей деградирует ПАУ (аценафтен, фенантрен, антрацен 0,5 г/л), а также предельные углеводороды (C₁₄, C₁₆, C₁₈, C₂₁, пристан) в среде, приготовленной из высокоминерализованной воды солончакового болота (21 г/л NaCl), при этом рост на углеводородах отсутствовал при концентрациях ниже 110 г/л NaCl (Bertrand *et.al.*, 1990).

В ряде исследований показана способность аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов к росту в условиях пластовых вод, представленных хлоридно-кальциевыми рассолами с минерализацией от 6 до 272 г/л. Основными

представителями углеводородокисляющих сообществ в нефти являются бактерии родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и *Micrococcus*. Данные микроорганизмы полностью утилизируют *n*-алканы нефти при содержании в среде 150 г/л NaCl (Бердичевская, 1989; Милехина и др., 1991; Плакунов и др., 1999). Исследование деструкции смеси парафинов (C₁₄-C₁₈) культурами *Rhodococcus erythropolis* и *Dietzia maris* показало, что диапазон деструктивной активности *Rhodococcus erythropolis* составляет 5-50 г/л NaCl, а *Dietzia maris* 5-100 г/л NaCl (Звягинцева и др., 2001). В.Д. Кузнецов с соавт. (1992) описали уникальный штамм *Streptomyces albiaxis*, который способен деградировать сырую нефть и продукты ее переработки даже в присутствии 300 г/л NaCl.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что информация о галофильных/галотолерантных бактериях, изолированных из природных солевых отложений и высокоминерализованных образцов из промышленных разработок месторождений солей, встречается лишь в единичных исследованиях. Территории соледобычи Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей (Пермский край, Россия) подвержены комплексной экологической нагрузке за счет не только повышенного уровня минерализации, но и воздействия стойких органических загрязнителей, в частности ароматических углеводородов и их производных, галогенуглеводородов и фталатов (Алтынцева, 2001; Бачурин, Одинцова, 2009). Сложившиеся условия являются основой для формирования группы микроорганизмов, устойчивых к высокому содержанию соли в среде и способных при этом проявлять биodeградационные свойства. Такие микроорганизмы, безусловно, являются объектом повышенного интереса микробиологов и биотехнологов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Образцы исследования

Из района ВКМКС на территории соледобывающих предприятий ОАО «Уралкалий» (г. Соликамск, г. Березники, Пермский край) в июне 2008 г., 2011 г. были отобраны образцы галитовых отходов, грунта около солеотвалов, образцы воды и донных отложений рассолосборника. Образцы руды (каменной соли и сильвинита) и техногенно-минеральных образований (ТМО) из шламоотстойников соледобывающих производств были предоставлены сотрудниками ФГБУН Горного института УрО РАН (отбор проб осуществляли в 2009 г.) (таблица 3).

Таблица 3

Образцы, отобранные в районе солеразработок

Образец	Проба	Место отбора	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Концентрация ионов Na^+ , мг/кг	Порядковый номер
Руда	Каменная соль	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск)	н.о.	н.о.	1
	Сильвинит	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск). № скважины 22227а. Пласт: Б. Интервал отбора: 8,75-8,98. Мощность: 0,23.	н.о.	н.о.	2
	Сильвинит	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск). № скважины 22227а. Пласт: Кр I. Интервал отбора: 2,62-2,73. Мощность: 0,11.	н.о.	н.о.	3
	Сильвинит	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск). № скважины 22227а. Пласт: А'. Интервал отбора: 6,45-6,56. Мощность: 0,11	1277	293710	4
	Каменная соль	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск). № скважины 22227а. Пласт: А'-А. Интервал отбора: 6,56-6,79. Мощность: 0,23.	1115	256450	5
	Сильвинит	Рудник СКПРУ-1 (г. Соликамск). № скважины 22227а. Пласт: Б. Интервал отбора: 8,29-8,43. Мощность: 0,14.	н.о.	н.о.	6

Образцы, отобранные в районе солеразработок

Образец	Проба	Место отбора	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Концентрация ионов Na^+ , мг/кг	Порядковый номер
Галитовые отходы	Соляная корка	Солеотвал СКПРУ-2 (г. Соликамск)	1437	330510	7
		Солеотвал СКПРУ-2 (г. Соликамск) (граница почвы и солеотвала)	471	108330	8
		Солеотвал СКПРУ-1 (г. Соликамск)	1813	416990	9
		Солеотвал БКРУ-1 (г. Березники)	н.о.	н.о.	10
Рассоло-сборник	Вода	У солеотвала СКПРУ-2 (г. Соликамск)	181	41630	11
	Донные отложения	У солеотвала СКПРУ-2 (г. Соликамск)	995	228850	12
Грунт	Грунт (1-2 м от солеотвала)	У солеотвала СКПРУ-2 (г. Соликамск)	1326	304980	13
Техногенно-минеральные образования (ТМО)	ТМОI	Рудник БКПРУ-1 (г. Березники). Образец «Шлам 1»	н.о.	н.о.	14
		Рудник БКПРУ-1 (г. Березники). Образец «Шлам 2»	н.о.	н.о.	15
	ТМОII	Рудник БКПРУ-2 (г. Березники). Образец 220/2. Шламохранилище. Шурф № 1. Глубина 0,5м.	170	39100	16
		Рудник БКПРУ-2 (г. Березники). Образец 219/1. Шламохранилище. Шурф № 1. Глубина 0,3м.	н.о.	н.о.	17
		Рудник БКПРУ-2 (г. Березники). Образец 221/3. Шламохранилище. Шурф № 2. Глубина 0,2 м.	22	5060	18
		Рудник БКПРУ-2 (г. Березники). Образец 222/4. Шламохранилище. Шурф № 3. Глубина 0,2 м.	137	31510	19
		Рудник БКПРУ-2 (г. Березники). Образец 222/5. Шламохранилище. Шурф № 3. Глубина 0,4 м.	150	34500	20

Примечание. «н.о.» – не определяли.

Почва (контрольный вариант), отобранная на расстоянии 1600 м от солеотвала СКПРУ-1 содержала Na^+ в концентрации 0,02 мг-экв/100 г (4,6 мг/кг).

В районе складирования твердых отходов (солеотвалов) предприятий СКПРУ-1 и СКПРУ-2 ОАО «Уралкалий» г. Соликамска в июне 2008, 2011, 2012 гг. были отобраны 13 образцов ризосферы доминирующих растений, произрастающих в непосредственной близости от солеотвалов (таблица 4).

Таблица 4

**Образцы ризосферы доминирующих растений,
произрастающих в районе солеработок**

Растение	Место отбора	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Концентрация ионов Na^+ , мг/кг	Порядковый номер
Ястребинка зонтичная (<i>Hieracium umbellatum</i> L.)	10-12 м от солеотвала СКПРУ-2	0,34	78,2	1
Вероника дубравная (<i>Veronica chamaedrys</i>)	10-12 м от солеотвала СКПРУ-2	0,37	85,1	2
Торичник солончаковый (<i>Spergularia salina</i> J. & C.)	10-12 м от солеотвала СКПРУ-2	1,68	386,4	3
Мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.)	5 м от солеотвала СКПРУ-1	10,52	2419,6	4
	20 м от солеотвала СКПРУ-2	1,37	315,1	5
	50 м от солеотвала СКПРУ-2	1,39	319,7	6
	10 м от солеотвала СКПРУ-2	3,23	742,9	7
	5 м от солеотвала СКПРУ-2	8,45	1943,5	8
Марь красная (<i>Chenopodium rubrum</i> L.)	10 м от солеотвала СКПРУ-2	0,56	128,8	9
	5 м от солеотвала СКПРУ-2	5,18	1191,4	10
	10 м от солеотвала СКПРУ-1	1,24	285,2	11
Мать-и-мачеха обыкновенная (<i>Tussilago farfara</i>)	10-12 м от солеотвала СКПРУ-1	1,41	324,3	12
Нивяник обыкновенный (<i>Leucanthemum vulgare</i>)	10-12 м от солеотвала СКПРУ-2	2,94	676,2	13

У большей части исследованных образцов было определено содержание катионов Na^+ методом водной вытяжки (приготовленной согласно ГОСТу 26423-85) с последующей детекцией на атомно-абсорбционном спектрофотометре АА-6300 («Shimadzu», Япония) (рисунок 8, 9).

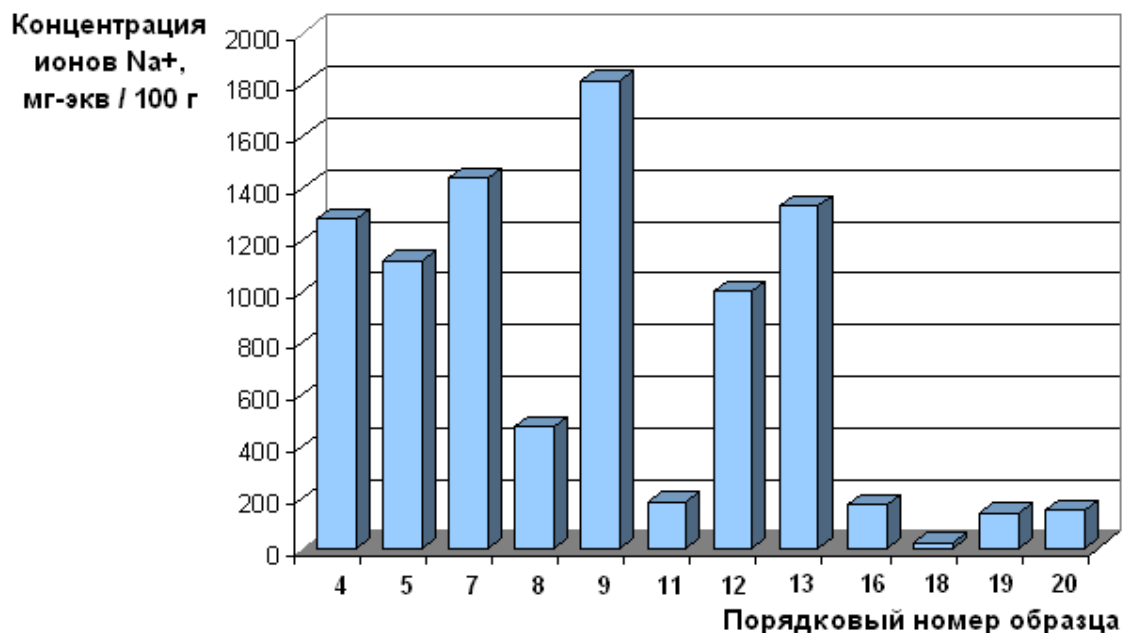


Рисунок 8. Концентрация ионов Na^+ в исследуемых образцах, отобранных на территории промышленных разработок ВКМКС.

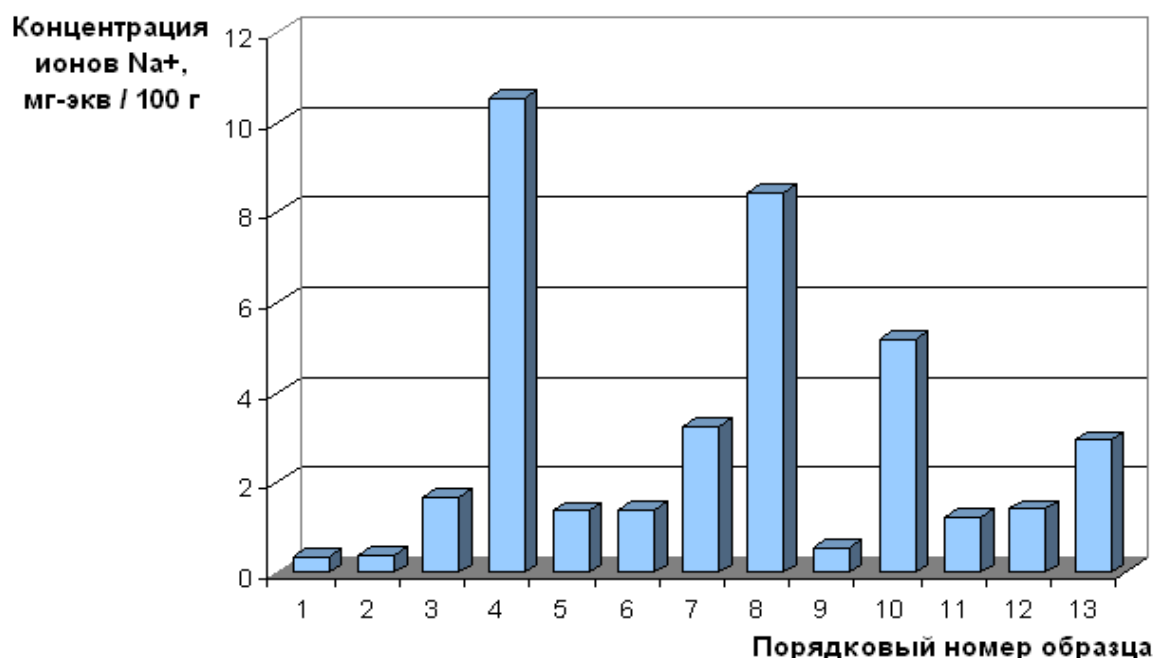


Рисунок 9. Концентрация ионов Na^+ в исследуемых образцах ризосферы растений, произрастающих на территории промышленных разработок ВКМКС (г. Соликамск).

2.2 Среды и условия культивирования

Для выделения и роста галотолерантных микроорганизмов была использована минеральная среда Раймонда (МСР) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 2,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, K_2HPO_4 – 2,0, Na_2HPO_4 – 3,0, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, Na_2CO_3 – 0,1, дополненная 1% раствором $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 мл/л и 1% раствором $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 мл/л среды (Raymond, 1961). Содержание хлорида натрия в среде варьировало от 0 до 200 г/л NaCl.

Для выделения бактерий-деструкторов ароматических углеводов в качестве субстрата использовали нафталин и *орто*-фталевую кислоту в концентрации 1 г/л.

Для приготовления богатой среды Раймонда (БСР) в МСР добавляли 5 г/л триптона («Fluka», США) и 2,5 г/л дрожжевого экстракта («Difco», США) в качестве ростовых субстратов.

При выделении галофильных микроорганизмов использовали модифицированную среду ATCC 213 «*Halobacterium medium*», представленную следующим составом (г/л): NaCl – 200,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 10,0, KCl – 5,0, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, дрожжевой экстракт («Difco», США) – 10,0, триптон («Fluka», США) – 2,5 (www.atcc.org/~media/2DB3DC353ECE44A6BDB7CA5965614347.ashx).

Культивирование микроорганизмов в жидких средах проводили при 28°C на термостатируемой качалке при 100 об/мин.

Для получения агаризованных сред агар («Difco», США) добавляли до конечной концентрации 15 г/л. Культивирование микроорганизмов осуществляли в термостате при 28° С.

2.3 Методы выделения микроорганизмов

В большинстве случаев выделение микроорганизмов проводили **методом посева на твердые питательные среды**. Исследуемые образцы весом 1 г помещали в 250 мл колбы со 100 мл стерильного раствора NaCl (30 г/л). Инкубацию проводили в течение 30-60 минут на термостатируемом шейкере при 100 об/мин и 28°C. Чистые культуры микроорганизмов выделяли путем нанесения почвенной суспензии (5-7 разведение) на поверхность

агаризованной БСР, содержащей 30, 50 или 150 г/л NaCl и инкубировали при 28°C до появления колоний.

Как альтернативный способ выделения штаммов микроорганизмов, а также для получения бактерий-деструкторов различных ароматических соединений использовали **метод накопительных культур**.

Накопительные культуры (НК) различались источниками углерода и содержанием хлорида натрия в ростовой среде. Было сделано три различных варианта накопительных культур:

- 1) на МСР с разными концентрациями NaCl (от 30 до 200 г/л). В качестве субстратов для минеральных НК использовали нафталин и *орто*-фталевую кислоту в концентрации 1 г/л;
- 2) на БСР с разным содержанием хлорида натрия (от 30 до 200 г/л);
- 3) на среде ATCC 213 «*Halobacterium medium*» с 200 г/л NaCl.

Исследуемые образцы весом 1 г были помещены в 250 мл колбы с 100 мл ростовой среды. Инкубация проводилась в течение 2 недель на термокачалке (100 об/мин) при температуре 28°C. Из накопительных культур путем высева на селективные агаризованные среды выделяли чистые культуры микроорганизмов.

2.4 Определение ростовых характеристик

Параметры роста выделенных бактерий изучали в периодической культуре в средах, описанных в гл. 2.2. Культуры микроорганизмов выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды – 100 мл) при 28°C, аэрация на термокачалке при 100 об/мин. 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. При выращивании в жидких средах ОП₆₀₀ 0,04-0,05 единиц, оценивали как «+», ОП₆₀₀ 0,05-0,2 единицы – «++», ОП₆₀₀ 0,2-0,5 единиц – «+++».

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом стандартных серийных разведений с последующим высевам и подсчетом колоний

микроорганизмов на чашках Петри с БСР в присутствии 30 г/л NaCl или ATCC 213 «*Halobacterium medium*» с 200 г/л NaCl.

Расчет удельной скорости роста (μ), времени удвоения (t_d) и длительности *lag*-фазы (T_l) проводили по стандартным формулам (Нетрусов и др., 2005).

Чистоту культур контролировали высевом микроорганизмов на чашках Петри с агаризованной богатой средой (БСР, 30 г/л NaCl).

2.4.1 Рост на ароматических углеводородах

Способность бактерий разлагать ароматические углеводороды оценивали путем культивирования на агаризованной МСР при 28°C с добавлением моно(поли)ароматических углеводородов («Fluka», США) в качестве единственного источника углерода и энергии. Фенантрен, нафталин, бифенил, бензол, толуол и фенол помещали на крышку перевернутой чашки Петри; *орто*-фталевую кислоту (*орто*-ФК), гентизиновую, протокатеховую (ПКК), бензойную (БК), *пара*-гидроксibenзойную кислоты (ПГБК) вносили в среду до конечной концентрации 1 г/л, салициловую кислоту – до 0,5 г/л. Рост колоний бактерий на агаризованных средах с ароматическими углеводородами оценивали по сравнению с ростом на агаризованных средах того же состава без субстратов (контрольный вариант). Колонии диаметром 0,2 см оценивали как «+», 0,2-0,4 см – «++», 0,5 см и выше – «+++».

Рост бактерий на ароматических углеводородах оценивали также при культивировании в жидкой МСР, при этом субстраты (БК, *орто*-ФК, нафталин) вносили до конечной концентрации 1 г/л. Рост культур оценивали, как описано в главе 2.4.

2.4.2 Рост микроорганизмов при изменении осмолярности среды или концентрации субстрата

Ростовые характеристики микроорганизмов изучали в периодической культуре при выращивании в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 100 мл жидкой среды при 28°C и аэрации на круговой качалке (100 об/мин):

1) в БСР без NaCl и при содержании соли до 120 г/л (интервал концентраций NaCl – 10 г);

2) в МСР, не содержащей NaCl, с внесением в качестве субстрата *орто*-ФК до конечной концентрации от 1,0 до 8,0 г/л, и БК – от 0,4 до 5,0 г/л;

3) в МСР с БК (0,5 г/л), *орто*-ФК (1 г/л) или нафталином (1 г/л), и NaCl в концентрации от 10 до 120 г/л.

Рост культур оценивали по измерению ОП и подсчету КОЕ, как описано в главе 2.4.

При изучении устойчивости микроорганизмов к NaCl (0-300 г/л) на агаризованных средах (БСР и МСР с ароматическими углеводородами) оценивали размер колоний: колонии диаметром 0,2 см – «+», 0,2–0,4 см – «++», 0,5 см и выше – «+++».

2.5 Разложение ароматических углеводов

Утилизацию *орто*-ФК и БК определяли по изменению концентрации ароматических субстратов в среде при периодическом культивировании в МСР. Концентрацию соединений оценивали с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в культуральной жидкости, освобожденной от клеток (центрифуга miniSpin, «Eppendorf», Германия, 9660 об/мин, 3 мин), как описано (Егорова и др., 2010).

Деструкция *орто*-ФК и БК. Деструкцию проводили в опытах с «отмытыми» клетками. Бактериальную культуру выращивали в жидкой МСР с *орто*-ФК и БК (1 г/л) при 28°C до ОП₆₀₀=1,0. Клетки отмытые дважды в МСР (1 мл, ОП₆₀₀ = 2,0) переносили во флаконы с тефлоновыми крышками. *орто*-ФК и БК добавляли до конечной концентрации 500 мг/л, NaCl – до концентрации от 10 до 60 г/л (интервал концентраций - 10 г). Флаконы встряхивали на круговой качалке (180 об/мин) при 28°C. Анализ содержания *орто*-ФК, БК и продуктов деструкции проводили методами ВЭЖХ и спектрофотометрии, как описано (Егорова и др., 2010). Концентрацию веществ рассчитывали согласно калибровочным графикам.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

20 мкл каждого образца анализировали на колонке Сепарон SGX 100 NH₂, 4,6x150 мм, 5 мкм (Dr. Maisch GmbH). В качестве подвижной фазы использовали 80% раствор ацетонитрила при скорости потока 1 мл/мин и температуре 40°C. Искомое вещество определяли в ультрафиолете при длине волны 230 нм, используя UV/VIS detector («Shimadzu», Япония). Идентификацию проводили при сравнении времени выхода пиков экстрактов со стандартными растворами искомых веществ в концентрациях 5, 50, 100 мг/л. Количественное содержание рассчитывали с помощью пакета программ «LCsolution» («Shimadzu», Япония).

Спектрофотометрия. Для выделения и идентификации продуктов биодеструкции *орто*-ФК, БК культуральную жидкость очищали от бактериальных клеток методом центрифугирования (9660 об/мин в течение 3 мин на центрифуге miniSpin («Eppendorf», Германия). Для дальнейшего исследования использовали надосадочную жидкость. Детекцию анализируемых соединений проводили на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ от 390 нм до 440 нм.

2.6 Морфологическая и физиолого-биохимическая идентификация микроорганизмов

Морфологию колоний изучали у 72 часовых культур, выращенных на агаризованных БСР (30, 50 г/л NaCl) и ATCC 213 «*Halobacterium medium*» (200 г/л NaCl) (Методы общей бактериологии, 1983).

Морфологию клеток изучали у 12-72 часовых культур, выращенных на агаризованной богатой среде Раймонда, содержащей 30 г/л NaCl, с использованием световой микроскопии (микроскоп ЕС ЛЮАМ РПО-11, Россия).

Подвижность клеток смотрели в препарате «раздавленная капля». Препарат готовили на предметном стекле, в каплю физиологического раствора петлей вносили небольшое количество бактериальной культуры. Затем на каплю накладывали покровное стекло, после чего проводили микроскопирование

препарата под иммерсией (объектив x100) (микроскоп ЕС ЛЮМАМ РПО-11, Россия).

Грампринадлежность определяли методом теста с КОН (Смирнов, Киприанова, 1990). Небольшое количество суточной культуры бактерий наносили на предметное стекло и размешивали платиновой петлей в капле 3% КОН. Через 1-2 минуты проверяли наличие лизиса. Грамотрицательные бактерии лизировались и капля становилась желеобразной. Суспензии грамположительных микроорганизмов сохраняли свой прежний вид.

Для индикации каталазы в каплю 3% перекиси водорода платиновой петлей вносили культуру. О наличии каталазы судили по появлению пузырьков газа через 2-5 мин (Методы общей бактериологии, 1983).

Оксидазную активность определяли нанесением культуры платиновой петлей на фильтровальную бумагу, пропитанную 1% раствором тетраметил-п-фенилендиамина. Развитие пурпурной или фиолетовой окраски свидетельствовало о присутствии оксидазы (Методы общей бактериологии, 1983).

Рост при разных значениях pH определяли при концентрации Na^+ 0,8-0,85 М в буферных системах, приготовленных на основе БСР. Штаммы культивировались на чашках Петри на агаризованной среде при pH 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0. Рост учитывали на седьмой день культивирования (Методы общей бактериологии, 1983).

Рост при разных температурах. Штаммы культивировали на агадизованной БСР (30 г/л NaCl) при 10, 20, 28, 37 и 45°C. Рост учитывали на седьмой день культивирования.

2.7 Молекулярно-генетические методы

2.7.1 Подготовка проб ДНК для ПЦР

Единичная колония чистой культуры микроорганизма при помощи платиновой петли помещалась в пробирку «эппендорф», содержащую 100 мкл 0,05N NaOH. Смесь инкубировали при температуре 95°C 15 мин, затем охлаждали в течение 15 мин при температуре -20°C, далее центрифугировали при

12000 об/мин 2 мин. Для проведения амплификации генов 16S рРНК отбирали 1 мкл супернатанта лизата.

2.7.2 Амплификация гена 16S рРНК

Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3') на амплификаторе «My Cyclер» («Bio-Rad Laboratories», США) как описано (Lane, 1991).

2.7.3 Амплификация функциональных генов

Амплификацию функциональных генов осуществляли на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве матрицы для амплификации использовали препараты тотальной ДНК, выделенной из исследуемых бактериальных штаммов. Для выявления в изученных культурах функциональных генов (*narAaAb*), детерминирующих начальные этапы деструкции нафталина, были использованы праймеры: GN1F (5'-RAAGGGTTTGCAYGACG-3'), GN1R (5'-GTCGTTGTGGATGATGCTC-3') и GN2F (5'-CTCGATATTGTTCTGGACCGCA-3'). Условия проведения ПЦР были аналогичны таковым, приведенным в работе (Anan'ina *et al.*, 2011). Для амплификации *pht*-генов использовали праймеры phtBF (5'-GGAGCAGGTTCGGGTATCGG-3') и phtBR (5'-ACTTCGACGCCACATACAG-3'), сконструированные к консервативным участкам гена, кодирующего фталат 3,4-дегидрогеназу, а также phtAaF (5'-GTACGCACTGGCATGATTC-3') и phtAaR (5'-GCCGTTGATTGTTCTCGTTGTAGC-3') к α -субъединице фталат 3,4-диоксигеназы (Stingley *et al.*, 2004). Для амплификации *benA*-генов использовались праймеры benAF (5'-GCCCACGAGAGCCAGATTCCC-3') и benAR (5'-GGTGGCGGCGTAGTTCCAGTG-3'), сконструированные G. Baggi с соавторами (2008), комплементарные консервативным участкам гена, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы и гена, кодирующего хлорпирокатехин-1,2-диоксигеназу. Для определения *rsaH*-генов использовали праймеры к β -субъединице протокатехат 3,4-диоксигеназы

Pro3.4F (5'-GCSCCCTSGAGCCSAACTTC-3') и Pro3.4R (5'-GCCGCGSAGSACGATRTCGAA-3') (García *et al.*, 2005).

2.7.4 Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК

Для обнаружения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в горизонтальном агарозном геле (0,8%, 1,5%) в буфере TBE x 1 (Трис – 10,8 г/л, борная кислота – 5,5 г/л, 0,5М ЭДТА – 4 мл, вода дистиллированная – 79,7 мл/л) при комнатной температуре, напряжении 5-15 В/см в течение 20 минут – 2,5 часов. Агарозные гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 5-10 минут и фотографировали в УФ-свете с помощью системы гель-документирования BioDocAnalyze («Bio-Rad Laboratories», США). Для определения размеров фрагментов использовали следующие маркеры молекулярных масс: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder («Fermentas», Литва).

2.7.5 Определение нуклеотидных последовательностей функциональных генов и гена 16S рРНК и филогенетический анализ

Определение нуклеотидных последовательностей функциональных генов и гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) в Лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественного научного института при Пермском государственном национальном исследовательском университете.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей 16S рДНК и функциональных генов проводили с использованием программ CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>). Эволюционное расстояние, выраженное как число замен на 100 нуклеотидов, рассчитывали согласно (Jukes, Cantor, 1969). Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью пакета программ TREECON (Van de Peer, DeWachter, 1994) с использованием метода «neighbor-joining»

(в случае генов 16S рРНК). Оценку статистической достоверности ветвления («bootstrap-анализ») проводили с использованием соответствующей функции программы TREECON на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК 12 штаммов бактерий, выделенных из ризосферы растений, произрастающих на засоленных почвах района соледобычи, депонированы в базе данных GenBank под номерами KF010924 - 28, KC992726 - 31, KC538827 (приложение 1).

2.7.6 ДНК-типирование

Для типирования исследуемых штаммов бактерий проводили REP-ПЦР (полимеразную цепную реакцию повторяющихся экстрагенетических палиндромных последовательностей ДНК) с использованием праймеров REP 1R (5' – IIIICGICGICATCIGCC – 3') и REP 2I (5' – ICGICTTATCIGGCCTAC – 3') и BOX-ПЦР (полимеразную цепную реакцию повторяющихся BOX-элементов) с использованием праймера BOXA1R (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') в соответствии с методикой (Versalovic *et al.*, 1994). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле на 1х буфере TBE (89 мМ Трис-НСl, 89 мМ борная кислота, 2,5 мМ ЭДТА, рН 8,2) в течение 2 часов при напряжённости электрического поля 5,7 В/см. и анализировали полученные фрагменты.

2.7.7 Рестрикционный анализ амплифицированных 16S рДНК

В пробирки объемом 0,5 мл помещали по 5 мкл ПЦР продукта. Добавляли 1 акт. единицу одного из рестрикционных ферментов: *MboI* и *HhaI* («Fermentas», Литва), используя для каждой эндонуклеазы рекомендованный буфер («Fermentas», Литва) и соответствующий температурный режим. Полученные препараты ПЦР-рестрикции разделяли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, приготовленном на 1х TBE буфере.

2.7.8 Плазмидная ДНК

Наличие плазмидной ДНК выявляли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II («Bio-Rad Laboratories», США). Бактерии выращивали в 10 мл БСР без внесения NaCl, или в 10 мл МСР, содержащей

10 мг/мл NaCl и один из углеводов (*орто*-ФК, БК, бифенил (1 г/л), до ОП₆₀₀=1,0. Клетки осаждали центрифугированием (9660 об/мин, 3 мин) и отмывали дважды в ТЕ-буфере (10мМ трис/HCl, pH 7,6; 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Агарозные блоки готовили согласно рекомендациям производителя («Bio-Rad Laboratories», США). Блоки обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) при 37°C в течение 5-16 ч, протеиназой К (1 мг/мл) – при 50°C в течение 12-18 ч, нуклеазой S1 (5 ед. на агарозный блок) – при 37°C, 3,5 ч. Электрофорез образцов осуществляли в 1%-ном агарозном геле (Pulsed Field Certified Agarose, «Bio-Rad Laboratories», США) в 0,5 TBE-буфере при 14°C, 6 В/см, время пульсации от 60 с до 120 с в течение 24 ч. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л, 10 мин) и фотографировали в ультрафиолете с использованием системы гель-документации («Bio-Rad Laboratories», США). Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США).

2.7.9 Денатурирующий градиентный гель электрофорез (ДГГЭ) выполняли согласно стандартной методике (Muyzer *et al.*, 1993). При этом амплификация фрагмента гена 16S рРНК, составляющего приблизительно 500 п.н., была проведена с применением праймера 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') и праймера 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Праймер 27F включал на 5'-конце 40 п.н. GC-хвост (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'). Амплификацию 1 мкл очищенной геномной ДНК проводили в 50 мкл смеси, содержащей 0,25 мМ дНТФ, 0,3 мкМ праймера (каждого), 1,5 мМ MgCl₂, 1х буфер для *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия), 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия). Процедура ПЦР включала начальный денатурирующий шаг при 95°C в течение 5 минут и 30 циклов: 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 3 минут; затем 72°C в течение 10 минут.

Электрофорез был выполнен в 6% полиакриламидном геле, содержащем линейный денатурирующий химический градиент от 40 до 50%, где 100%

составляет 7М мочевины и 40% - формамид, согласно протоколу (Muyzer *et al.*, 1993). Разгонку проводили в течение 10,3 часа при 130 V и 60°C на Dcode™ Universal Mutation System («Bio-Rad Laboratories», США). ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0,5 мкг/мл) UV-трансиллюминацией, и документирована системой Gel Doc XR («Bio-Rad Laboratories», США).

2.8 Статистическая обработка результатов

Повторность опытов трёхкратная. При статистической обработке определяли среднюю арифметическую, стандартное отклонение, доверительный интервал. Для обработки результатов использовали статистический модуль Excel 5.0.

Глава 3. МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ ЗАЛЕЖЕЙ СОЛЕЙ (ВЕРХНЕКАМСКОЕ МЕСТОРОЖДЕНИЕ)

3.1 Бактерии, выделенные из образцов сильвинита и каменной соли (рудник СКПРУ-1, ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

Проведены исследования по выделению микроорганизмов из породы калийно-магниевых и натриевых солей Верхнекамского месторождения. Из образцов сильвинита и калийной соли методом накопительного культивирования на средах АТСС 213 «*Halobacterium medium*» и БСР было изолировано 8 штаммов бактерий (таблица 5). Концентрация ионов Na^+ в исследуемых образцах составляла 1115 мг-экв/100 г породы (каменная соль, образец № 2) и 1277 мг-экв/100 г породы (сильвинит, образец № 5). Изоляты, обозначенные ТС, при росте на агаризованной АТСС 213 «*Halobacterium medium*» (200 г/л NaCl) характеризовались сходными морфологическими признаками: форма колоний округлая, размер колоний 0,5-1 мм, колонии гладкие, блестящие, прозрачные, светло-бежевого цвета с ровным краем и однородной структурой. Клетки бактерий представлены грамотрицательными, каталазоположительными, оксидазоотрицательными палочками. Другой штамм С2, выделенный из образца каменной соли на БСР (50 г/л NaCl), представлен грамположительными палочковидными клетками, образующими округлые эндоспоры. Численность изолированных бактерий в одном образце составляла менее 10^2 кл/мл.

Таблица 5

Штаммы бактерий, выделенные из образцов сильвинита и каменной соли (рудник СКПРУ-1, ООО «Уралкалий»)

Источник выделения (образцы породы)	Среда выделения / концентрация NaCl	Обозначение штамма
Каменная соль (образец № 1)	БСР, 50 г/л	С2
Каменная соль (образец № 2)	АТСС 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	ТС121
		ТС122
Сильвинит (образец № 3)		ТС11
Сильвинит (образец № 3)		ТС132
Сильвинит (образец № 4)		ТС101
Сильвинит (образец № 5)		ТС111
		ТС112

Сравнение фингерпринтов, полученных методом ПЦР повторяющихся BOX-элементов, штаммов сходных морфогрупп, изолированных как из образцов сильвинита (штаммы TC101, TC111, TC112, TC132), так и из образцов каменной соли (штамм TC121), показало гомологичность их профилей (формируют одну геномную группу) (рисунок 10а). Ко второй геномной группе принадлежали идентичные по фингерпринтам штаммы TC11 (образец сильвинита) и TC122 (образец каменной соли) (рисунок 10б). Все исследуемые изоляты имели характерные отличия по фрагментам BOX-профилей от типовых штаммов рода *Chromohalobacter* (*C. canadensis* и *C. japonicus*).

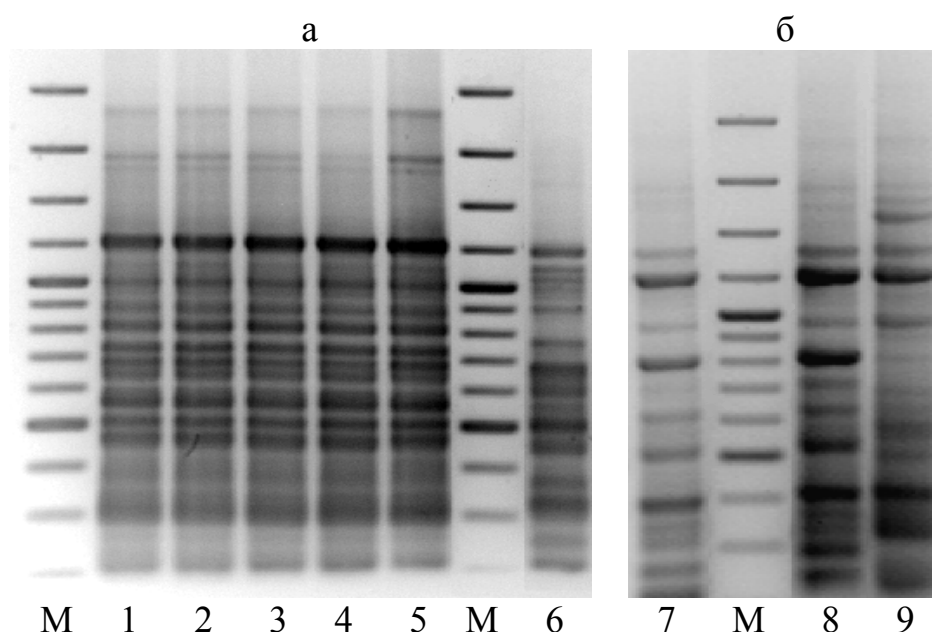


Рисунок 10. BOX-профили бактерий, имеющих наибольшее сходство по гену 16S рРНК с типовым штаммом *Chromohalobacter japonicus* 43^T (а, б): М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – TC101, 2 – TC111, 3 – TC112, 4 – TC121, 5 – TC132, с типовым штаммом *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T (б, 9): 7 – TC11, 8 – TC122.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых представителей морфо/геномных групп показал, что они являются представителями филумов «*Proteobacteria*» и «*Firmicutes*». Уровень сходства 16S рДНК изолятов с типовыми штаммами видов находился в пределах 99,5-100%. Выявленные граммотрицательные бактерии семейства *Halomonadaceae* (класс *Gamma**proteobacteria*), имели высокий уровень сходства с видами *Chromohalobacter canadensis* и *Chromohalobacter japonicus* (таблица 6).

Изолят С2, филогенетически близкий к спорообразующим бактериям класса *Bacilli* порядка *Bacillales*, показал 100% сходство с типовым штаммом *Bacillus licheniformis* DSM13^T (таблица 6).

Таблица 6

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из залежей солей

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
С2	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM13 ^T (CP000002)	100	800
ТС11	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1372
ТС101	<i>Chromohalobacter japonicus</i> 43 ^T (AB105159)	99,7	1407
ТС122	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	876

Полученная картина BOX-фингерпринтов и филогенетический анализ гена 16S рРНК позволяют предположить, что *Chromohalobacter* sp. ТС111 и ТС112, выделенные из одного образца сильвинита (образец № 5), вероятно, являются одним штаммом.

В результате исследования физиологических свойств выделенных бактерий было показано, что штамм С2, близкородственный *Bacillus licheniformis*, является галотолерантным микроорганизмом, способным к росту на среде БСР (агаризованной и жидкой) в отсутствие хлорида натрия в среде и в присутствии NaCl до 130 г/л. Штамм С2 растет при значении pH 6,0-8,0.

Галофильная группа изолятов, филогенетически близкая к бактериям рода *Chromohalobacter*, способна к росту в диапазоне концентраций соли от 20 г/л до 250 г/л и значением pH 7,0 в среде культивирования, что подтверждает физиологические параметры роста умеренно галофильных бактерий рода *Chromohalobacter* (Ventosa *et al.*, 1989).

3.2 Микроорганизмы в образце каменной соли, выявленные методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ)

Получены предварительные результаты по изучению «некультивируемых» микроорганизмов, присутствующих в образце каменной соли, из которого был выделен в чистую культуру штамм C2, близкородственный *Bacillus licheniformis* (глава 3.1). ПЦР-продукты гена 16S рРНК с суммарной (метагеномной) ДНК накопительной культуры, полученной при культивировании данного образца каменной соли (образец 1, таблица 1) на БСР с содержанием хлорида натрия 200 г/л, были проанализированы методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) (рисунок 11).

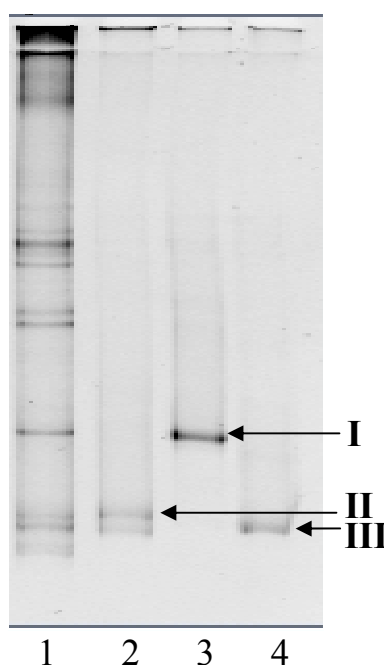


Рисунок 11. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена 16S рРНК, полученная методом ДГГЭ: I – суммарная бактериальная ДНК из накопительной культуры, полученной при культивировании образца каменной соли на БРС, 2, 3, 4 – реамплифицированные элюаты (обозначены I, II, III).

У нескольких фрагментов 16S рДНК, отличающихся электрофоретической подвижностью и элюированных из геля, определены нуклеотидные последовательности. Обнаружены бактерии (рисунок 11, I), филогенетически близкие Uncultured bacterium clone nbt36h09 (97% сходства с нуклеотидной последовательностью № FJ893879, GenBank). Так же были выявлены бактерии разных классов филума «*Proteobacteria*»: близкородственные бактериям

рода *Stenotrophomonas* (рисунок 11, II) класса *Gammaproteobacteria* (уровень сходства по гену 16S рРНК составляет 99% с *Stenotrophomonas maltophilia* РСМ-1^T) и бактериями рода *Ralstonia* (рисунок 11, III) класса *Betaproteobacteria* (уровень сходства по гену 16S рРНК - 95% с *Ralstonia pickettii* НРС578^T). Типовые штаммы, к которым элюированные из геля ДНК проявили наибольшее сходство, ранее из высокоминерализованных местообитаний выделены не были (Palleroni *et al.*, 1993; Yabuuchi *et al.*, 1996).

Таким образом, из образцов сильвинита и калийной соли из подземных залежей Верхнекамского месторождения солей (г. Соликамск), изолировано в чистую культуру 8 бактерий. Семь из них были идентифицированы как галофильные бактерии рода *Chromohalobacter*, близкородственные видам *C. canadensis* и *C. japonicus*. Типовые штаммы видов *C. canadensis* и *C. japonicus*, были выделены из образцов загрязненной почвы с содержанием 4,25 М NaCl и японской соленой пищи, соответственно (Arahal *et al.*, 2001a; Sanchez-Porro *et al.*, 2007). Обнаружение подобной филогенетической группы (род *Chromohalobacter*) весьма ожидаемо в исследованиях антропогеннозагрязненных территорий соледобычи, т.к. ранее бактерии рода *Chromohalobacter* были выделены из высокоминерализованных объектов окружающей среды. К примеру, еще в 1989 г. А. Ventosa с коллегами выделили из морских солеварен Испании новый вид бактерий, получивший название *Chromohalobacter marismortui* (Ventosa *et al.*, 1989). Позднее (в 2001 г.) D.R. Arahal с группой исследователей описали еще один вид данного рода – *Chromohalobacter salexigens*, также изолированного из морских солеварен (Arahal *et al.*, 2001b). Некоторые виды данного рода были выделены из природных гиперсоленых озер (*C. nigrandesensis*) (Prado *et al.*, 2006) и из прилегающих к ним территорий (*C. sarecensis*) (Quillaguaman *et al.*, 2004).

Глава 4. БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ГАЛИТОВЫХ ОТХОДОВ, ГРУНТА, ПОЧВЫ И РАССОЛОСБОРНИКОВ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК

4.1 Бактерии, выделенные из галитовых отходов района солеразработок (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

При изучении образцов галитовых отходов с применением метода накопительного культивирования на средах БСР и АТСС 213 «*Halobacterium medium*» было выделено 7 штаммов микроорганизмов (таблица 7), среди которых встречались ярко пигментированные культуры. Так, бактериальный штамм С31 при росте на БСР (50 г/л NaCl) был представлен мукоидными красными колониями с белым ровным краем, размером 3-4 мм. Морфологическая характеристика колоний бактериальных изолятов «ТС» группы (ТС71, ТС72, ТС732, ТС52, ТС512 и ТС91) весьма схожа с таковой ранее выделенных бактерий из образцов каменной соли и сильвинита (см глава 3.1). Численность изолированных бактерий в одном образце составляла менее 10^2 кл/мл.

Таблица 7

Штаммы микроорганизмов, выделенные из галитовых отходов района солеразработок

Источник выделения (образцы породы)	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Среда выделения / концентрация NaCl	Обозначение штамма
Галитовые отходы, солеотвал СКПРУ-2	1437	БСР, 200 г/л	С31
		АТСС 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	ТС71
			ТС72
			ТС732
Галитовые отходы, солеотвал СКПРУ-2 (граница почвы и соли)	471	АТСС 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	ТС52
			ТС512
Галитовые отходы, солеотвал СКПРУ-1	1813	АТСС 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	ТС91

Анализ фингерпринтов изолятов ТС52 и ТС512 показал гомологичность ВОХ-профилей этих штаммов не только между собой, но и с ранее выделенным из залежей калийно-магниевых солей штаммом *Chromohalobacter* sp. ТС101

(рисунок 12а). Штаммы TC71, TC72, TC732, TC91, изолированные из образцов галитовых отходов, имеют гетерогенные BOX-фингерпринты (рисунок 12б).

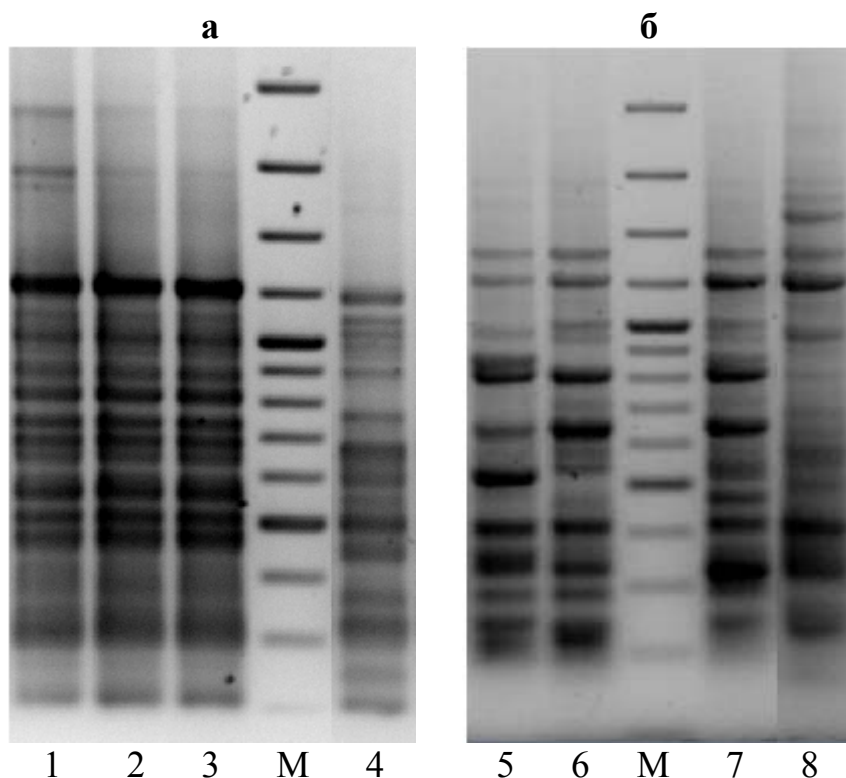


Рисунок 12. BOX-профили бактерий, имеющих наибольшее сходство по гену 16S рРНК с типовым штаммом *Chromohalobacter japonicus* 43^T (а, 4): М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – TC101, 2 – TC52, 3 – TC512, с типовым штаммом *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T (б, 8): 5 – TC71, 6 – TC72, 7 – TC732.

Все выделенные штаммы были идентифицированы с использованием молекулярно-генетических методов. Бактерии группы «ТС» на основании проведенного анализа гена 16S рРНК были отнесены к семейству *Halomonadaceae* (классу *Gamma*proteobacteria филума «*Proteobacteria*») и оказались наиболее близкородственны видам *Chromohalobacter canadensis* и *Chromohalobacter japonicus*. Штамм С31 показал филогенетическое сходство (99,7%) со штаммом типового вида *Streptomyces ambofaciens* HBUM 174708^T (порядок *Actinomycetales*, класс *Actinobacteria*, филум «*Actinobacteria*») (таблица 8).

**Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий,
выделенных из галитовых отходов**

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
C31	<i>Streptomyces ambofaciens</i> HBUM 174708 ^T (AB184182)	99,7	1400
TC71	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1335
TC72	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1391
TC732	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1392
TC52	<i>Chromohalobacter japonicus</i> 43 ^T (AB105159)	99,7	1395
TC91	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1402

По физиологическим характеристикам три изолята рода *Chromohalobacter* (штаммы TC71, TC72 и TC732) являются наиболее солеустойчивыми (диапазон роста при концентрации соли в среде культивирования составлял 20-300 г/л). Другие штаммы этого рода – TC52, TC512 и TC91, растут при меньшем содержании соли в среде культивирования (20-250 г/л). Все они являются нейтрофильными микроорганизмами, т.е. растут только при значении pH 7,0 в среде. Галотолерантный изолят *Streptomyces* sp. C31 способен к росту при содержании соли 0-30 г/л и значении pH 6,0-8,0

Таким образом, доминирующей группой в изученных образцах галитовых отходов, концентрация ионов Na⁺ в которых составляла 471-1813 мг-экв/100г (соответствует 108330-416-990 мг/кг), являются бактерии рода *Chromohalobacter* (сем. *Halomonadaceae*). Подобная картина наблюдалась и при изучении микробного сообщества залежей калийно-магниевых солей. Внимания заслуживает тот факт, что штаммы, выделенные из галитовых отходов, показали свою идентичность с бактериальными изолятами из породы сильвинита и каменной соли по филогенетическому анализу и сравнению фингерпринтов, полученных методом ВОХ-ПЦР (см. глава 3.1). Данное обстоятельство может

свидетельствовать о том, что галофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* изначально присутствовали в породе каменной соли и сильвинита, сформированной более 280 миллионов лет назад при высыхании древнего Пермского моря и занесения его осадочными породами, и, далее, сохраняются в галитовых отходах, получающихся после технологических обработок в процессе добычи минеральных солей. Можно предположить, что бактерии семейства *Halomonadaceae* способны и к заселению непосредственно прилегающих к солеотвалам местообитаний (грунт, почва).

4.2 Бактерии из образцов грунта, отобранных вблизи солеотвалов Соликамского рудоуправления (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

Из исследуемых образцов грунта, отобранных на расстоянии 1-2 метров от солеотвала (концентрация Na^+ 1326 мг-экв/100 г) методом НК на средах БСР и АТСС 213 «*Halobacterium medium*» были изолированы 6 штаммов грамотрицательных и эндоспоровых бактерий (таблица 9). Штаммы K511 и K513 характеризовались схожей морфологией колоний, а именно – колонии бежевые, круглые, непрозрачные, диаметром 4-5 мм. Изоляты K51 и K52 имели яркую пигментацию колоний: непрозрачные блестящие колонии штамма K51 размером 5-7 мм имели оранжевую пигментацию, а колонии изолята K52 – желтую. Выделенные штаммы, обозначенные TC31 и TC32, имели сходную морфологию колоний с ранее выделенными культурами «ТС» (см. глава 3.1, 4.1). Клетки всех бактериальных изолятов были представлены подвижными палочками. Численность изолированных бактерий в образце составляла менее 10^2 кл/мл.

Таблица 9

Штаммы бактерий, выделенные из образцов грунта района солеразработок

Источник выделения	Среда выделения / концентрация NaCl	Обозначение штамма
Грунт, 1-2 м от солеотвала, СКПРУ-2	БСР, 50 г/л	K51
		K511
		K513
		K52
	АТСС 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200г/л	TC31
		TC32

С применением методов REP-ПЦР, BOX-ПЦР и рестрикционного анализа была проведена сравнительная характеристика выделенных штаммов. Анализ полученных REP-профилей фрагментов геномной ДНК исследуемых бактерий показал, что штаммы K511 и K513 обладают идентичными REP-фингерпринтами (рисунок 13а). Результаты рестрикционного анализа амплифицированных 16S рДНК с использованием рестриктаз *MboI* и *HhaI* также показали принадлежность штаммов K511 и K513 к одной геномгруппе (рисунок 13в).

Изоляты TC31 и TC32, имеющие общие морфологические параметры с бактериями рода *Chromohalobacter*, отличались минорными фрагментами анализируемых профилей (рисунок 13б). В результате сравнения BOX-профилей исследуемых штаммов с ранее выделенными бактериями из залежей солей и галитовых отходов было обнаружено, что изолят TC32 из образца грунта СКПРУ-2 имел идентичный профиль со штаммом *Chromohalobacter* sp. TC91, изолированным из галитовых отходов солеотвала СКПРУ-1 (рисунок 13г).

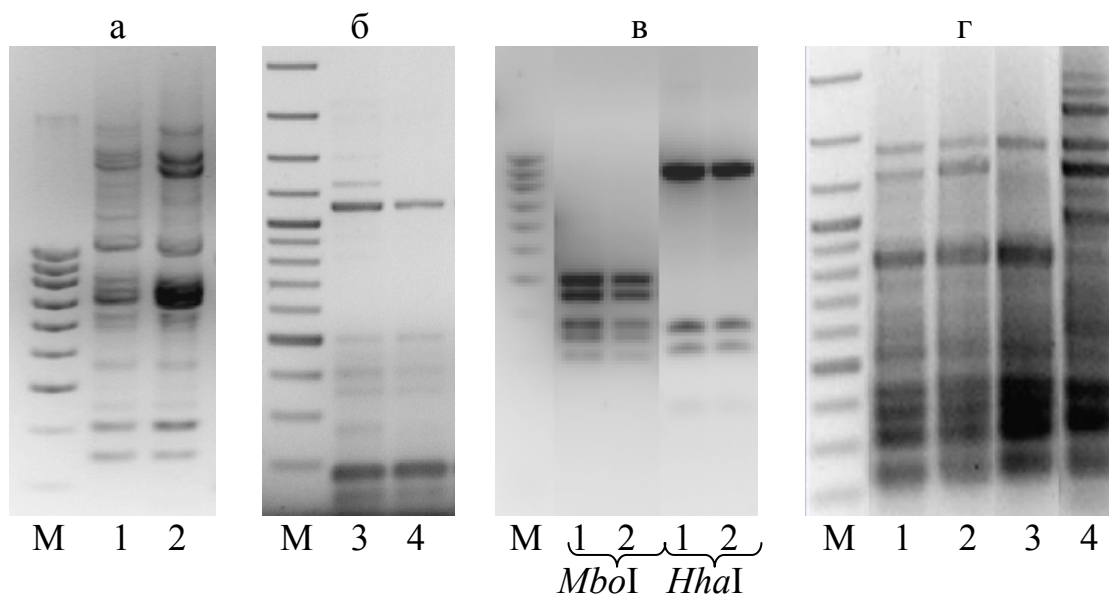


Рисунок 13. Электрофореграмма продуктов амплификации REP-ПЦР штаммов близкородственных бактериям (а) рода *Pseudomonas*: М – маркер 1 kb («Силекс», Россия), 1 – K511, 2 – K513, (б) рода *Chromohalobacter*: М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 3 – TC32, 4 – TC31, (в) Электрофореграмма генов 16S рДНК, обработанных рестриктазами *MboI* и *HhaI*: М – маркер 1 kb («Силекс», Россия), 1 – K511, 2 – K513, (г) BOX-профили бактерий, имеющих наибольшее сходство с типовым штаммом *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T (4): М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – TC91, 2 – TC32, 3 – TC31.

Определение филогенетического положения на основании анализа генов 16S рРНК показало, что штаммы K51 и K52 относятся к родам *Bacillus* и *Virgibacillus* (класс *Bacilli*), штамм K511 – к роду *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*). Штаммы TC31 и TC32 были наиболее близки к *Chromohalobacter canadensis* (сем. *Halomonadaceae*) (таблица 10), ранее обнаруженными в образцах ископаемых залежей солей (сильвинит, каменная соль) и галитовых отходов (см. глава 3.1, 4.1).

Таблица 10

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из образцов грунта

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
K51	<i>Bacillus alcalophilus</i> TCC11004 ^T (X76436)	99,5	1400
K511	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 ^T (D84020)	99,0	1400
K52	<i>Virgibacillus picturae</i> DSM 14867 ^T (AJ315060)	99,5	1400
TC31	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1401
TC32	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1389

Среди изолированных бактерий встречаются как галофильные, так и галотолерантные микроорганизмы. Штаммы, близкородственные бактериям рода *Chromohalobacter*, растут при концентрации соли 20-250 г/л и значении pH 7,0 в среде культивирования. Штаммы *Pseudomonas* sp. K511 и K513 являются галотолерантными бактериями и растут в диапазоне концентрации NaCl 0-50 г/л и pH 6,0-8,0. Изоляты *Bacillus* sp. K51 и *Virgibacillus* sp. K52 также являются галотолерантными и способны к росту от 0 до 100 г/л NaCl и pH 6,0-8,0 в среде культивирования.

Помимо бактерий рода *Chromohalobacter*, выявленных также в залежах калийно-магниевых солей и галитовых отходах в исследованных образцах грунта были обнаружены характерные для почвенной микробиоты грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas* (штаммы K511 и K513), наиболее близкие к типовому штамму *Pseudomonas putida* (таблица 10).

4.3 Бактерии, выделенные из образцов воды, соляных отложений со дна рассолосборника (СКПРУ-2, ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

В результате проведенного исследования из разных образцов рассолосборника (вода, донные солевые отложения) методом накопительного культивирования на агаризованных БСР (150 г/л NaCl) и ATCC 213 «*Halobacterium medium*» (200 г/л NaCl) было изолировано 10 галофильных штаммов микроорганизмов (таблица 11). Изоляты TC21, TC22, TC23, B151, B201, B202 имеют округлую форму колоний светло-бежевого цвета с ровным краем, размером 0,5-1 мм, гладкую, блестящую поверхность. Штаммы B152, B153 характеризуются округлой формой колоний, бежевого цвета, размером 3-5мм. Клетки вышеперечисленных штаммов представлены грамотрицательными, каталазоположительными, оксидазоотрицательными подвижными палочками. Изоляты TC42 и TC62 имели сходные морфологические параметры со штаммами, обозначенными как «ТС», но более темной окраски колоний, и их клетки имели форму кокков. Численность изолированных бактерий в каждом образце составляла менее 10^2 кл/мл.

Таблица 11

Штаммы бактерий, выделенные из рассолосборника (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

Источник выделения	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Среда выделения / концентрация NaCl	Обозначение штамма
Поверхностный слой воды рассолосборника	181	БСР, 150 г/л	B151
			B152
			B153
			B201
			B202
		ATCC 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	TC42
Дно (солевые отложения) рассолосборника	995	ATCC 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	TC21
			TC22
			TC23
		ATCC 213 « <i>Halobacterium medium</i> », 200 г/л	TC62

Для сравнительной характеристики изолятов были использованы методы ДНК-типирования (REP-ПЦР, BOX-ПЦР) и рестрикционного анализа (ARDRA). Сравнение REP-ПЦР профилей фрагментов геномной ДНК штаммов, имеющих общие морфологические параметры с бактериями рода *Chromohalobacter*, показало, что штаммы B201 и B202 обладают идентичными REP-фингерпринтами, а изолят B151 отличается от них (рисунок 14а).

Результаты рестрикционного анализа амплифицированных 16S рДНК с использованием рестриктаз *MboI* и *HhaI* показали, что изоляты B151, B152, B153 и B201 имеют уникальные профили. Кроме того, на данной электрофореграмме видно, что схожие по морфологическим признакам колоний изоляты B152 и B153 отличаются по минорным фрагментам (рисунок 14б).

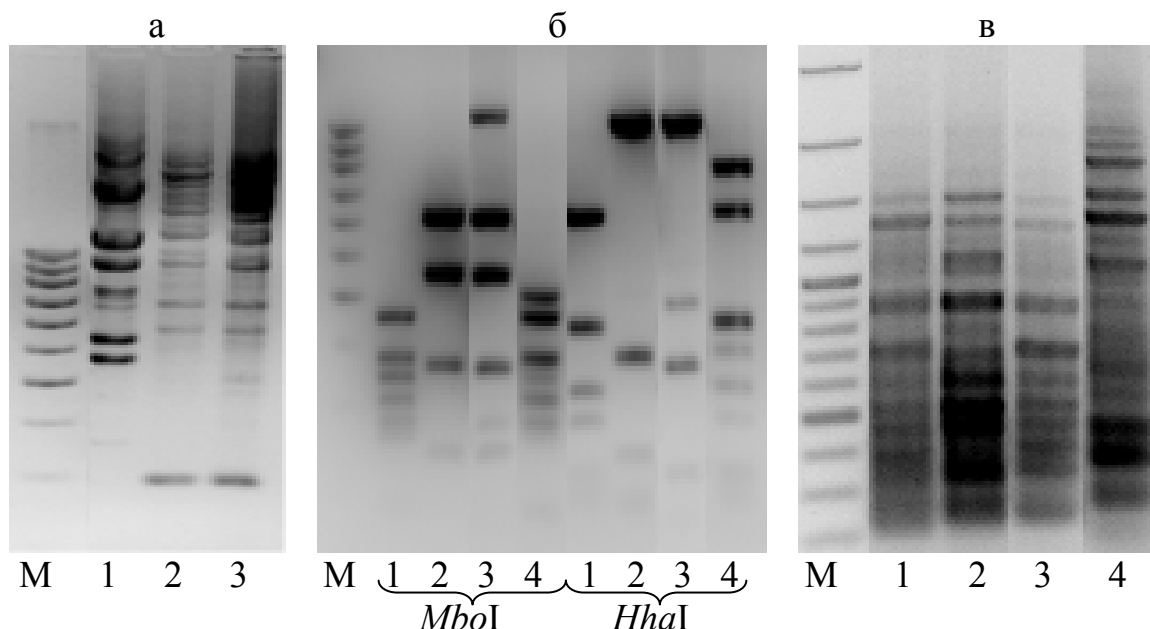


Рисунок 14. Электрофореграмма продуктов амплификации (а) REP-ПЦР штаммов филогенетически близкородственных бактериям рода *Chromohalobacter*: М – маркер 1 kb («Силекс», Россия), 1 – B151, 2 – B201, 3 – B202, (б) генов 16S рДНК, обработанных рестриктазами *MboI* и *HhaI*: М – маркер 1 kb («Силекс», Россия), 1 – B151, 2 – B152, 3 – B153, 4 – B201, (в) BOX-ПЦР штаммов бактерий, имеющих наибольшее сходство по гену 16S рДНК с типовым видом *Chromohalobacter canadensis*: М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – TC21, 2 – TC22, 3 – TC23, 4 – типовой штамм *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T.

Подробный анализ фрагментов геномной ДНК, полученных методом BOX-ПЦР, показал, что морфологически схожие изоляты из одного образца

солевых отложений рассолосборника TC21 и TC23 принадлежат одной геномгруппе и отличаются от изолята TC22 (рисунок 14в).

Согласно филогенетическому анализу 16S рДНК все выделенные штаммы являются представителями класса *Gammaproteobacteria* филума «*Proteobacteria*» (таблица 12). Кроме бактерий рода *Chromohalobacter*, обнаруженных в высокоминерализованных образцах района разработок ВКМКС, были выделены штаммы B152, B153, близкородственные бактериям рода *Idiomarina*. Ранее бактерии данного рода были выделены только из природных морских экосистем (<http://www.bacterio.net/idiomarina.html>). Штаммы TC42 и TC62 имели низкий процент сходства по гену 16S рДНК (93,8 % и 93,4 %, соответственно) с типовым штаммом *Salinisphaera hydrothermalis*, поэтому можно предположить, что данные культуры представляют собой новые таксономические единицы, требующие более подробного изучения (таблица 12).

Таблица 12

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рДНК) бактерий, выделенных из образцов рассолосборника

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рДНК, %	Кол-во нуклеотидов
Вода рассолосборника			
B151	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,4	1400
B153	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T (AF288370)	99,0	1370
B201	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,4	1400
TC42	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T (EU740416)	93,8	1356
Дно (солевые отложения) рассолосборника			
TC21	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1390
TC22	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1374
TC23	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1398
TC62	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T (EU740416)	93,4	1331

Примечание. Цветом выделены штаммы, претендующие на описание в качестве новых таксонов.

Все выделенные изоляты являются галофильными бактериями. Штаммы *Idiomarina* sp. B152 и B153 растут при концентрации соли 20-100 г/л. Штаммы *Chromohalobacter* sp. B152, B201, B202, изолированные из образцов воды рассолосборника с концентрацией Na^+ 181 мг-экв/100 г (соответствует 41630 мг/кг), способны к росту при содержании соли 20-150 г/л, в то же время *Chromohalobacter* sp. TC21, TC22, TC23, изолированные из донных отложений рассолосборника с наибольшей концентрацией Na^+ (таблица 11), растут при более высокой минерализации среды культивирования (от 20 до 300 г/л NaCl). Рост всех штаммов наблюдался при значении pH 7,0-7,5.

Так же как и в других исследуемых образцах района солеразработок, в образцах рассолосборника были обнаружены бактерии семейства *Halomonadaceae*. Все они имели наибольший уровень сходства по гену 16S рРНК (от 99,4% до 99,9%) с типовым штаммом *Chromohalobacter canadensis*. В то же время штаммы отличались на генотипическом уровне (ВОХ-фингерпринты) от изолятов рода *Chromohalobacter* из других экотопов, что говорит об их индивидуальности.

4.4 Бактерии, выделенные из ризосферы растений, произрастающих вблизи солеотвалов (ОАО «Уралкалий», г. Соликамск)

Для изучения бактериального разнообразия ризосферы растений, произрастающих на территории района солеразработок, вблизи солеотвалов ОАО «Уралкалий» г. Соликамск, были отобраны образцы ризосферы 7 растений: ястребинки зонтичной (*Hieracium umbellatum* L.), вероники дубравной (*Veronica chamaedrys*), торичника солончакового (*Spergularia salina* J. & C.), мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), мари красной (*Chenopodium rubrum* L.), мать-и-мачехи обыкновенной (*Tussilago farfara*), нивяника обыкновенного (*Leucanthemum vulgare*). Методами НК (БСР, 150 г/л NaCl) и прямого посева на агаризованную БСР с содержанием NaCl 50 г/л из образцов ризосферы было выделено 63 штамма бактерий (таблица 13). Отбор штаммов осуществлялся на основе различий в морфологии колоний бактерий, растущих на агаризованной среде.

**Штаммы бактерий, выделенные из ризосферы растений,
произрастающих на территории солеразработок**

Источник выделения	Концентрация ионов Na^+ , мг-экв/100 г	Штаммы, выделенные на БСР, 50 г/л NaCl (прямой высев)	Штаммы, выделенные на БСР, 150 г/л NaCl (НК)
Ризосфера мятлика лугового			
<i>Из незасоленной почвы</i>			
1600 м от солеотвала, СКПРУ-1	0,02	MBC2, MBC4, MBC6, MBC8	—
<i>Из засоленной почвы</i>			
5 м от солеотвала, СКПРУ-1	10,52	M45-1N, M45-2N, M45-6N, M46-7, M46-11, M47-1, M47-2, MH46-1, MH46-2	MH4R1, MH4R2-1, MH4R2-2
20 м от солеотвала, СКПРУ-2	1,37	M55-1N, M55-2N, M55-6N, M56-8	MH5R3-2
50 м от солеотвала, СКПРУ-2	1,39	M65-1N, M65-2N, M65-3N, M65-4N, M65-5N	MH6R1a, MH6R2-2b, MH6R4-2
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	3,23	M75-1N, M75-3N	MH7R1-2
5 м от солеотвала, СКПРУ-2	8,45	M95-1N, M95-3N, MH96-1	MH9R1-2
Ризосфера ястребинки зонтичной			
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	0,34	M16-1, M17-1	—
Ризосфера вероники дубравной			
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	0,37	н.о.	MH2R2-2
Ризосфера торичника солончакового			
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	1,68	M35-11N, M35-15N	MH3R1-1, MH3R3-1, MH3R3-2
Ризосфера мари красной			
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	0,56	M105-1, M106-5, M107-2, M107-4	—
5 м от солеотвала, СКПРУ-2	5,18	M115-1, M115-3N-a, M116-2, M116-3, M116-4, M116-7, M116-8	—
10 м от солеотвала, СКПРУ-1	1,24	M136-2, M136-3, M136-7	MH13R2-2
Ризосфера мать-и-мачехи обыкновенной			
10 м от солеотвала, СКПРУ-1	1,41	M125-1, M126-4, M127-7	—
Ризосфера нивяника обыкновенного			
10 м от солеотвала, СКПРУ-2	2,94	н.о.	MH14R2-2

Примечание. «н.о.» – не определяли, «—» – не обнаружено.

Идентификация выделенных штаммов проведена с использованием молекулярно-генетических методов, основанных на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (таблица 14).

Таблица 14

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из ризосферы растений

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
Ризосфера мятлика лугового			
<i>Из незасоленной почвы</i>			
MBC2	<i>Pseudomonas baetica</i> a390 ^T (FM201274)	99,3	876
MBC4	<i>Pseudomonas mandelii</i> CIP 105273 ^T (AF058286)	99,6	827
MBC6	<i>Microbacterium maritopicum</i> DSM12512 ^T (AJ853910)	99,6	611
MBC8	<i>Pseudomonas reinekei</i> Mt-1 ^T (AM293565)	98,6	753
<i>Из засоленной почвы</i>			
M45-1N	<i>Kocuria polaris</i> CMS 76or ^T (AJ278868)	99,7	743
M45-2N	<i>Halomonas ventosae</i> A112 ^T (AY268080)	99,4	1385
M45-6N	<i>Zhihengliuella halotolerans</i> YIM 70185 ^T (DQ372937)	99,9	807
M46-7	<i>Alteromonas hispanica</i> F-32 ^T (AY926460)	96,7	1337
M46-11	<i>Isophtericola halotolerans</i> YIM 70177 ^T (AY789835)	99,1	784
M47-1	<i>Kushneria marisflavi</i> SW32 ^T (AF251143)	98,7	1404
M47-2	<i>Microbacterium profundum</i> Shh49 ^T (EF623999)	98,7	1314
M55-1N	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868 ^T (AY999894)	100	815
M55-2N	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084 ^T (AY226508)	100	927
M55-6N	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238 ^T (EU005372)	99,9	726
M56-8	<i>Leeuwenhoekiella marinoiflava</i> LMG 1345 ^T (AF203475)	97,7	1318
M65-1N	<i>Rhizobium selenitireducens</i> B1 ^T (EF440185)	97,7	1257
M65-2N	<i>Altererythrobacter indicus</i> MSSRF26 ^T (DQ399262)	99,3	841
M65-3N	<i>Thalassospira lucentensis</i> DSM 14000 ^T (AM294944)	98,2	1320
M65-4N	<i>Rhizobium sphaerophysae</i> CCNWGS0238 ^T (FJ154088)	97,6	1317

**Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий,
выделенных из ризосферы растений**

M65-5N	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,2	1344
M75-1N	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T (AF483625)	99,1	1286
M75-3N	<i>Bacillus thioparans</i> BMP-1 ^T (DQ371431)	99,9	837
M95-1N	<i>Planomicrobium koreense</i> JG07 ^T (AF144750)	99,8	881
M95-3N	<i>Paracoccus homiensis</i> DD-R11 ^T (DQ342239)	99,0	817
M95-7N	<i>Aurantimonas coralicida</i> WP1 ^T (AJ786361)	99,9	913
MH46-1	<i>Kushneria marisflavi</i> SW32 ^T (AF251143)	98,7	1390
MH46-2	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T (AF212204)	98,8	1350
MH96-1	<i>Halobacillus profundi</i> IS-Hb4 ^T (AB189298)	98,96	1358
MH4R1	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T (AF212204)	99,1	1233
MH4R2-1	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T (AF288370)	100	835
MH5R3-2	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG ^T (AJ640133)	99,9	1390
MH6R1a	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM 10037 ^T (AY543169)	100	805
MH6R2-2b	<i>Oceanobacillus picturae</i> LMG 19492 ^T (AJ315060)	100	811
MH7R1-2	<i>Arthrobacter nicotianae</i> DSM 20123 ^T (X80739)	99,3	1366
MH9R1-2	<i>Virgibacillus necropolis</i> LMG 19488 ^T (AJ315056)	98,3	1335
Ризосфера вероники дубравной			
MH2R2-2	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72 ^T (AF541966)	99,9	742
Ризосфера ястребинки зонтичной			
M16-1	<i>Pseudomonas brenneri</i> CFML 97-391 ^T (AF268968)	99,4	801
M17-1	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 ^T (X76564)	99,8	791
Ризосфера торичника солончакового			
M35-11N	<i>Isophtericola halotolerans</i> YIM 70177 ^T (AY789835)	99,6	774
M35-15N	<i>Pseudomonas seleniipraecipitatus</i> CA5 ^T (FJ422810)	99,2	831
MH3R1-1	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T (AF288370)	100	783
MH3R3-1	<i>Salinicola salarius</i> M27 ^T (AM229316)	99,3	1390
Ризосфера мари красной			
M105-1	<i>Salinicola salarius</i> M27 ^T (AM229316)	99,3	1346
M106-5	<i>Kushneria marisflavi</i> SW32 ^T (AF251143)	98,6	1386
M107-2	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 ^T (AJ277840)	100	764

**Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий,
выделенных из ризосферы растений**

M107-4	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T (AF234854)	99,9	834
M115-1	<i>Bacillus hwajinpoensis</i> SW-72 ^T (AF541966)	99,7	782
M115-3Na	<i>Halomonas titanicae</i> BH1 ^T (FN433898)	98,9	1405
M116-2	<i>Microbacterium terricola</i> KV-448 ^T (AB234025)	98,8	1294
M116-3	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T (AY671975)	99,3	1377
M116-4	<i>Planomicrobium flavidum</i> ISL-41 ^T (FJ265708)	99,1	736
M116-7	<i>Salegentibacter salarius</i> ISL-6 ^T (EF486353)	99,1	789
M116-8	<i>Marinobacter maritimus</i> CK47 ^T (AJ704395)	97,8	1343
M136-2	<i>Isoptericola chiayiensis</i> 06182M-1 ^T (FJ469988)	99,1	1291
M136-3	<i>Isoptericola halotolerans</i> YIM 70177 ^T (AY789835)	99,2	779
M136-7	<i>Salinibacterium amurskyense</i> KMM 3673 ^T (AF539697)	99,8	863
MH13R2-2	<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR ^T (AF288370)	100	833
Ризосфера мать-и-мачехи обыкновенной			
M125-1	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1 ^T (AY245449)	99,3	1316
M126-4	<i>Janibacter hoylei</i> DSM 21601 ^T (FR749912)	100	686
M127-7	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (FJ214355)	100	883
Ризосфера нивяника обыкновенного			
MH14R2-2	<i>Virgibacillus necropolis</i> LMG 19488 ^T (AJ315056)	97,6	1332

Примечание. Цветом выделены штаммы, претендующие на описание в качестве новых таксонов.

Из литературных источников известно, что в ризосфере растений в большинстве случаев доминируют бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*), кроме того, для ризосферной зоны типичны бактерии родов *Agrobacterium*, *Xanthomonas* (класс *Gammaproteobacteria*) и *Flavobacterium* (класс *Flavobacteriia*) (Звягинцев и др., 1993), при этом доля бацилл и актиномицетов не высока и составляет обычно около 1% (Юрчак и др., 1977; Калакуцкий, Шарая, 1990). Высокая численность бактерий принадлежащих к классам *Actinobacteria* и *Bacilli* отмечена для ризосферы растений, произрастающих в пустынях, при этом доля данных бактерий возрастет в течение сухих периодов (Marasco *et al.*, 2012; Kavamura *et al.*, 2013).

После проведения филогенетического анализа выделенных морфотипов с использованием молекулярно-генетических методов было обнаружено, что значительная часть изолированных бактерий относится к представителям класса *Gammaproteobacteria* (около 37% от общего количества всех выявленных морфо/геномо групп) (рисунок 15). Также отмечено увеличение численности бактерий, принадлежащих к классам *Actinobacteria* и *Bacilli* (29% и 21%, соответственно), что уже было отмечено в экосистемах с экстремальными условиями выживания (Kavamura *et al.*, 2013). В меньшей степени представлены бактерии, показавшие наибольшее филогенетическое сходство с микроорганизмами классов *Alphaproteobacteria* и *Flavobacteriia* (рисунок 15).

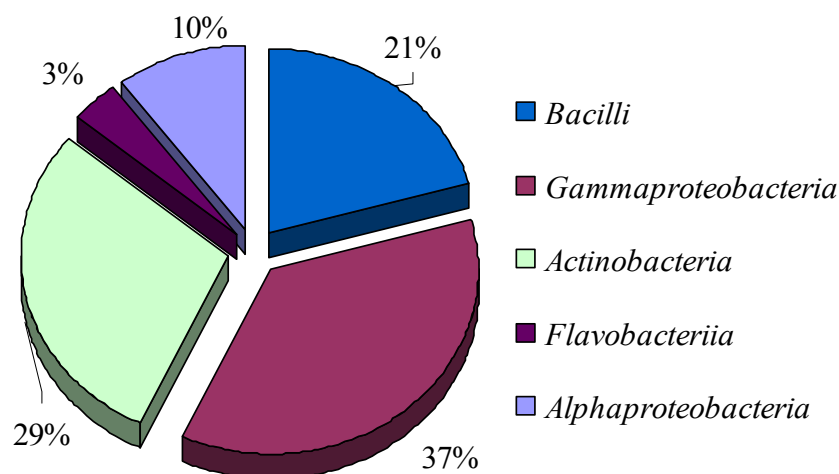


Рисунок 15. Относительное содержание различных классов бактерий, изолированных из образцов растительной ризосферы.

Грамотрицательные прокариоты класса *Gammaproteobacteria* в основном были представлены галофильными бактериями семейств *Idiomarinaceae* (рода *Idiomarina*) и *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Kushneria*, *Salinicola*). Наибольшую часть среди всех галомонад составляли бактерии рода *Halomonas* (34% от общего количества морфо/геномогрупп данного семейства) (рисунок 16).

Бактерии рода *Salinicola*, изолированные из растительной ризосферы торичника солончакового (штаммы МН3R3-1 и МН3R3-2) и мари красной

(штаммы M106-4, M105-4N и M105-1), имели наиболее высокий уровень сходства нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с таковой типового штамма *Salinicola salarius* M27^T.

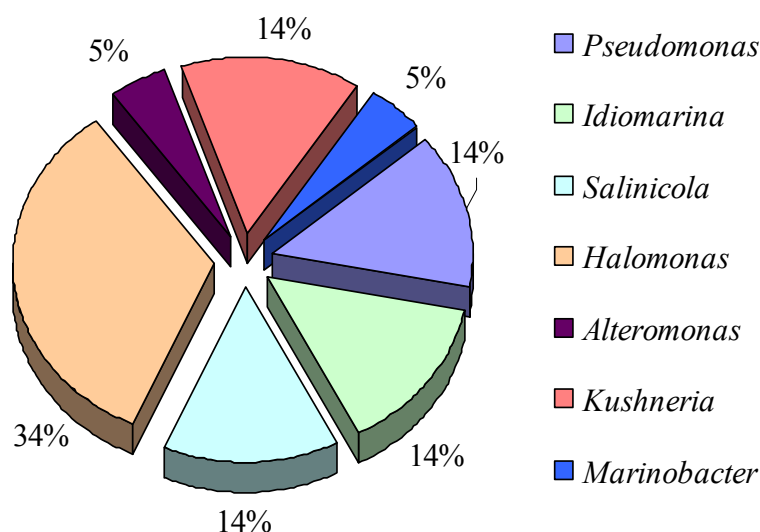


Рисунок 16. Относительное содержание различных филогенетических групп бактерий класса *Gammaproteobacteria* (процентное соотношение родов).

Ранее представители рода *Salinicola* были выделены с территории солеразработок БКПРУ-1 г. Березники Пермского края и описаны как новый род семейства *Halomonadaceae* с типовым штаммом *Salinicola socius* SMB35^T (Ананьина и др., 2007). Изоляты, филогенетически близкие роду *Salinicola*, оказались генетически полиморфны по анализу фрагментов геномной ДНК, полученной методом ВОХ-ПЦР, и отличались от ВОХ-профиля наиболее близкородственного типового штамма (рисунок 17а).

Кроме того, галофильные бактерии рода *Kushneria*, выделенные из ризосферы мятлика лугового (штаммы M47-1, MH46-1) и мари красной (штамм M106-5), имели 98,6-98,7% сходства по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК с типовым штаммом вида *Kushneria marisflavi*, что является довольно низким значением для семейства *Halomonadaceae* (de la Haba *et al.*, 2010) и указывает на принадлежность к новой таксономической единице. Примечательно, что данные изоляты, выделенные не только из разных, но и из одного образца ризосферы мятлика лугового, обладали гетерогенными профилями, полученными методом ВОХ-ПЦР (рисунок 17б).

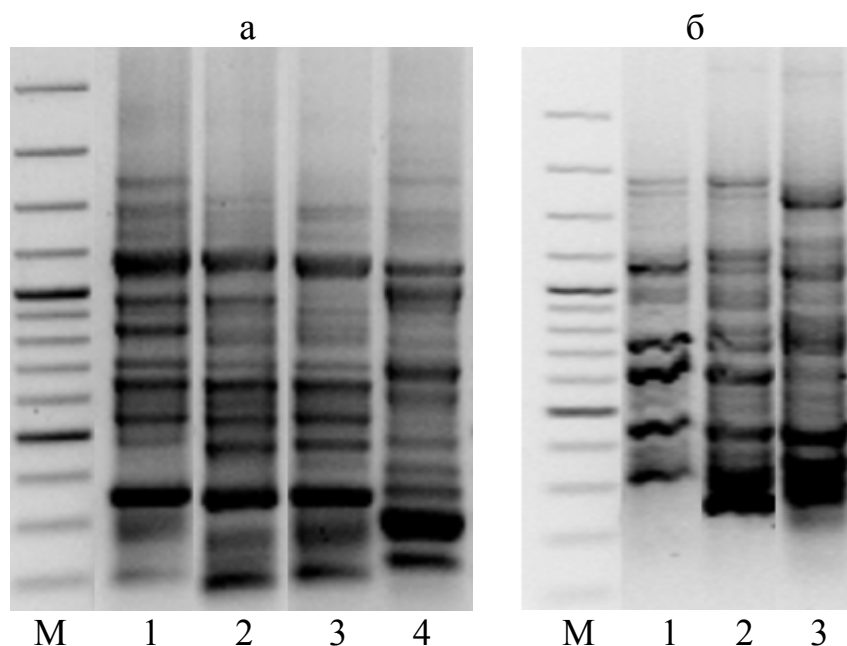


Рисунок 16. **BOX-профили** исследуемых бактерий **(а)** рода *Salinicola*: М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – МН3R3-1, МН3R3-2, 2 – М106-4, М105-4N, 3 – М105-1, 4 – типовый штамм *Salinicola salarii* M27^T, **(б)** рода *Kushneria*: М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – М47-1, 2 – МН46-1, 3 – М106-5.

Помимо галофильных бактерий в образцах растительной ризосферы была обнаружена значительная доля галотолерантных бактерий класса *Gammaproteobacteria*, а именно рода *Pseudomonas* (14% от общего количества морфо/геномогрупп данного класса), *Alteromonas*, *Marinobacter* (не более 5% каждый) (рисунок 16).

Доминирующими представителями класса *Bacilli* оказались бактерии, проявившие уровень сходства по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК с таковыми типовых штаммов рода *Bacillus* (42% от общего количества морфо/геномогрупп данного класса) (рисунок 18а).

Изоляты класса *Actinobacteria* характеризовались наибольшим филогенетическим разнообразием. Среди них были обнаружены представители родов *Isoptericola* (доминирующая группа – 23% от общего числа морфо/геномогрупп бактерий данного класса), *Zhihengliuella*, *Nesterenkonia*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Janibacter* (рисунок 18б).

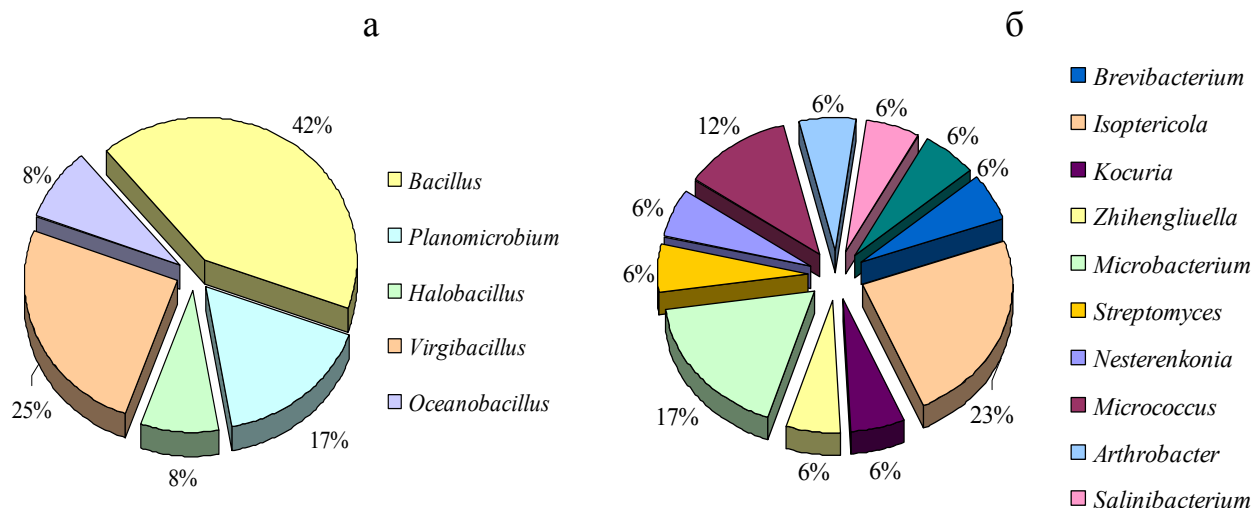


Рисунок 18. Относительное содержание различных филогенетических групп бактерий классов: (а) *Bacilli*, (б) *Actinobacteria* (процентное соотношение родов).

Незначительная часть среди всех выделенных микроорганизмов (около 3%, рисунок 15) показала наибольшее филогенетическое сходство с бактериями классов *Alphaproteobacteria* (родов *Rhizobium*, *Altererythrobacter*, *Paracoccus*) (рисунок 19а) и *Flavobacteriia* (родов *Leeuwenhoekiella*, *Salegentibacter*) (рисунок 19б).

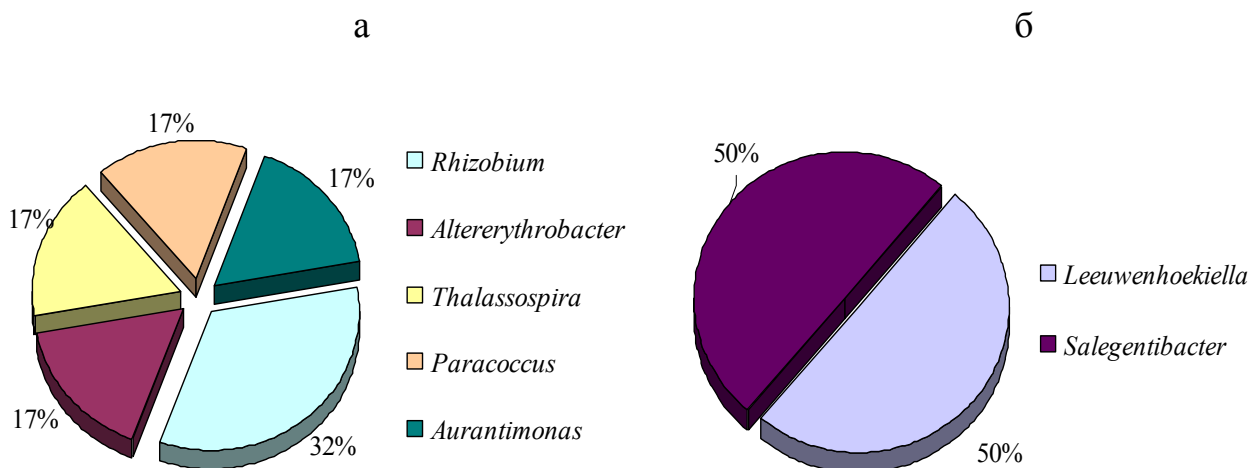


Рисунок 19. Относительное содержание различных филогенетических групп бактерий классов: (а) *Alphaproteobacteria*, (б) *Flavobacteriia* (процентное соотношение родов).

Следует отметить, что галофильные микроорганизмы были выделены как методом накопительного культивирования, так и методом прямого посева. В то время как галотолерантные бактерии в подавляющем большинстве были изолированы методом прямого посева на агаризованную БСР с содержанием NaCl 50 г/л. Наибольший видовой состав наблюдался в образцах ризосферы мятлика лугового, являющегося доминирующим видом в изучаемом районе. Численность изолированных бактерий в каждом образце составляла 10^6 - 10^7 кл/мл.

В образцах ризосферы были также выявлены бактерии, имеющие низкий уровень сходства по гену 16S рРНК (в пределах 96,7-97,8%) с известными видами родов *Alteromonas*, *Leeuwenhoekiella*, *Marinobacter*, *Rhizobium*, *Virgibacillus*, и являющиеся потенциальными представителями новых таксонов. Кроме того, бактерии, показавшие 98,0-98,9% сходства с типовыми штаммами узаконенных видов представляют значительный интерес для их дальнейшего и более подробного изучения.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК 12 штаммов бактерий, выделенных из ризосферы растений, произрастающих на засоленных почвах района соледобычи, депонированы в базе данных GenBank под номерами KF010924 - 28, KC992726 - 31, KC538827.

Ризосферная почва растения мятлика лугового, отобранная на расстоянии 1600 м от солеотвала СКПРУ-1 (контрольный вариант) содержала Na^+ в концентрации 0,02 мг-экв/100 г (что соответствует 4,6 мг/кг). Показано, что доминирующей группой бактерий в отобранных образцах являлись также представители класса *Gammaproteobacteria*, как и в засоленной почве, но 98,8% от общей численности составляли негалофильные бактерии рода *Pseudomonas*.

Таким образом, установлено, что техногенное засоление почвы в окрестностях предприятий ОАО «Уралкалий» оказывает сильное влияние на микробное сообщество ризосферной зоны растений, приводящее к доминированию галотолерантных и галофильных бактерий, а также к увеличению доли бактерий классов *Actinobacteria* и *Bacilli* в ризосферной зоне.

Глава 5. ГАЛОФИЛЬНЫЕ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ОТХОДОВ (ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ) КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА ОАО «УРАЛКАЛИЙ»

5.1 Культивируемые галотолерантные бактерии из техногенно-минеральных образований (шламохранилище БКПРУ-2, ОАО «Уралкалий»)

Методом прямого посева на агаризованную БСР (50 г/л NaCl) в чистую культуру из пяти образцов техногенно-минеральных образований (ТМО) было выделено 138 штаммов, которые, на основании морфологических особенностей колоний были объединены в 30 морфогрупп. Представители каждой группы были идентифицированы на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (таблица 15).

Таблица 15

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из образцов ТМО шламохранилища БКПРУ-2

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
BO 1	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T (Z37138)	99,9	800
BO 2	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669 ^T (X79186)	100	819
BO 3	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 ^T (ABRX01000007)	99,9	1426
BO 4	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 ^T (X60616)	99,3	908
BO 5	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 ^T (ACNF01000156)	100	915
BO 6	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T (AF234854)	99,9	935
BO 8	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	98,7	1401
BO 9	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 ^T (X79290)	99,8	904
BO 11	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,0	1434
BO 13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T (AB008509)	100	930
BO 13-34	<i>Desemzia incerta</i> DSM 20581 ^T (Y14650)	100	925
BO 141	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 ^T (AB021185)	100	722
BO 18	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T (AF234854)	100	923
BO 19	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T (X83408)	100	1233
BO 20	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 ^T (X79290)	99,9	887

**Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий,
выделенных из образцов ТМО шламохранилища БКПРУ-2**

BO 21	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T (X83408)	99,2	1388
BO 22	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,0	1438
BO 23	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,2	1404
BO 24	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,2	1421
BO 25	<i>Arthrobacter nicotianae</i> DSM 20123 ^T (X80739)	99,1	1387
BO 27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T (AB008509)	99,2	769
BO 28	<i>Paracoccus beibuensis</i> JLT1284 ^T (EU650196)	98,1	1330
BO 30	<i>Paracoccus beibuensis</i> JLT1284 ^T (EU650196)	98,2	1330
BO 32	<i>Pseudomonas monteilii</i> CIP 104883 ^T (AF064458)	99,5	927
BO 33	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 ^T (AB099708)	99,0	604
BO 34-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T (X83408)	100	1401
BO 34-2	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T (X83408)	100	1401
BO 35	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 ^T (X87756)	99,7	972
BO 37	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T (CP001628)	100	414
BO 38	<i>Streptomyces somaliensis</i> NBRC 12916 ^T (AB184243)	100	1392

Было установлено, что 39% изолированных штаммов являются представителями класса *Actinobacteria*, 27% – относятся к классу *Gammaproteobacteria*, 27% – к классу *Bacilli*, 7% – к классу *Alphaproteobacteria* (рисунок 20а).

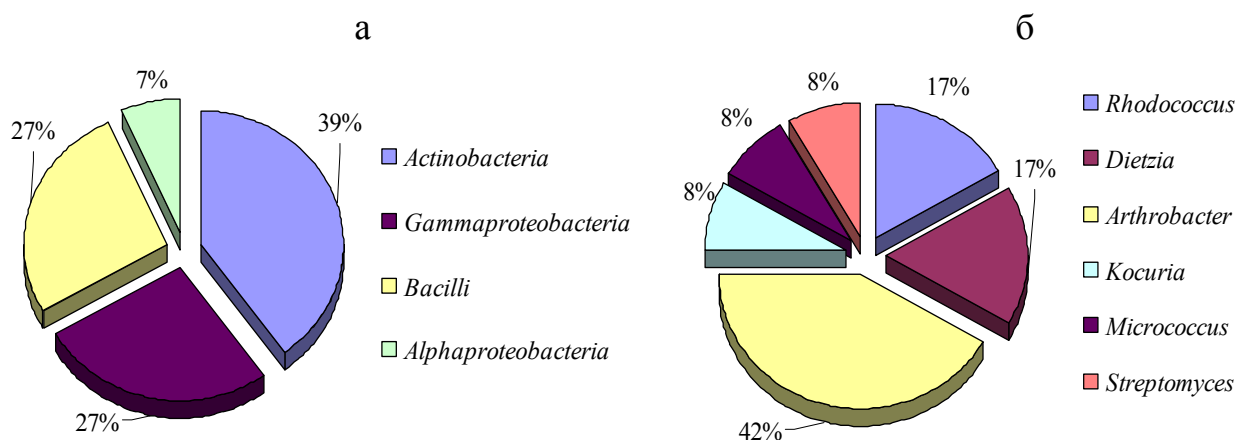


Рисунок 19. Относительное содержание различных филогенетических групп бактерии: (а) классов *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli* и *Actinobacteria*, (б) родов класса *Actinobacteria*.

Согласно полученным результатам, наибольшим многообразием характеризовались микроорганизмы класса *Actinobacteria*, среди которых доминирующее положение занимала группа бактерий рода *Arthrobacter* (42% от общего количества актинобактерий). Менее многочисленными были бактерии родов *Rhodococcus* и *Dietzia* (по 17% от общего числа), около 8% - родов *Kocuria*, *Micrococcus* и *Streptomyces* (рисунк 20б).

Все изолированные бактериальные культуры способны к росту на агаризованной среде как без добавления NaCl, так и с повышенной концентраций соли (до 100 г/л), т.е. являются галотолерантными организмами (Кашнер, 1981). Ряд изолятов рода *Bacillus* (штаммы BO3, BO6, BO18, BO33) были способны к росту в присутствии 150 г/л хлорида натрия (таблица 16).

Таблица 16

Рост бактерий в присутствии различных концентраций NaCl

[illegible]

Рост бактерий в присутствии различных концентраций NaCl

Штамм	Концентрация NaCl (г/л), среда БСР									
	Без NaCl	30	50	60	70	80	90	100	120	150
BO 27	+++	+++	+	–	–	–	–	–	–	–
BO 28	+++	+++	++	++	++	+	+	–	–	–
BO 30	+++	+++	+	+	–	–	–	–	–	–
BO 32	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
BO 33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
BO 34–1	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
BO 34–2	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
BO 35	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	–	–
BO 37	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	–
BO 38	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–

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

В результате изучения биodeградационных свойств изолированных бактерий было выявлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. BO1, *Bacillus* sp. BO4 и *Arthrobacter* sp. BO25 обладают наиболее широкой субстратной специфичностью и способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии такие ароматические углеводороды как нафталин, бифенил и *орто*-ФК (таблица 17). Другие бактериальные культуры показали менее активный рост на ароматических углеводородах и продуктах их разложения. Выявление бактерий, способных к деструкции подобных соединений, обусловлено тем, что в составе техногенно-минеральных образований присутствуют различные стойкие органические загрязнители (полиароматические соединения, фталаты, галогенсодержащие углеводороды) (Бачурин, Одинцова, 2009).

Рост бактерий на МСР (30 г/л NaCl) с различными ароматическими углеводородами

Штамм	Субстрат								
	Фенол	Бензол	Толуол	Наф.	Биф.	<i>орто</i> -ФК	БК	Сал.	ПГБК
ВО 1	+++	++	+	+++	++	+++	+	++	+++
ВО 2	—	+++	++	++	++	++	+	++	+++
ВО 3	+	+	+	+	+	++	+	+	+
ВО 4	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++
ВО 5	+	+	—	+	+	+	—	—	—
ВО 6	++	+	+	+	+	++	+	+	—
ВО 8	+	++	—	+	+	+	+	+	+
ВО 9	—	+	++	+	+	+++	+++	+	—
ВО 11	++	++	+	++	++	+++	+++	++	—
ВО 13	++	+	—	++	++	++	+	++	—
ВО 13-34	+	—	—	+	—	+	+	+	+
ВО 141	++	—	—	++	+++	+++	++	++	++
ВО 18	+	+	+	++	++	++	+	+	—
ВО 19	++	+	+	++	+	+++	++	++	++
ВО 20	++	++	+	+	+	—	+++	++	—
ВО 21	++	++	+	+	++	+	+++	++	++
ВО 22	++	++	—	+	++	++	+	++	+
ВО 23	+	++	—	++	++	—	+++	+	+
ВО 24	+	++	—	++	+	—	+++	++	+
ВО 25	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
ВО 27	++	++	+	+	+	+	+	+	+
ВО 28	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	+
ВО 30	+	+	+	+	+	+	—	+	+

Рост бактерий на МСР (30 г/л NaCl) с различными ароматическими углеводородами

Штамм	Субстрат								
	Фенол	Бензол	Толуол	Наф.	Биф.	<i>орто</i> -ФК	БК	Сал.	ПГБК
ВО 32	++	++	—	++	++	+	+	+	+++
ВО 33	++	+++	+	+	+	++	+	+	+
ВО 34-1	—	+	—	+	++	++	+	+	+++
ВО 34-2	+	+	—	+	++	++	++	+	+++
ВО 35	+++	++	++	++	++	++	+	+	+
ВО 37	+++	+	—	++	++	++	+	+	+
ВО 38	+++	+	—	++	++	++	+++	++	++

Примечание. «+» – слабый рост (ОП₆₀₀ 0,04-0,05); «++» – средний рост (ОП₆₀₀ 0,05-0,20); «+++» – хороший рост (ОП₆₀₀ 0,20-0,50); «—» – отсутствие роста бактерий; Наф. – нафталин; Биф. – бифенил; *орто*-ФК – *орто*-фталевая кислота; БК – бензойная кислота; Сал. – салициловая кислота; ПГБК – *пара*-гидроксibenзойная кислота.

5.2 Культивируемые галофильные бактерии из техногенно-минеральных образований (шламохранилище БКПРУ-2, ОАО «Уралкалий»)

Проведены исследования по выявлению галофильных бактерий из техногенно-минеральных образований при культивировании на среде АТСС 213 «*Halobacterium medium*» (200 г/л NaCl). Было изолировано 5 галофильных штаммов микроорганизмов (таблица 18). Морфология колоний изолятов ТС151, ТС161, ТС171, В181 представлена округлой формой светло-бежевого цвета с ровным краем, размером 0,5-1 мм, гладкой, блестящей поверхностью. Клетки вышеперечисленных штаммов – грамотрицательные, каталазоположительные, оксидазоотрицательные подвижные палочки. Изолят ТС141 характеризовался колониями округлой формы, размером 3-4 мм, блестящими, непрозрачными, темно-бежевого цвета с ровным краем, клетки его имели коккоидную форму.

Таблица 18

Штаммы бактерий, выделенные из ТМО шламохранилища (БКПРУ-2, ОАО «Уралкалий»)

Источник выделения	Концентрация ионов Na ⁺ , мг-экв/100 г	Обозначение штамма
Образец №220, шурф № 1, глубина 0,5 м	170	ТС141
Образец №219, шурф № 1, глубина 0,3 м	н.о.	ТС151
Образец №221, шурф № 2, глубина 0,2 м	22	ТС161
Образец №222, шурф № 3, глубина 0,2 м	137	ТС171
Образец №223, шурф № 2, глубина 0,4 м	150	ТС181

Примечание. «н.о.» – не определяли.

Штаммы ТС151, ТС171, ТС181 на основании анализа ВОХ-ПЦР отнесены к одной геномгруппе. Данные штаммы обладали гомологичными ДНК-профилями со штаммами ТС122 и ТС11 (рисунок 10, 21), изолированными из образцов каменной соли и сильвинита (СКПРУ-1, г. Соликамск). Генотипирование штамма ТС161 показало, что он имеет сходство со штаммом ТС31, выделенным из образца грунта около солеотвала СКПРУ-1 (рисунок 21). Изолят ТС141 имеет отличный от других гетерогенный ВОХ-профиль.

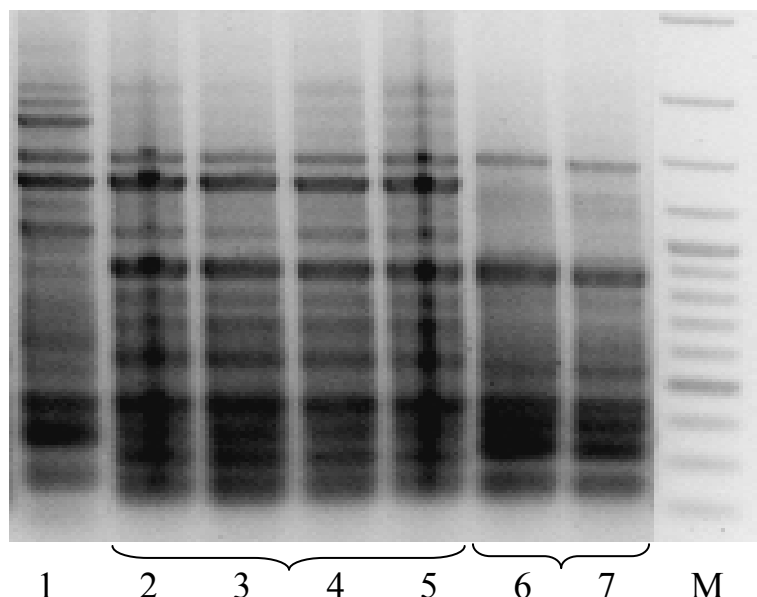


Рисунок 21. **BOX-ПЦР** профили бактерий, имеющих наибольшее сходство по гену 16S рРНК с типовым видом *Chromohalobacter canadensis*: 1 – типовой штамм *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T, 2 – TC122, 3 – TC151, 4 – TC171, 5 – TC181, 6 – TC31, 7 – TC161.

Филогенетический анализ (16S рДНК) изолятов показал, что все 5 штаммов являются представителями класса *Gammaproteobacteria*. Из них, четыре штамма проявили наибольшее сходство с бактериями рода *Chromohalobacter*. Штамм TC141 показал весьма низкий уровень сходства 16S рДНК с типовым штаммом рода *Salinisphaera* (93.5%). Похожие культуры были изолированы из образцов воды и донных отложений рассолосборника СКПРУ-2 (г. Соликамск, Пермский край) (см. глава 4.3)

Таблица 19

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из образцов ТМО шламохранилища БКПРУ-2

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
TC141	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T (EU740416)	93,5	743
TC151	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1248
TC161	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)	99,9	1402

Примечание. Цветом выделены штаммы, претендующие на описание в качестве новых таксонов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что бактерии рода *Chromohalobacter* обнаружены как в залежах солей Верхнекамского месторождения, так и в отходах производства, полученных после ряда технологических процессов получения калийных и магниевых солей. Более того, можно предположить, что в экосистеме района солеразработок распространена и функционирует одна бактериальная культура, близкородственная виду *Chromohalobacter canadensis*.

5.3 Культивируемые бактерии-деструкторы из техногенно-минеральных образований (шламохранилище БКПРУ-1, ОАО «Уралкалий»)

Из образцов техногенно-минеральных образований (ТМО) шламохранилища БКПРУ-1 ОАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край) методом накопительного культивирования на МСР с нафталином и *орто*-ФК выделено 28 штаммов бактерий, отличающихся морфологией колоний и клеток. Из НК с нафталином в качестве субстрата было выделено 20 штаммов микроорганизмов, различных по грампринадлежности, морфологии клеток и колоний, а из НК с *орто*-ФК – 8 штаммов (таблица 20).

Таблица 20

Бактерии из ТМО шламохранилища БКПРУ-2 (г. Березники)

Источник выделения	Выделенные штаммы
Субстрат выделения – нафталин (1 г/л)	
«Шлам 1»	КТ61, КТ631, КТ632, КТ721, КТ722, КТ723, КТ81, Т84, КТ921, КТ922, КТ93, РН11, РН12, РН13, РН14, РН22, РН23, РВ21
«Шлам 2»	КТ1.22, КТ1.311
Субстрат выделения – <i>орто</i>-ФК (1 г/л)	
«Шлам 1»	КТ112-7, КТ1131, КТ1132, КТ15412, РО11, РО12
«Шлам 2»	КТ1612, РО2

В составе подобных техногенно-минеральных образований присутствуют стойкие органические загрязнители (полициклические ароматические соединения, фталаты, галогенсодержащие углеводороды) (Бачурин, Одинцова, 2009).

Представители морфо/геномогрупп (15 штаммов) были идентифицированы на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Было установлено, что штаммы принадлежат к филумам «*Actinobacteria*», «*Proteobacteria*» и «*Firmicutes*» (таблица 21).

Таблица 21

Результаты филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерий, выделенных из образцов ТМО (БКПРУ-2, ОАО «Уралкалий»)

Штамм	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных GenBank	Сходство генов 16S рРНК, %	Кол-во нуклеотидов
KT1.22	<i>Gordonia terrae</i> DSM 43249 ^T (X79286)	99,9	1376
KT1.311	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	99,2	1442
KT631	<i>Rhodococcus erythropolis</i> NBCC 100887 ^T (X79289)	99,7	682
KT723	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T (Z37138).	99,7	669
KT921	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> DSM 43879 ^T (X83809)	99,2	495
KT922	<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6 ^T (DQ090961)	100	712
PN11	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886 ^T (AY501364)	99,2	482
PN13	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669 ^T (X79186)	100	915
PB21	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 ^T (AJ491806)	99,9	722
KT112-7	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 ^T (Z37138)	100	1400
KT1132	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 ^T (AJ277840)	100	600
KT1612	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 ^T (AB176954)	98,9	1428
PO2	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 ^T (AF483624)	99,6	1428
PO11	<i>Rhodococcus jostii</i> IFO 26295 ^T (AB046357)	99,5	1395
PO12	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669 ^T (X79186)	99,9	677

В результате сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК изолятов с таковыми типовых видов из баз данных GenBank и EzTaxon было установлено, что штаммы, выделенные из НК с нафталином в качестве субстрата, принадлежат к классам *Actinobacteria* и *Gamma proteobacteria*, при этом актинобактерии занимали доминирующее положение (89%) (рисунок 22а). Среди микроорганизмов класса *Actinobacteria* практически половина всех

изолятов была наиболее близка к представителям рода *Rhodococcus* (49%) (рисунок 22б). Согласно результатам филогенетического анализа в НК с *орто*-ФК большую часть (66%) также составляет группа актинобактерий (рисунок 22в), наиболее широко представленная бактериями рода *Rhodococcus* (рисунок 22г).

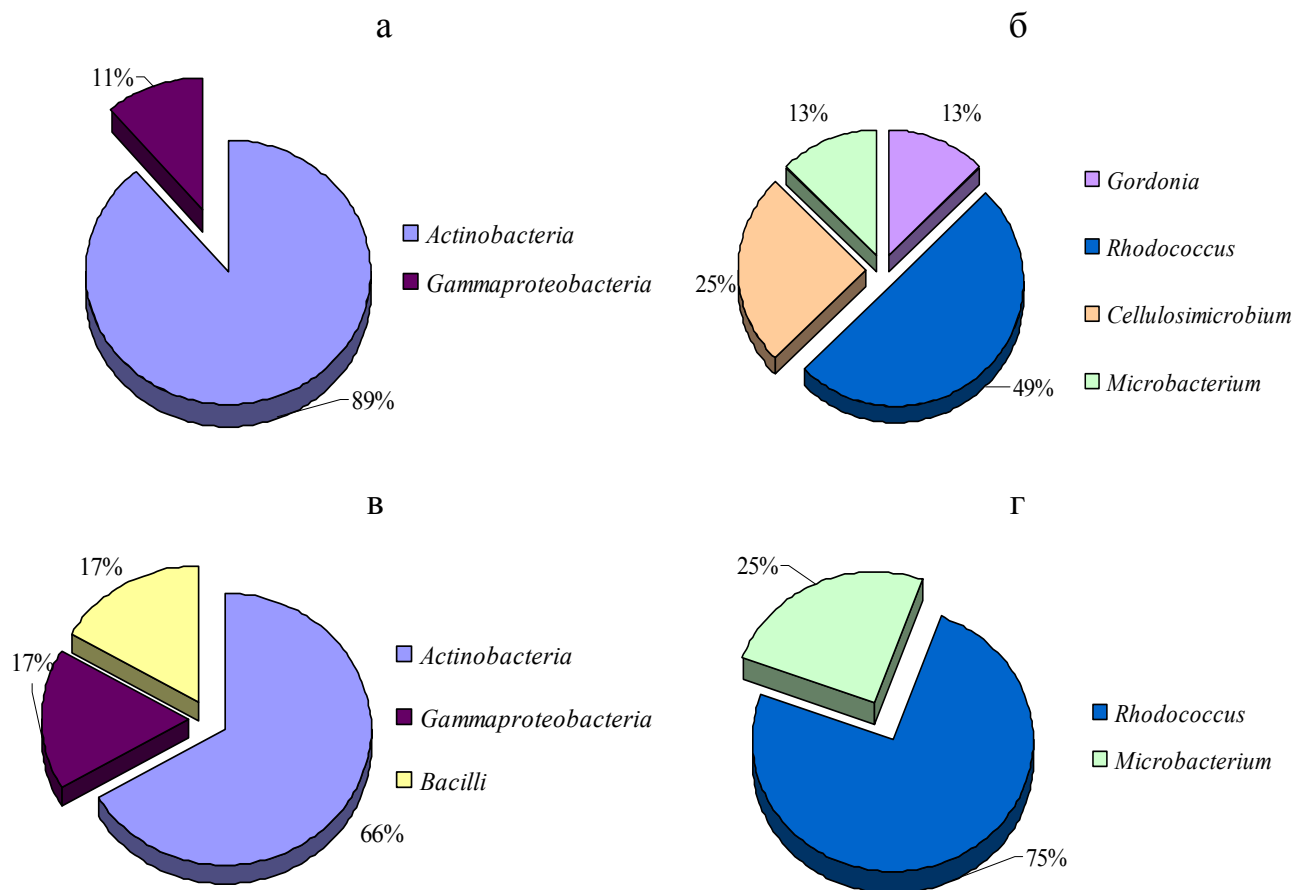


Рисунок 22. Относительное содержание филогенетических групп бактерий: (а) классов (*Actinobacteria* и *Gammaproteobacteria*) и (б) родов класса *Actinobacteria* в НК с нафталином, (в) классов (*Gammaproteobacteria*, *Bacilli* и *Actinobacteria*) и (г) родов класса *Actinobacteria* в НК с *орто*-ФК.

Большинство выделенных бактериальных штаммов способны к росту в диапазоне концентраций NaCl от 0 до 150 г/л и значениях pH 6,0-8,0. Штамм *Bacillus* sp. PO2 растет в щелочных условиях среды (pH 9,0). Большинство выделенных штаммов бактерий из НК с нафталином и *орто*-ФК обладали весьма широкой субстратной специфичностью (таблица 22). Один из этих штаммов – *Rhodococcus* sp. КТ112-7, обладающий широкой субстратной специфичностью в отношении различных моно(поли)ароматических соединений, был выбран для более подробного исследования.

Рост бактерий на МСР (30 г/л NaCl) с различными ароматическими углеводородами

Штамм	Субстрат										
	Бензол	Толуол	Фенол	Биф.	Наф.	БК	Сал.	Ген.	<i>орто</i> -ФК	ПГБК	ПКК
Штаммы выделены на нафталине											
КТ1.22	++	+	++	+++	+	+++	+	++	+	+	++
КТ1.311	++	+++	+	++	—	+	—	—	+	++	+
КТ631	+++	+++	+++	++	+	—	—	+	+	+	++
КТ723	+++	+++	+++	+++	++	+++	—	++	+++	++	+++
КТ921	++	+++	+++	+++	+	+	+	++	++	+++	+++
КТ922	++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++	+++	+++
PN11	+	++	++	++	+	—	—	+	++	+++	+++
PN13	+++	+++	++	+	++	—	—	++	++	+++	+++
PB21	++	++	++	+	—	—	—	—	++	+	+++
Штаммы выделены на <i>орто</i> -фталате											
КТ112-7	+++	++	+++	+++	+++	+++	—	+++	+++	+++	++
КТ1132	++	++	++	+	—	н.о	—	++	+	н.о	+++
КТ1612	++	+++	+++	+	+	+	—	—	+	+++	+++
PO2	++	+++	+++	+	+	+	+	—	++	+++	+++
PO11	++	++	+++	+	+	+++	+	++	++	+++	+++
PO12	+	++	++	—	—	+++	++	++	++	+++	++

Примечание. «н.о.» – не определяли. «+» – слабый рост (ОП₆₀₀ 0,04-0,05); «++» – средний рост (ОП₆₀₀ 0,05-0,20); «+++» – хороший рост (ОП₆₀₀ 0,20-0,50); «—» – отсутствие роста бактерий; Биф. – бифенил; Наф. – нафталин; БК – бензойная кислота; Сал. – салициловая кислота; Ген. – гентизиновая кислота; *орто*-ФК – *орто*-фталевая кислота; ПГБК – *пара*-гидроксибензойная кислота; ПКК – протокатеховая кислота.

5.4 Галотолерантный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 – деструктор моно(поли)ароматических углеводов

5.4.1 Идентификация и геномные исследования

Штамм KT112-7 (=VKM AC 2631D) выделен из ТМО БКПРУ-1 (г. Березники) методом накопительного культивирования на *орто*-фталате. При инкубировании в течение 3 суток на агаризованной БСР штамм KT112-7 образует округлые, матовые, светло-розовые колонии размером 1-3 мм. Клетки штамма грамположительные, неподвижные, не образуют спор, каталазоположительные, с трехстадийным морфогенетическим циклом развития. Штамм растет при температуре 10-45°C с оптимумом роста при 28°C. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма KT112-7, размером 1400 п.н., показал 100% сходство с аналогичным геном типового штамма *Rhodococcus wratislaviensis* NCIMB 13082^T (GenBank Z37138). На основании морфо-физиологических и молекулярно-генетических признаков на настоящем этапе работы штамм идентифицирован как *Rhodococcus wratislaviensis*.

Сравнение BOX-ПЦР фингерпринтов штамма KT112-7 и других штаммов рода *Rhodococcus*, выделенных из района солеразработок, показало его гетерогенность по минорным фрагментам (рисунок 23).

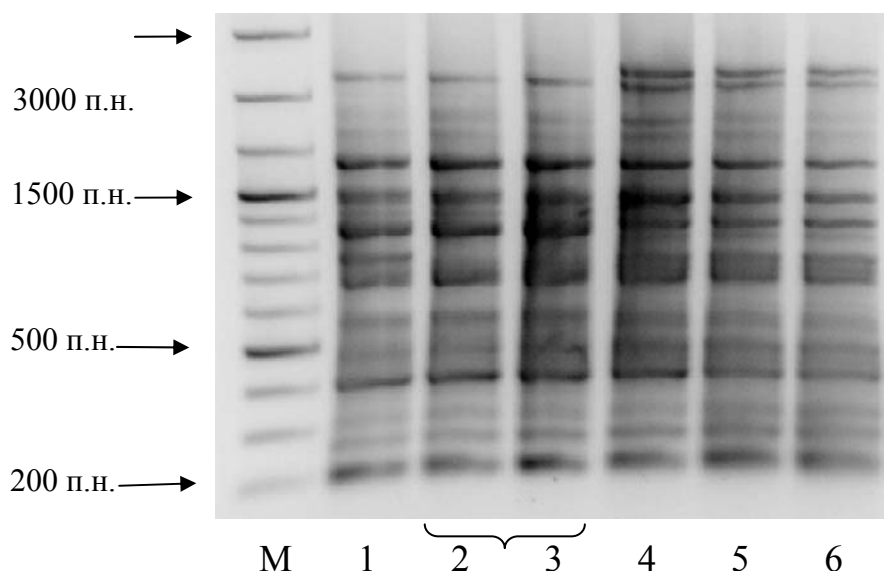


Рисунок 23. BOX-ПЦР профили бактерий рода *Rhodococcus*, выделенных из района солеразработок: М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – KT112-7, 2 – KT723, 3 – BO1, 4 – 9RN1-12, 5 – 9RN3-21, 6 – 9RN9-111.

В клетках штамма KT112-7, выращенных на БСР, методом пульс-электрофореза обнаружены плазмиды pKT1 (~470 т.п.н.) и pKT2 (~500 т.п.н.) (рисунок 24), сопоставимые по размеру с плазмидами pRHL2 (443 т.п.н.) и pRHL3 (332 т.п.н.) активного деструктора ароматических соединений *R. jostii* RHA1 (Vedler *et al.*, 2009). Стоит отметить, что плазмидный профиль штамма KT112-7 не изменялся при культивировании как в полноценной среде, так и на ароматических субстратах: бифенил, БК, *орто*-ФК (данные не показаны).

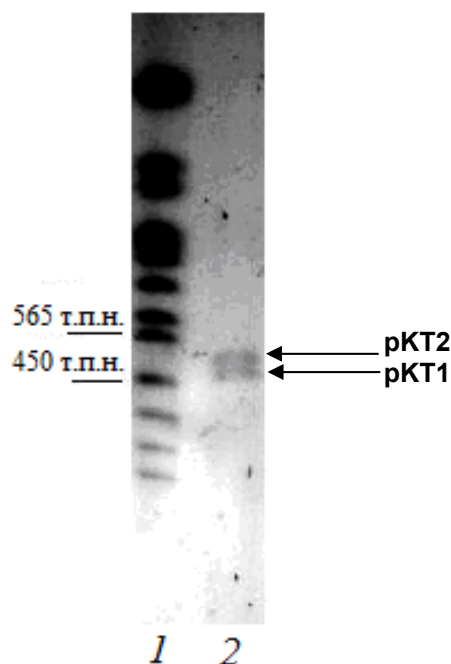


Рисунок 24. Электрофореграмма плазмидных ДНК штамма *R. wratislaviensis* KT112-7, выращенного на БСР: 1 – маркер молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США), 2 – плазмидные ДНК штамма KT112-7.

5.4.2 Деградиционная активность

Штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 обладает широкой субстратной специфичностью и способен расти на бензоле, толуоле, феноле, *орто*-ФК, БК, бифениле, нафталине, используя их в качестве единственного источника углерода и энергии (таблица 22).

При выращивании штамма в жидкой среде наиболее эффективный рост был отмечен при культивировании на *орто*-ФК, БК и бифениле (рисунок 25). Рост штамма при использовании в качестве субстрата *орто*-ФК и бифенила

наблюдался практически без подготовительной фазы роста, в то время как при выращивании культуры на нафталине или бензоле рост культуры начинался только через 168 и 237 ч, соответственно. Максимальная удельная скорость роста при культивировании на бифениле ($\mu=0,040\pm0,003\text{ч}^{-1}$), *орто*-ФК и БК ($\mu=0,050\pm0,004\text{ч}^{-1}$) незначительно отличалась от таковой при культивировании штамма на бензоле и нафталине ($\mu=0,030\pm0,007\text{ч}^{-1}$).

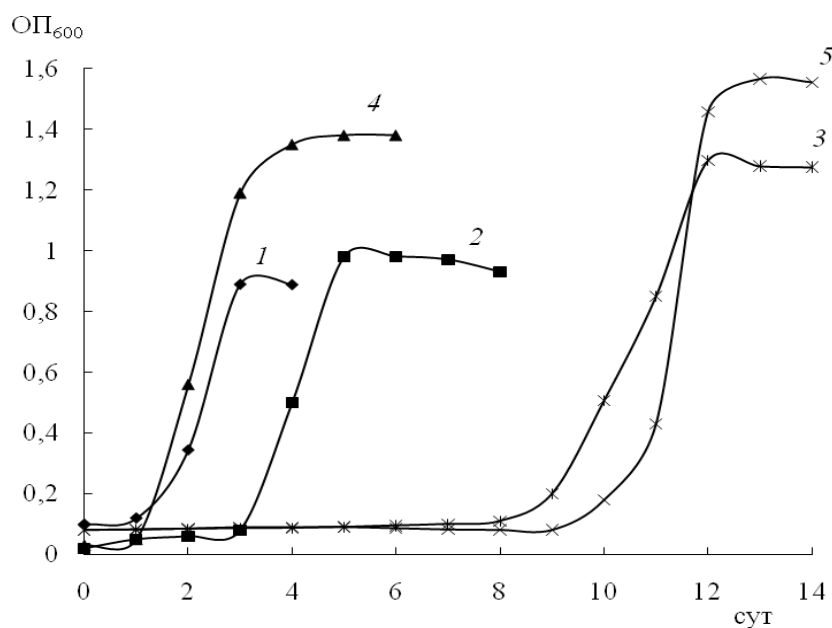


Рисунок 25. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на ароматических углеводородах: 1 – *орто*-ФК, 2 – БК, 3 – бензол, 4 – бифенил, 5 – нафталин.

Изучена способность *R. wratislaviensis* KT112-7 к росту при содержании высоких концентраций *орто*-ФК и БК в среде (рисунок 26). При выращивании штамма на 8 г/л *орто*-ФК или на 3,4 г/л БК зарегистрировано накопление биомассы ($\text{ОП}_{600}=2,2$). Однако характер роста культуры на данных субстратах отличался. Так, увеличение концентрации *орто*-ФК приводило к повышению максимальной удельной скорости роста (от $0,050\pm0,002$ до $0,070\pm0,003\text{ч}^{-1}$), снижению времени удвоения культуры (от $13,8\pm0,1$ до $9,6\pm0,1\text{ч}$) и практически не влияло на продолжительность подготовительной фазы роста. В отличие от ряда штаммов-деструкторов *орто*-ФК рода *Pseudomonas*, штамм KT112-7 рос при высоких концентрациях *орто*-ФК (до 8 г/л) (Murad *et al.*, 2007; Vamsee-Krishna *et al.*, 2006). При этом удельная скорость роста на сопоставимых концентрациях

субстрата у исследуемого штамма была в два раза ниже, что может быть обусловлено метаболическими и физиологическими особенностями псевдомонад и родококков. Повышение концентрации БК приводило к увеличению подготовительной фазы роста, а динамика изменения ростовых параметров имела противоположный характер, т.е. наибольшая удельная скорость роста при минимальной концентрации субстрата ($0,24 \pm 0,02 \text{ ч}^{-1}$).

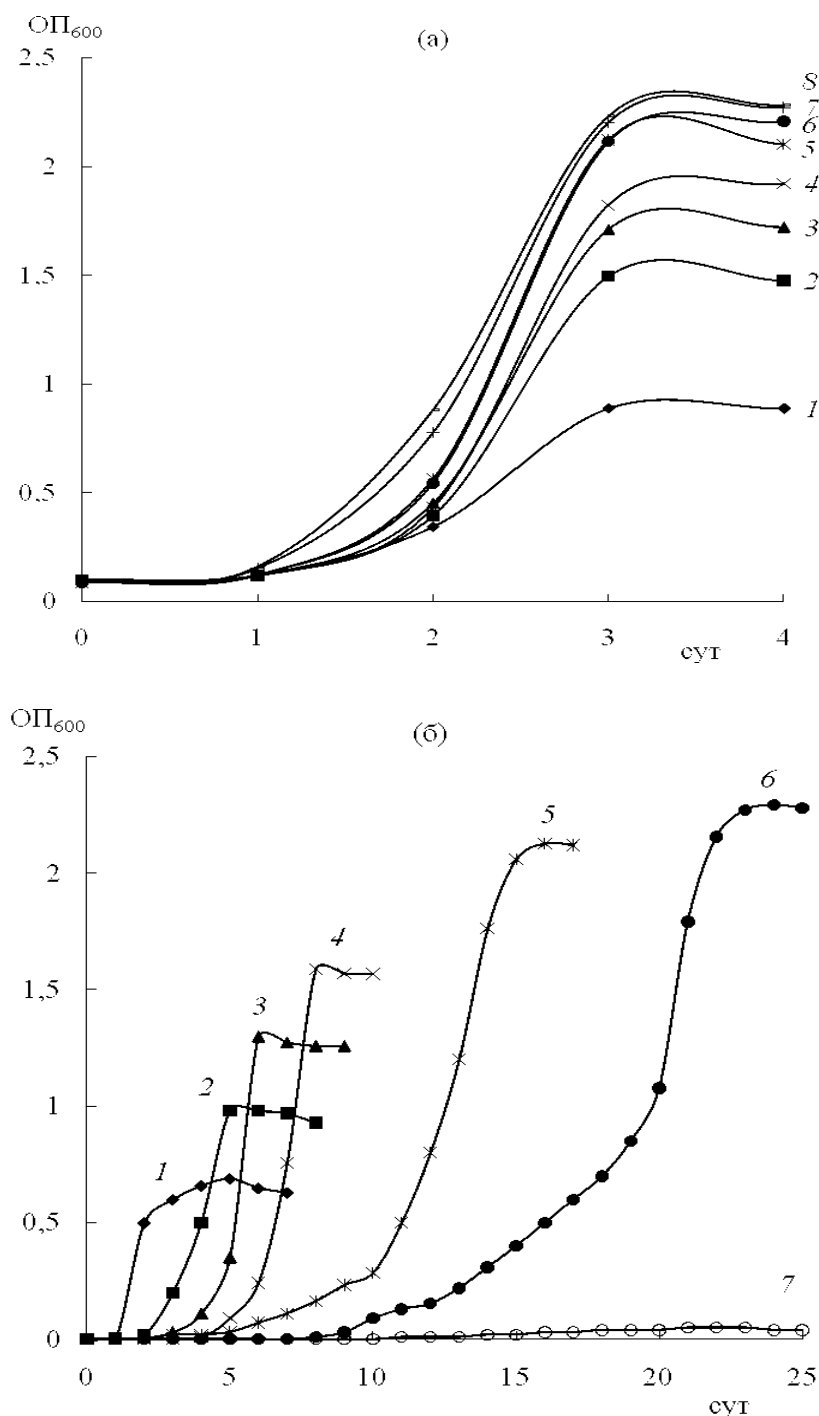


Рисунок 26. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на орто-ФК (а) и БК (б) (г/л): (а) 1 – 1, 2 – 2, 3 – 3, 4 – 4, 5 – 5, 6 – 6, 7 – 7, 8 – 8.

5.4.3 Деструкция ароматических углеводородов при разной солености среды

В МСР с *орто*-ФК в качестве единственного источника углерода и энергии штамм КТ112-7 способен к росту при содержании до 90 г/л NaCl (рисунок 27).

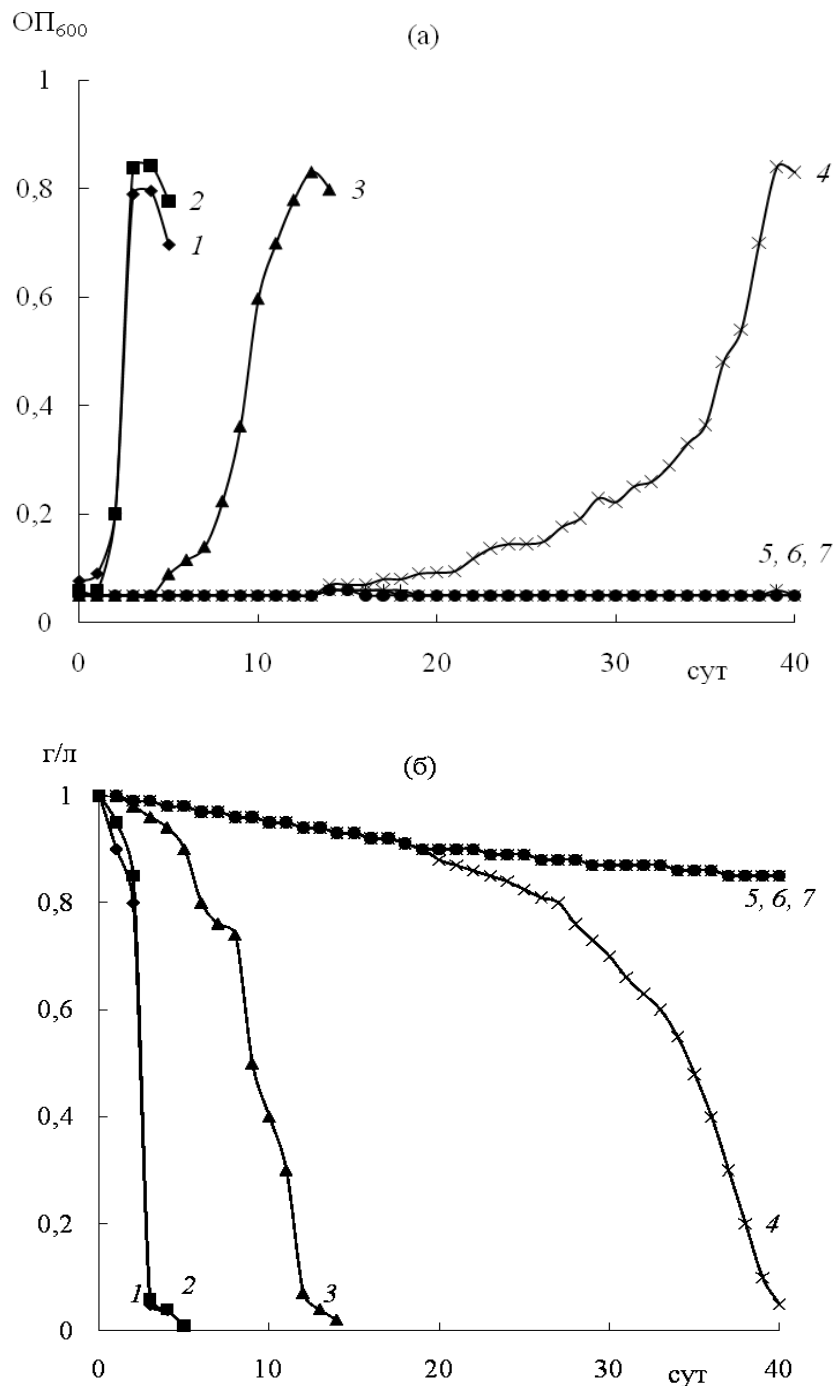


Рисунок 27. Рост штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в МСР на *орто*-ФК (а) и убыль субстрата (б) при различных концентрациях NaCl (г/л): 1 – 0, 2 – 30, 3 – 70, 4 – 90, 5 – 100, 6 – 110, 7 – 120.

Повышение концентрации соли в среде приводило к увеличению подготовительной фазы роста (24–480 ч), снижению максимальной удельной скорости роста (от $0,050 \pm 0,004$ до $0,006 \pm 0,001$ ч⁻¹), но практически не сказывалось на максимальной плотности культуры. Отмечена корреляционная зависимость между ростом культуры и снижением концентрации *орто*-ФК ($r = -0,92$).

Анализ культуральной среды в экспериментах с «отмытыми» клетками показал присутствие трех метаболитов разложения *орто*-ФК (таблица 23). С повышением содержания NaCl в среде отмечалось увеличение концентрации интермедиатов и снижение уровня деструкции субстрата.

Таблица 23

Разложение *орто*-ФК штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 при разной концентрации NaCl

NaCl, г/л	Время, ч	Деструкция, %	Метаболиты		
			3,4-ГФК*, ОП ₃₀₉ , ед,	ПКК**, мг/л	Пирокатехин, мг/л
0	2	$78,3 \pm 0,1$	0,372	н.д.***	н.д.
	24	$99,9 \pm 0,1$	0,374	н.д.	н.д.
30	2	$80,1 \pm 0,2$	0,336	н.д.	$26,5 \pm 0,2$
	24	$93,2 \pm 0,2$	0,371	$15,2 \pm 0,2$	$59,1 \pm 0,1$
50	2	$79,6 \pm 0,4$	0,315	н.д.	$41,9 \pm 0,1$
	24	$90,5 \pm 0,3$	0,377	$88,8 \pm 0,2$	$30,4 \pm 0,1$
60	2	$75,8 \pm 0,4$	0,421	$92,0 \pm 0,3$	$268,5 \pm 0,4$
	24	$86,6 \pm 0,3$	0,376	$66,9 \pm 0,1$	$167,6 \pm 0,3$

Примечание. *3,4-ГФК – 3,4-дигидроксифталевая кислота, **ПКК – протокатеховая кислота, ***н.д. – не детектировалось.

При культивировании штамма КТ112-7 в МСР с БК в качестве субстрата рост штамма наблюдался при содержании в среде до 75 г/л NaCl (рисунок 28). Подготовительная фаза роста была сопоставима с таковой при культивировании на *орто*-ФК при аналогичных концентрациях соли в среде. Повышение концентрации NaCl приводило к снижению максимальной оптической плотности культуры (ОП₆₀₀=0,65–0,45) и уменьшению максимальной удельной скорости роста (от $0,23 \pm 0,01$ до $0,040 \pm 0,005$ ч⁻¹). Рост штамма КТ112-7 сопровождался убылью субстрата ($r = -0,93$).

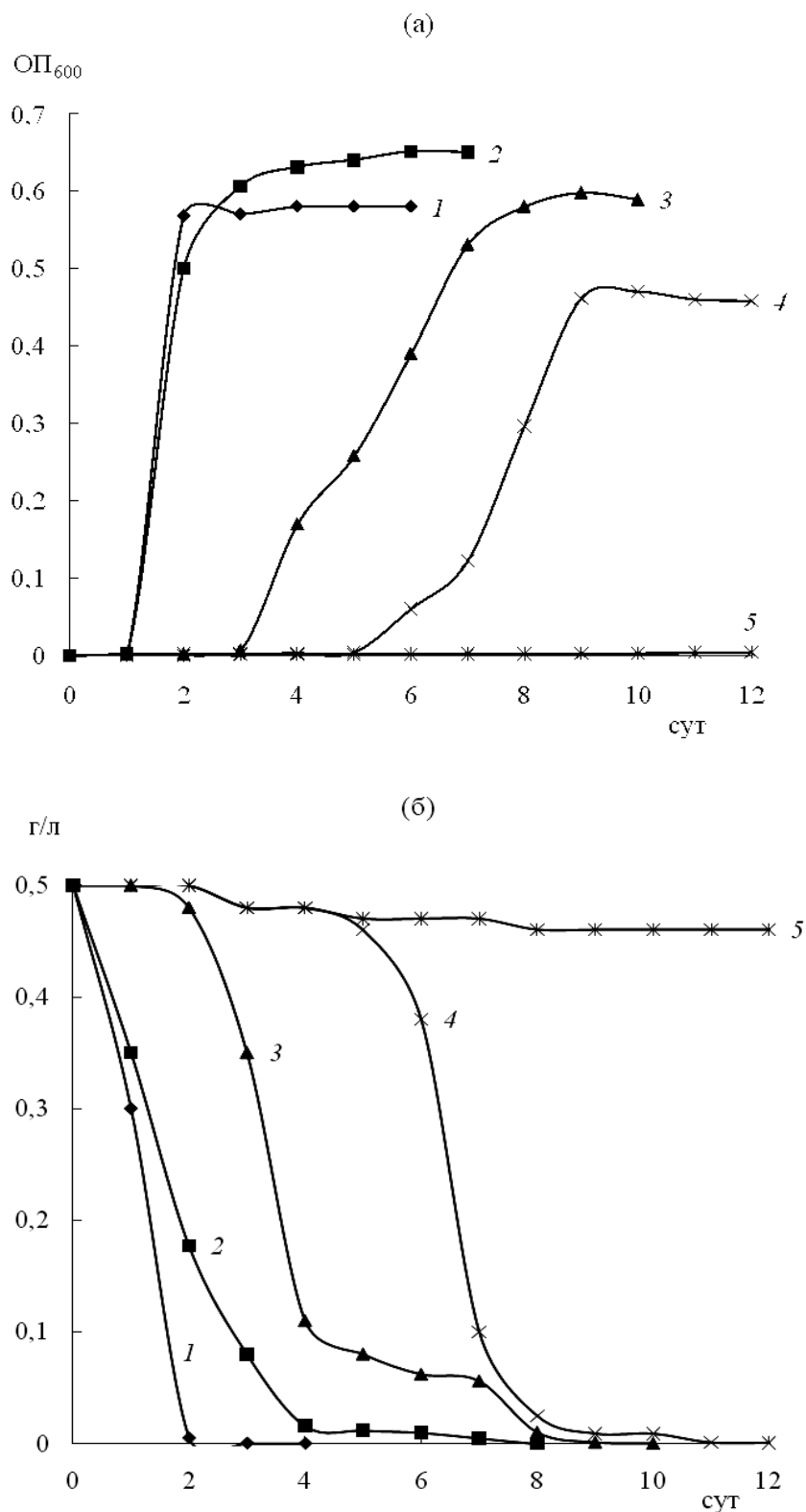


Рисунок 28. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на БК (а) и убыль субстрата (б) при различных концентрациях NaCl (г/л): 1 – 0, 2 – 30, 3 – 60, 4 – 75, 5 – 90.

Основные метаболиты деструкции БК штаммом KT112-7 установлены в опытах с «отмытыми» клетками (таблица 24). При высоком содержании хлорида

натрия (60 г/л) обнаружен только пирокатехин, в то время как при меньшей концентрации соли (30 и 50 г/л) и без NaCl в среде зафиксировано образование *пара*-гидроксибензойной, протокатеховой кислот и пирокатехина в качестве промежуточных соединений.

Таблица 24

**Разложение БК штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7
при разной концентрации NaCl**

NaCl, г/л	Время, ч	Деструкция, %	Метаболиты, мг/л		
			ПГБК*, мг/л	ПКК**, мг/л	Пирокатехин, мг/л
0	2	81,3 ± 0,3	27,7 ± 0,3	н.д.***	н.д.
	24	99,9 ± 0,1	5,4 ± 0,2	8,84 ± 0,4	2,3 ± 0,1
30	2	65,4 ± 0,2	14,2 ± 0,1	н.д.	52,7 ± 0,2
	24	92,3 ± 0,2	6,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2	27,5 ± 0,1
50	2	66,4 ± 0,4	27,1 ± 0,3	9,4 ± 0,2	71,4 ± 0,1
	24	87,3 ± 0,2	37,4 ± 0,2	15,5 ± 0,5	86,8 ± 0,2
60	2	62,0 ± 0,3	н.д.	н.д.	110,8 ± 0,4
	24	85,4 ± 0,4	н.д.	н.д.	136,1 ± 0,3

Примечание. *ПГБК – *пара*-гидроксибензойная кислота, **ПКК – протокатеховая кислота, ***н.д. – не детектировалось.

5.4.4 Функциональные гены деструкции ароматических соединений

В результате проведенной работы было показано, что при использовании праймеров к генам *benA*, *phtB* с тотальной ДНК штамма KT112-7 получены ампликоны, соответствующие по размеру фрагментам генов референтных нуклеотидных последовательностей (таблица 25, приложение 1).

Таблица 25

ПЦР-анализ функциональных генов штамма KT112-7

Ген (праймеры)	Фермент	Амплификация с ДНК штамма KT112-7
<i>benA</i> (<i>benA</i>)	Бензоат диоксигеназ (α - субъединица)	+ (521 п.н.)
<i>pcaH</i> (Pro3.4)	Протокатехоат 3,4-диоксигеназа (β -субъединица)	–
<i>phtAa</i> (<i>phtA</i>)	Фталат 3,4-диоксигеназа (α - субъединица)	–
<i>phtB</i> (<i>phtB</i>)	Фталат 3,4-дегидрогеназа	+ (445 п.н.)
<i>narAa</i> (GN1)	Нафталин 1,2-диоксигеназа (α - субъединица)	–

Примечание. «+» – наличие амплификации, «–» – отсутствие амплификации.

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *benA* показал, что наибольший уровень сходства (98%) наблюдался с аналогичными участками гена бензоат 1,2-диоксигеназы деструкторов ароматических соединений *R. jostii* RHA1 (GenBank AB055706.1) и *Rhodococcus* sp. DK17 (GenBank EU833983.1). Наибольший уровень сходства (97%) фрагмента гена *phtB* штамма KT112-7 отмечен с геном нафталин дигидродиол-дегидрогеназы штамма *Rhodococcus opacus* B4 (GenBank AP011117.1).

5.4.5 Метаболические пути деструкции *орто*-ФК и БК у штамма *R. wratislaviensis* KT112-7

Анализ соединений, образующихся при культивировании штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 на *орто*-ФК и БК (таблица 23, 24), а также анализ функциональных генов позволил представить вероятную схему метаболических путей деструкции данных соединений исследуемым штаммом (рисунок 28).

Известно, что разложение *орто*-ФК аэробными бактериями может осуществляться через стадию образования 3,4-дигидрокси- или 4,5-дигидроксифталевой кислоты, каждая из которых далее трансформируется до протокатеховой кислоты (ПКК) (Choi *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008). На основании анализа метаболитов (таблица 23) показано, что штамм KT112-7 осуществляет разложение *орто*-ФК через 3,4-дигидроксифталевою кислоту. Данное предположение подтверждает и тот факт, что в результате специфичной амплификации получен фрагмент гена *phtB*, кодирующего фталат 3,4-*цис*-дигидродиолдегидрогеназу. В ряде работ (Vamsee-Krishna *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008) описан путь трансформации *орто*-ФК, в котором ПКК, один из основных метаболитов, окисляется протокатехоат 3,4-диоксигеназой (ген *pcaH*) до 3-карбокси-*цис*,*цис*-муконовой кислоты. У исследуемого штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 отсутствовала специфичная амплификация гена *pcaH*, т.о. вопрос разложения ПКК требует дальнейшего изучения.

Интересный результат получен при анализе метаболического пути разложения БК штаммом KT112-7 (таблица 24). ВЭЖХ-анализ показал

присутствие в среде ПГБК, ПКК и пирокатехина. Предположительно, в штамме KT112-7 присутствуют два метаболических пути разложения бензоата и при высоком уровне осмотической нагрузки на клетки штамма активируется только классический путь трансформации БК (Borgne *et al.*, 2008; Solyanikova *et al.*, 2008) (рисунок 29, а). Известно, что окисление БК до пирокатехина осуществляется бензоат 1,2-диоксигеназой (ген *benA*). С ДНК исследуемого штамма амплифицирован фрагмент гена *benA*, характеризующийся высоким уровнем гомологии с геном бензоат 1,2-диоксигеназы известного деструктора *R. jostii* RHA1 (Vedler *et al.*, 2009). Анализ литературы и баз данных показал, что среди бактерий метаболический путь, при котором БК под действием бензоат 4-монооксигеназы окисляется до ПГБК, встречается крайне редко и описан для ряда штаммов рода *Pseudomonas* (Reddy, Vaidyanathan, 1976) и для штамма *Burkholderia* sp. 383 (GenBank CP 000152). Стоит отметить, что у штамма *Burkholderia* sp. 383 трансформация БК осуществляется последовательно путем образования ПГБК, ПКК и пирокатехина (<http://www.genome.jp>).

В результате проведенного исследования нами впервые для штаммов рода *Rhodococcus* предложен путь разложения БК через стадию образования ПГБК (рисунок 29, б). Окисление ПГБК до ПКК описано для широкого круга бактерий (Solyanikova *et al.*, 2008). Присутствие среди метаболитов ПКК и пирокатехина (таблица 24), а также тот факт, что у штамма KT112-7 отсутствовала специфичная амплификация с праймерами к гену протокатехоат 3,4-диоксигеназы, позволяет предположить, что трансформация ПКК происходит путем декарбоксилирования (<http://www.brenda-enzymes.info>).

Стоит отметить тот факт, что у штамма KT112-7 отсутствовала амплификация фрагмента гена *narAa*, детерминирующего начальные этапы деструкции нафталина (таблица 25). В тоже время изолят *R. wratislaviensis* KT112-7 способен к эффективному росту на данном соединении в качестве единственного источника углерода и энергии.

Подобное обстоятельство может свидетельствовать в пользу того, что деструкция нафталина исследуемым штаммом может идти путем, отличным от ранее описанных (Anan'ina *et al.*, 2011).

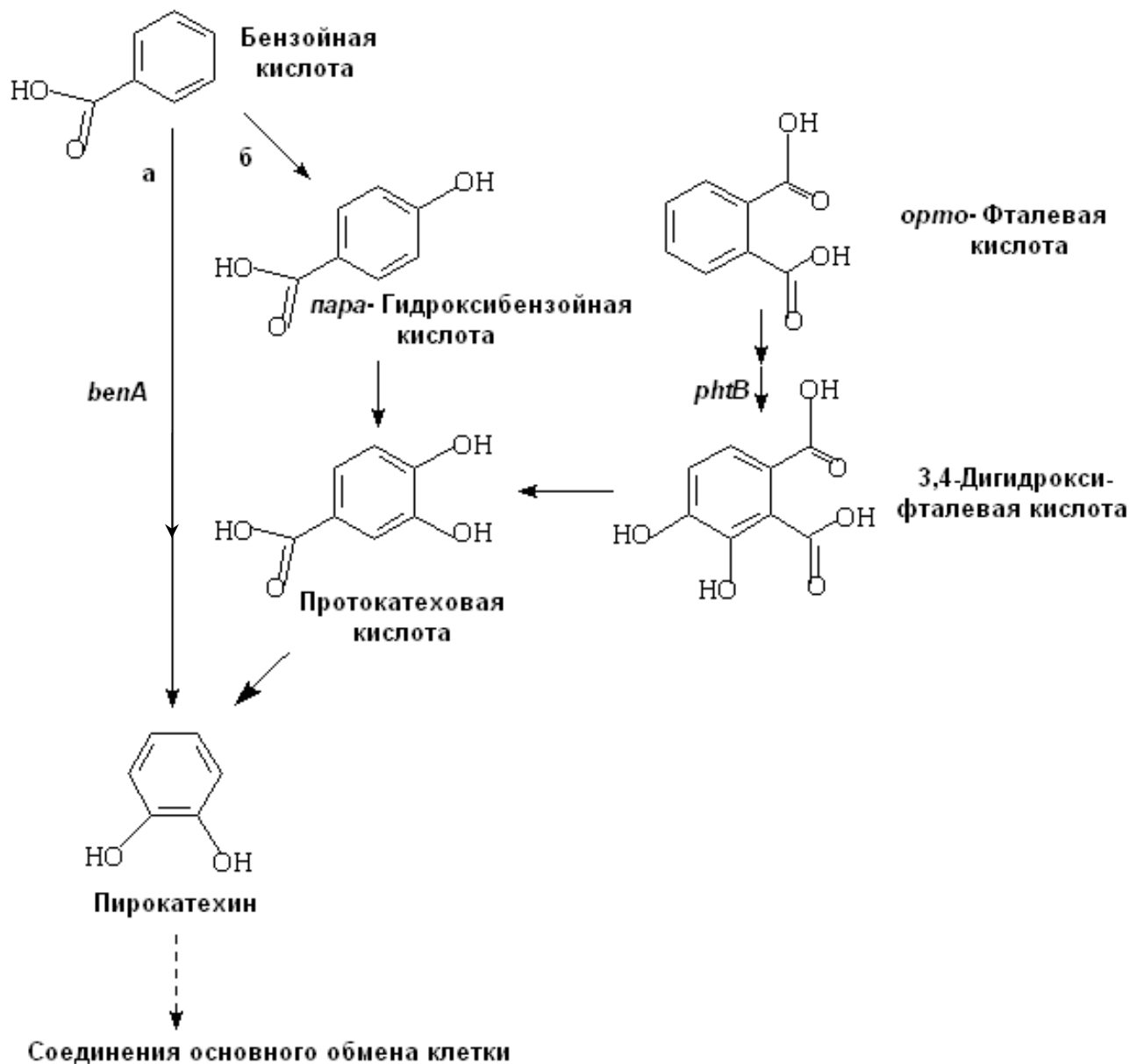


Рисунок 29. Предложенная схема метаболических путей разложения БК и *о-ФК* штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7.

Таким образом, галотолерантный штамм *R. wratislaviensis* KT112-7, выделенный из ТМО района промышленных разработок ВКМКС, обладает уникальным сочетанием путей разложения ароматических соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активная разработка Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей, как результат деятельности предприятий соледобычи ОАО «Уралкалий» приводит к накоплению значительного количества высокоминерализованных отходов производства в виде галитовых отвалов и глинисто-солевых шламов / ТМО, которые в свою очередь оказывают влияние на прилегающие к ним экотопы (Бабошко, Бачурин, 2009, Шубин, 2005). Подобные обстоятельства способствуют активному распространению солеустойчивых микроорганизмов в данном районе. Анализ литературных данных показал, что информация о галофильных бактериях, изолированных из природных солевых отложений, из солей, прошедших процесс технологической обработки, и из водных и наземных засоленных участках ВКМКС встречается в единичных исследованиях. Кроме того, территории ВКМКС подвержены комплексной нагрузке за счет не только повышенного уровня минерализации, но и воздействия стойких органических загрязнителей, в частности ароматических углеводородов и их производных, галогенуглеводородов и фталатов (Плотникова и др., 2001; Бачурин, Одинцова, 2009). Сложившиеся условия являются основой для формирования группы микроорганизмов устойчивых к высокому содержанию соли в среде и способных при этом проявлять биodeградационные свойства.

В настоящей работе было исследовано филогенетическое разнообразие и широкое распространение галофильных бактерий семейства *Halomonadaceae* в биотопах района промышленных солеразработок (приложение 2). Изоляты, которые на основании анализа гена 16S рРНК были отнесены к четырем родам семейства *Halomonadaceae* - *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Kushneria* и *Salinicola*, были выделены из образцов породы сильвинита и каменной соли, воды и донных отложений рассолосборников, соляной корки галитовых отвалов, грунта и почвы у подножья солеотвалов. Следует отметить, что наибольшим филогенетическим разнообразием характеризовались микробные сообщества почв, располагающихся в непосредственной близости от солеотвалов

(содержание ионов Na^+ 0,34-10,52 мг-экв/100г, соответствующее 78,2-2419,6 мг/кг). Из этих образцов были выделены преимущественно бактерии рода *Halomonas*, близкородственные видам *H. ventosae*, *H. alkaliphila*, *H. sulfidaeris*, *H. titanicae*, *H. neptunia*, *H. variabilis*, *H. boliviensis* и *H. taeanensis*. В меньшей степени были представлены изоляты родов *Salinicola* и *Kushneria*. Что характерно, представители рода *Salinicola* были выделены с территории БКПРУ-1 г. Березники Пермского края и описаны как новый род семейства *Halomonadaceae* с типовым штаммом *Salinicola socius* SMB35^T (Ананьина и др., 2007).

В образцах руд и минеральных отходов производства, характеризующихся высоким содержанием катионов Na^+ 170-1813 мг-экв/100г (39100-416990 мг/кг), были обнаружены галофильные бактерии рода *Chromohalobacter*, близкородственные видам *C. canadensis* и *C. japonicus*, для роста которых необходимо присутствие соли в среде (от 30 до 250 г/л NaCl) (Arahal, 2006). Изоляты, близкие виду *C. japonicus*, выделенные из разных биотопов (ТС101, ТС111, ТС112, ТС132 – сильвинит; ТС121 – каменная соль; ТС52, ТС512 – грунт возле солеотвала), характеризовались одинаковым набором ВОХ-ПЦР-продуктов и нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК.

Значительно большим генетическим разнообразием характеризовались изоляты, близкородственные *C. canadensis*. Выявлен генетический полиморфизм штаммов этого филогенетического кластера, выделенных из одного биотопа (галитовые отвалы, грунт возле солеотвала и дно стока рассолосборника). В то же время, в одну геномогруппу входили изоляты рода *Chromohalobacter* разных биотопов. Так, например, по результатам анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и сравнению профилей, полученных методом ДНК-типирования штаммы ТС11 (сильвинит), ТС122 (каменная соль) и штаммы ТС151, ТС171, ТС181 из шламохранилища (образцы ТМО) оказались идентичными. Также гомологичные ВОХ-профили имели штаммы ТС91 (галитовый отвал) и ТС32 (грунт у солеотвала), ТС31 (грунт у солеотвала) и ТС161 из шламохранилища (образец ТМО). Данное обстоятельство может

свидетельствовать, что галофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* изначально присутствовали в породе каменной соли и сильвинита, сформированной более 280 миллионов лет назад при высыхании древнего Пермского моря и занесения его осадочными породами, и, далее, сохраняются в галитовых отходах, получающихся в результате технологических обработок в процессе добычи минеральных солей. Вследствие растворения материала галитовых отвалов и выноса солей появляются зоны засоления в радиусе 1-5 м, создавая условия для существования галофильных бактерий.

Полученные данные указывают на присутствие бактерий семейства *Halomonadaceae* как в природных, так и техногенных высокоминерализованных экосистемах района соледобычи Пермского края и интересен тот факт, что данные микроорганизмы обнаружены на разных этапах технологической обработки калийно-магниевых солей.

Помимо изолированных галофильных бактерий (в частности, семейства *Halomonadaceae*) в исследуемых образцах была обнаружена значительная доля галотолерантных микроорганизмов, наибольшее филогенетическое разнообразие которых было представлено в образцах ризосферы растений, произрастающих в непосредственной близости от солеотвалов. После проведения анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК выделенных штаммов было обнаружено, что среди грамотрицательных прокариот присутствуют все те же бактерии семейства *Halomonadaceae* (а именно, родов *Kushneria*, *Halomonas* и *Salinicola*). В образцах растительной ризосферы была также обнаружена значительная доля галотолерантных бактерий классов *Gammaproteobacteria* (родов *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*), *Alphaproteobacteria* (родов *Rhizobium*, *Altererythrobacter*, *Paracoccus*), *Flavobacteria* (родов *Leeuwenhoekiella*, *Salegentibacter*). Кроме того, в исследованных образцах встречались бактерии порядка *Bacillales* (родов *Bacillus*, *Halobacillus*, *Planomicrobium*) и актинобактерии порядка *Actinomycetales* (родов *Isoptericola*, *Zhihengliuella*, *Nesterenkonia*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Janibacter*). Данный микробный состав существенно отличается от такового

наиболее типичной растительной ризосферы, в которой в большинстве случаев доминируют бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*).

Таким образом, техногенное засоление почвы в окрестностях соледобывающего предприятия ОАО «Уралкалий» оказывает сильное влияние на микробное сообщество ризосферной зоны растений, приводящее к доминированию галотолерантных и галофильных бактерий, а также к увеличению доли бактерий классов *Actinobacteria* и *Bacilli* в ризосферной зоне.

В результате проведенного исследования по поиску солеустойчивых бактерий-деструкторов стойких органических загрязнителей из образцов техногенно-минеральных образований были выделены чистые культуры микроорганизмов, которые при дальнейшем филогенетическом анализе проявили наибольшее сходство по гену 16S рРНК с представителями классов *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* и *Alphaproteobacteria*.

Активный штамм-деструктор ароматических углеводов *Rhodococcus wratislavenensis* KT112-7 (=BKM AC 2631D) был изучен более подробно. Установлено, что *R. wratislavenensis* KT112-7 осуществляет утилизацию высоких концентраций *орто*-фталевой кислоты (8 г/л), бензойной кислоты (3,4 г/л) и растет на *орто*-ФК и БК при содержании NaCl в среде культивирования до 75 г/л и 90 г/л соответственно. На основании анализа метаболического профиля и нуклеотидных последовательностей генов *benA* и *phtB* установлено, что штамм KT112-7 осуществляет разложение *орто*-ФК через стадии образования 3,4-дигидроксифталевой и протокатеховой кислот, разложение БК при низких концентрациях NaCl (до 50 г/л) через образование ПГБК с последующим ее окислением, а при высоких концентрациях NaCl (от 60 г/л) – путем прямого окисления бензойной кислоты до пирокатехина. Кроме того, данный штамм способен к деструкции бифенила и полихлорированных бифенилов, что было показано в исследованиях Егоровой Д.О. с коллегами (Егорова и др., 2013). Полученные результаты позволяют рекомендовать данный штамм для использования в биотехнологиях утилизации (трансформации) ароматических соединений в условиях повышенной минерализации.

ВЫВОДЫ

1. Выделено в чистую культуру, охарактеризовано и идентифицировано 157 штаммов аэробных бактерий из различных образцов района разработок Верхнекамского месторождения солей: ископаемых (подземных) соляных залежей и наземных техногенных объектов – отходов калийного производства, засоленной почвы, рассолосборников. На основании филогенетического анализа (ген 16S рРНК) бактерии были отнесены к 40 родам (более 120 видам), входящим в состав 24 семейств 4 филумов: «*Proteobacteria*», «*Actinobacteria*», «*Bacteroidetes*» и «*Firmicutes*». Выявлены потенциальные представители новых таксонов в составе классов *Flavobacteriia* и *Gammaproteobacteria*.

2. Показано повсеместное распространение на территории промышленных солеразработок Верхнекамского месторождения галофильных бактерий семейства *Halomonadaceae* (класс *Gammaproteobacteria*). Представители рода *Chromohalobacter* (сем. *Halomonadaceae*) доминировали в образцах руд (сильвинит, каменная соль) и в наземных высокоминерализованных образцах (галитовые отходы, донные отложения рассолосборников).

3. Установлено, что техногенное засоление почвы является определяющим фактором, влияющим на таксономический состав бактериального сообщества ризосферы растений, произрастающих в районе складирования отходов предприятия ОАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край): доминирующими группами являются галофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* (родов *Halomonas*, *Kushneria*, *Salinicola*) и галотолерантные бактерии класса *Actinobacteria* (родов *Brevibacterium*, *Isoptericola*, *Kocuria*, *Zhihengliuella*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Nesterenkonia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Salinibacterium*, *Janibacter*) и класса *Bacilli* (родов *Bacillus*, *Planomicrobium*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Oceanobacillus*).

4. В отходах (техногенно-минеральных образованиях) соледобывающего предприятия (г. Березники, Пермский край) преобладают галотолерантные бактерии родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus* (класс *Actinobacteria*), являющиеся деструкторами моно(поли)ароматических углеводов (нафталина, бифенила,

бензола, толуола, фенола, бензойной, *орто*-фталевой, *пара*-гидроксибензойной и протокатеховой кислот).

5. Галотолерантный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=VKM AC 2631D), выделенный из техногенно-минеральных образований, способен утилизировать нафталин, *орто*-фталевую и бензойную кислоты в присутствии повышенных концентраций хлорида натрия (50 г/л, 90 г/л и 75 г/л, соответственно).

6. Показано, что при разложении бензойной кислоты (БК) в условиях повышенной минерализации среды (концентрация NaCl выше 60 г/л) в клетках штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 активируются ферментные системы «классического» пути утилизации БК - через пирокатехин. При меньшем содержании соли в среде культивирования деструкция БК штаммом KT112-7 осуществляется через стадию образования *пара*-гидроксибензойной кислоты, такой путь разложения БК впервые выявлен у грамположительных бактерий.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

3,4-ГФК – 3,4-дигидроксифталевая кислота

БК – бензойная кислота

БСР – богатая среда Раймонда

ВКМКС – Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель электрофорез

КОЕ – количество колониеобразующих единиц

МСР – минеральная среда Раймонда

НК – накопительная культура

ОП – оптическая плотность

орто-ФК – *орто*-фталевая кислота

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПГБК – *пара*-гидроксибензойная кислота

ПКК – протокатеховая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОЗ – стойкие органические загрязнители

ТМО – техногенно-минеральные образования

ТПО – техногенные поверхностные образования

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ARDRA (amplified 16S rDNA restriction analysis) – рестрикционный анализ амплифицированных рибосомальных ДНК

BOX-ПЦР (polymerase chain reaction of repetitive BOX elements) – полимеразная цепная реакция повторяющихся BOX-элементов

REP-ПЦР (polymerase chain reaction of repetitive extragenic palindromic elements) – полимеразная цепная реакция повторяющихся экстрагенетических палиндромных последовательностей ДНК

TBE (tris-borate-EDTA buffer) – буфер трис-борат-ЭДТА

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтынцева, О.В. Галотолерантные бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводов: дис....канд. биол. наук: 03.00.07 / Алтынцева Ольга Викторовна. – Пермь, 2001. – 139 с.
2. Ананьина, Л.Н. Нафталинметаболизирующий консорциум микроорганизмов, выделенный из засоленной почвы: : дис....канд. биол. наук: 03.00.07 / Ананьина Людмила Николаевна. – Пермь, 2007. – 166 с.
3. Бабошко, А.Ю. Тяжелые металлы в отходах калийной промышленности / А.Ю. Бабошко, Б.А. Бачурин // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2009. – №5. – С. 369-376.
4. Бабошко, А.Ю. Физико-химические факторы формирования отходов флотации сильвинита / А.Ю. Бабошко, Б.А. Бачурин // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2011. – № 6. – С. 120-125.
5. Бабошко, А.Ю. Экологические проблемы Верхнекамского калия. / А.Ю. Бабошко, Б.А. Бачурин // Горное эхо Вестник горного института. – 2004. – № 4. – С. 44-47.
6. Бактериальная деструкция смеси, полученной при химической модификации полихлорированных бифенилов полиэтиленгликолями / Д.О. Егорова [и др.] // Биотехнология. – 2013. – № 4. – С. 56-64.
7. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок / Е.Г. Плотникова [и др.] // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 61-69.
8. Бачурин, Б.А. Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов / Б.А. Бачурин, Т.А. Одинцова. // Горный информационно-аналитический бюллетень. – 2009. – № 7. – С. 374-380.
9. Белкин, В.В. Состояние геологической среды Верхнекамского соленосного бассейна / В.В. Белкин // Разведка и охрана недр. – 2008. – № 8. – С. 77-82.

10. Бердичевская, М.В. Особенности физиологии родококков разрабатываемых нефтяных залежей / М.В. Бердичевская // Микробиология. – 1989. – Т. 58, № 1. – С. 60-65.
11. Боронин, А.М. Клонирование генов *Pseudomonas putida*, ответственных за первые этапы окисления нафталина в клетки *Escherichia coli* / А.М. Боронин, Т.В. Цой, И.А. Кошелева // Генетика. – 1989. – Т. 25, № 2. – С. 226-237.
12. Верхнекамское месторождение калийно-магниевых солей [Электронный ресурс]: – Сектор информационных систем ОАО «Галургия». – Режим доступа: http://www.berezniki-gaz.narod.ru/31102006/karta100_green.pdf (20.01.2014).
13. Взаимосвязь кинетики роста и дыхания у родококков в присутствии высоких концентраций солей / В.К. Плакунов [и др.] // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 1. – С. 40-44.
14. Влияние солености среды на деструкцию нефтяных масел нокардиоподобными бактериями / И.С. Звягинцева [и др.] // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 759-764.
15. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* – деструкторы полициклических ароматических углеводов / Е.Г. Плотникова [и др.] // Экология. – 2011. – № 6. – С. 459-466.
16. Демченко, М.М. Ризосферные микроорганизмы в системе почва-растение / М.М. Демченко // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. – 2008. – Т. 3, № 11. – С. 15-18.
17. Деткова, Е.Н. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий: роль осморегуляторов и возможности их практического применения / Е.Н. Деткова, Ю.В. Болтянская // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 5. – С. 581-593.
18. Ерёмченко, О.З. Почвенно-экологические условия зоны солеотвалов и адаптация к ним растений / О.З. Ерёмченко, О.А. Лымарь // Экология. – 2007. – № 1. – С. 18-23.

19. Звягинцев, Д.Г. Растения как центры формирования бактериальных сообществ / Д.Г. Звягинцев, Т.Г. Добровольская, Л.В. Лысак // Журнал общей биологии. – 1993. – Т. 54, № 2. – С. 183-199.
20. Калакуцкий, Л.В. Актиномицеты и высшие растения / Л.В. Калакуцкий, Л.С. Шарая // Успехи микробиологии. – 1990. – Т. 24. – С. 26-65.
21. Кашнер, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях // Д. Кашнер. – М.: Мир, 1981. – 365 с.
22. Косков, Б.В. О корреляции разнофациальных толщ по данным ГИС / Б.В. Косков, А.И. Сулима // ПермНИПИнефть. – 2000.
23. Кулакова, А.Н. Мутанты плазмид биodeградации нафталина, детерминирующие окисление катехола по *мета*-пути / А.Н. Кулакова, А.М. Боронин // Микробиология. – 1989. – Т. 25, №2. – С. 298-304.
24. Кусакина, М.Г. Влияние техногенного засоления на некоторые биохимические показатели растений, произрастающих в зоне солеотвалов / М.Г. Кусакина, О.З. Еремченко, О.А. Четина // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2013. – Т. 1. – С. 18-22.
25. Лымарь, О.А. Деградация почвенно-растительного покрова в зоне воздействия солеотвалов / О.А. Лымарь, О.З. Ерёмченко // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 4. – С. 35-36.
26. Методы общей бактериологии: Пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардт [и др.] – М.: Мир, 1983. – Том 1, 2, 3.
27. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов [и др.] – М.: Академия, 2005. – 608 с.
28. Окисление углеводов нефти экстремально галофильными архебактериями / И.С. Куличевская [и др.] // Микробиология. – 1991. – Т. 60, № 5. – С. 860-866.
29. Проворов Н.А. Растительно-микробные симбиозы как эволюционный континуум / Н.А. Проворов // Журнал общей биологии. – 2009. – Т. 70, № 1. – С. 10-34.

30. Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоконверсии штаммом *Rhodococcus* sp. B7a / Д.О. Егорова [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. – Т. 46, № 6. – С. 644-650.
31. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* / Т.Ю. Измалкова [и др.] // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 70-78.
32. Реутских, Е.М. *Exiguobacterium* sp. RS34 – галоалкалотолерантная факультативно анаэробная неспорообразующая бактерия порядка *Bacillales* из шламохранилища калийного рудника / Е.М. Реутских, А.И. Саралов // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2012. – № 3. – С. 49-53.
33. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова // – Киев: Наук. думка, 1990. – 234 с.
34. Старовойтов, И.И. Регуляция синтеза ключевых ферментов катаболизма нафталина у *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens*, несущих плазмиды биodeградации НАН, pBS2 и NPL-1 / И.И. Старовойтов // Микробиология. – 1985. – Т. 54. – С. 755-762.
35. Структурная и функциональная вариабельность генетических систем катаболизма полициклических ароматических углеводов у штаммов *Pseudomonas putida* / И.А. Кошелева [и др.] // Генетика . – 2003. – Т. 39, № 9. – С. 1185-1192 .
36. Три новых вида бревибактерий – *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. и *Brevibacterium permense* sp. nov. / Е.Ю. Гавриш [и др.] // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 2. – С. 218-225.
37. Углекислородфиксирующая микрофлора заводняемых нефтяных месторождений Татарии с различной минерализацией пластовых вод / Е.И. Милехина [и др.] // Микробиология. – 1991. – Т. 60, № 4. – С. 747-755.
38. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья / Е. Г. Плотникова [и др.] // Экология. – 2006. – № 4. – С. 261-268.

39. Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 – деструктор фенантрена и нафталина / Н.В. Балашова [и др.] // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 4. – С. 488-493.

40. Шубин, А.А. Решение экологических проблем на заключительной стадии функционирования горного предприятия / А.А. Шубин // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2005. – № 11. – С. 168-173.

41. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение / Е. В. Морозкина [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 5-20.

42. Юрчак, Л.Д. Микрофлора и аллелопатические способности растений семейства крестоцветных / Л.Д. Юрчак, Ю.А. Утеуш, Т.В. Омельченко // Взаимодействие растений и микроорганизмов в фитоценозах. – Киев: Наук. думка, 1977. – С. 161-167.

43. Ястребова, О.В. Бактерии рода *Bacillus*, выделенные из почв района солеразработок / О.В. Ястребова, Л.Н. Ананьина, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2008. – № 9. – С. 58-62.

44. *Arhodomonas recens* sp. nov. – умеренно галофильная гаммапротеобактерия из рассолов флотационного обогащения калийных минералов / А.И. Саралов [и др.] // Микробиология. – 2012а. – Т. 81, № 5. – С. 630-637.

45. *Halarchaeum solikamskense* sp. nov. – термо-толерантный нейтрофильный галоархаеон из пенных продуктов флотационного обогащения калийных минералов / А.И. Саралов [и др.] // Микробиология. – 2012б. – Т.81, №5. – С. 638-644.

46. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov. – умеренно галофильная бактерия из ассоциации микроорганизмов, утилизирующей нафталин / Л.Н. Ананьина [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 3. – С. 369-376.

47. *Streptomyces albiacalis* sp. nov.; новый деградирующий углеводороды нефти вид термо- и галотолерантных *Streptomyces* / В.Д. Кузнецов [и др.] // Микробиология. – 1992. – Т. 61. – С. 62-67.
48. 16S rRNA gene sequence analysis of halophilic and halotolerant bacteria isolated from a hypersaline pond in Sichuan, China / J. Tang [et al.] // Ann. Microbiol. – 2011. – V. 61. – P. 375-381.
49. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming / R. Marasco [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V. 10, № 7. – P. 1-14.
50. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2 / S.L. Fuenmayor [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180 – P. 2522-2530.
51. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent / K. Manoj [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 23. – P. 211-220.
52. A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus* / A. Zaar [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 27. – P. 24997-25004.
53. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene / M. Luz [et al.] // Microbiology. – 1997. – V. 143. – P. 2975-2981.
54. Agency for toxic substances and disease registry [Электронный ресурс]: information about harmful exposures and diseases related to toxic substances.– Режим доступа: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.html> (20.08.2013).
55. Aislabie, J. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott base, Antarctica / J. Aislabie, J. Foght, D. Saul // Polar. Biol. – 2000. – V. 23. – P. 183-188.
56. Alva, V.A. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity / V.A. Alva, B.M. Peyton // Environ. Sci. Technol. – 2003. – V. 37. – P. 4397-4402.

57. Arahal, D.R. The family *Halomonadaceae* // The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt // New York.: Springer, 2006. – V. 6. – P. 811-835.
58. Ashok, B.T. Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery / B.T. Ashok, S. Saxena, J. Musarrat // Lett. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 21. – P. 246-248.
59. ATCC medium: 213 «*Halobacterium* medium» [Электронный ресурс]: microbial media of private biological resource center ATCC – Режим доступа: <https://www.atcc.org/~media/2DB3DC353ECE44A6BDB7CA5965614347.ashx> (20.01.2014).
60. *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and *m*-hydroxybenzoate / I. Yumoto [*et al.*] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 1531-1536.
61. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment / R.D. Stapleton [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 1998.–V. 64. – P. 4180-4184.
62. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium / J.C. Bertrand [*et al.*] // Lett. Appl. Microbiol. – 1990. – V. 11. – P. 260-263.
63. Borgne, S. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea / S. Le Borgne, D. Paniagua, R. Vazquez-Duhalt // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 15. – P. 74–92.
64. Bosch, R. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10 / R. Bosch, E.R.B. Moore, E. Garcia-Valdes // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181. – P. 2315-2322.
65. BRENDA [Электронный ресурс]: The main collection of enzyme functional data available to the scientific community. – Режим доступа: <http://www.brenda-enzymes.info> (20.01.2014).
66. Carvalho, C.C.C.R. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 /

C.C.C.R. de Carvalho, M. Manuela, R. da Fonseca // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 51. – P. 389-399.

67. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence / M.A. Patrauchan, [et al.] // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187 (12). – P. 4050-4063.

68. Characterization of halophilic bacteria from environmental samples from the brackish water of Pulicat Lake, India / H. Sahay [et al.] // Biologia. – 2011. – V. 66 (5). – P. 741-747.

69. Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil / P.Di Gennaro [et al.] // Res. Microbiol. – 2001. – V. 152. – P. 641-651.

70. *Chromohalobacter nigrandesensis* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-negative bacterium isolated from Lake Tebenquiche on the Atacama Saltern, Chile / B. Prado [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – V. 56. – P. 647-651.

71. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174 / D.R. Arahal [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001b. – V. 51. – P. 1457-1462.

72. *Chromohalobacter sarecensis* sp. nov., a psychrotolerant moderate halophile isolated from the saline Andean region of Bolivia / J. Quillaguaman [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1921-1926.

73. Chung, W. K. Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloederans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. / W. K. Chung, G. M. King // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – P. 5585–5592.

74. Classification of «*Chromobacterium marismortui*» in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. / A. Ventosa [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1989. – V. 39. – P. 382-386.

75. Cloning and characterization of a novel *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene (*narB*) from *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 / L.A. Kulakov [*et al.*] // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – V. 182. – P. 327-331.
76. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents / G. Baggi [*et al.*] // Int. Biodeter. Biodegrad. – 2008. – V. 62, № 1. – P. 57-64.
77. Community of extremely halophilic bacteria in historic Dagong brine well in southwestern China / W.L. Xiang [*et al.*] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 24. – P. 2297-2305.
78. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments / S.E. Dyksterhouse [*et al.*] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – V. 45. – P. 116-123.
79. Dagley, S. The bacterial degradation of catechol / S. Dagley, D.T. Gibson // Biochem. Journal. – 1965. – V. 95. – P. 466-474.
80. Defrank, J.J. Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate / J.J. Defrank, T.C. Cheng // J. Bacteriol. – 1991. – P. 1938-1943.
81. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes / C. Sanchez-Porro [*et al.*] // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 94, № 2. – P. 295-300.
82. Eaton, R.W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B / R.W. Eaton // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183, № 12. – P. 3689-3703.
83. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments / A.D. Geiselbrecht [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – P. 3344-3349.
84. EzTaxon [Электронный ресурс]: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. – Режим доступа: <http://www.eztaxon.org> (26.08.2013).

85. Franzmann, P.D. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya* / P.D. Franzmann, U. Wehmeyer, E. Stackebrandt // Syst. Appl. Microbiol. – 1988. – V. 11. – P. 16–19.
86. García, M.T. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria / M.T. García, A. Ventosa, E. Mellado // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 54, № 1. – P. 97-109.
87. Garrity, G.M. Class III. *Gammaproteobacteria* class. nov. / G.M. Garrity, J.A. Bell, T. Lilburn // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Eds. D.J. Brenner [et al.] 2nd edn. – New York.: Springer, 2005. – V. 1.
88. GenomeNet Database Resources [Электронный ресурс]: Japanese network of database and computational services for genome research and related research areas in biomedical sciences. – Режим доступа: <http://www.genome.jp> (11.02.2013).
89. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic [et al.] // Meth. Cell. Mol. Biol. – 1994. – V. 5. – P.25-40.
90. Genus *Idiomarina* [Электронный ресурс]: Database of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. – Режим доступа: <http://www.bacterio.net/idiomarina.html> (20.01.2014).
91. Grund E. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4 / E. Grund, B. Denecke, R. Eichenlaub // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – V. 58. – P. 1874-1877.
92. *Haloferax* sp. D 1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds / D. Emerson [et al.] // Arch. Microbiol. – 1994. – V. 161. – P. 445-452.
93. *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest / I. Llamas [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2006. – V. 89 (3-4). – P. 395-403.
94. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds / M.T. García [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1723-1728.

95. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium / M.J. Martinez-Canovas [*et al.*] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 733-777.
96. *Halomonas zhaodongensis* sp. nov., a slightly halophilic bacterium isolated from saline-alkaline soils in Zhaodong, China / J. Jiang [*et al.*] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2013. [Epub ahead of print].
97. Halophiles – taxonomy, diversity, physiology and applications. In: T. Satyanarayana, Anil Prakash, Bhavdish Narain Johri. Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment / P.P. Kanekar [*et al.*] // Springer. – 2012. – P. 1-34.
98. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the great salt plains of Oklahoma / T.M. Caton [*et al.*] // Microbial Ecology. – 2004. – V. 48. – P. 449-462.
99. Hardwood, C.S. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity / C.S. Hardwood, R.E. Parales // Ann. Rev. Microbiol. – 1996. – V. 50. – P. 553-590.
100. Hedi, A. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions / A. Hedi, N. Sadfi, M.L. Fardeau // Int. J. Microbiol. – 2009. – 17 p.
101. Hedlund, B.P. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium / B.P. Hedlund, J.T. Staley // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51. – P. 61-66.
102. Hinteregger, C. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water / C. Hinteregger, F. Streichsbier // Biotechnol. Lett. – 1997. – V. 19. – P. 1099-1102.
103. Holman, H.Y.N. Mineralization of sparsely water-soluble polycyclic aromatic hydrocarbons in a water table fluctuation zone / H.Y.N. Holman, Y.W. Tsang, W.R. Holman // Envir. Sci. Technol. – 1999. – V. 33. – P. 1819-1824.
104. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao saltern on the coast of Yellow Sea of

China / F. Zhu [*et al.*] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2011. – V. 2011. – Article ID 615032. – 6 pages.

105. Isolation and characterization of naphthalene-degrading strains, *Pseudomonas* sp. CZ2 and CZ5 / W. Zhou [*et al.*] // African J. Microbiol. Res. – 2013. – V. 7 (1). – P. 13-19.

106. Isolation of DNA from saltern soils collected in Taiwan and whole-genome amplification of minute amounts of DNA for construction of metagenomic libraries / S.J. Lin [*et al.*] // African J. Microbiol. Res. – 2013. – V. 7 (23). – P. 2843-2852.

107. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of puget sound *Cycloclasticus* strains / A.D. Geiselbrecht [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 4703-4710.

108. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments / W.Q. Zhuang [*et al.*] // Water Sci. Technol. – 2003. – V. 47 (1). – P. 303-308.

109. Isolation of phthalic acid degrading *Pseudomonas* sp P1 from soil / S. Murad [*et al.*] // Pakistan Journal of Botany. 2007. – V. 39 (5). – P. 1833-1841.

110. Jones, R.M. The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator / R.M. Jones, B. Britt-Compton, P.A. Williams // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185, № 19. – P. 5847–5853.

111. Jose, P.A. Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India / P.A. Jose, S. Robinson, D. Jebakumar. // Aquatic Biosystems. – 2012. – V. 8. – P. 23-25.

112. Jukes, T.H. Evolution of protein molecules / T.H. Jukes, C.R. Cantor // Mamallian protein Metabolism / Ed. Munro H. N. New York: Academic press, – 1969. – P. 21-132.

113. Kasai, Y. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment / Y. Kasai, K. Kishira, S. Harayama // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 5625-5633.

114. Kaye, J.Z. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments / J.Z. Kaye, J.A. Baross // FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. – V. 32. – P. 249-260.
115. Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage / A. Bucha [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – P. 4662-4672.
116. Knapp, S. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betaine / S. Knapp, R. Landstein, E.A. Galinski // Extremophiles. – 1999. – V. 3. – P. 191-198.
117. 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. – P. 115-175.
118. Liang, D.W. Phthalates biodegradation in the environment / D.W. Liang, T. Zhang, H. Fang // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 80. – P. 183-198.
119. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Электронный ресурс]: Database of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. – Режим доступа: <http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonadaceae.html> (20.01.2014).
120. Loh, K.C. *Ortho*-pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations / K.C. Loh, S.S. Chua // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – V. 30. – P. 620-626.
121. Margesin, R. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments / R. Margesin, F. Schinner // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – V. 56. – P. 650-663.
122. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium / M.J. Gauthier [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – V. 42. – P. 568-576.
123. Mellado, E. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. / E. Mellado, A. Ventosa // Research Signpost. – 2003. – P. 233-265.

124. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations/ A. Oren [*et al.*] // Biodegradation. – 1992. – V. 3. – P. 387-398.
125. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China / H.C. Jiang [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – P. 3832-3845.
126. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 / K.Y. Choi [*et al.*] // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 252. – P. 207-213.
127. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2 / D. Kim [*et al.*] // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – V. 280. – P. 235-241.
128. Multiple Sequence Alignment [Электронный ресурс]: Multiple sequence alignment program for DNA or proteins. – Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> (20.01.2014).
129. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinden // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – P. 695-700.
130. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans* / E. Annweiler [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66, № 2. – P. 518-523.
131. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia / L.N. Anan'ina [*et al.*] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2011. – V. 100, № 2. – P. 309-316.
132. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth / Y.G. Yanni [*et al.*] // Plant Soil. – 1997. – V. 194. – P. 99-114.
133. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains / E. Garsia-Valdes [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54. – P. 2478-2485.

134. Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 / R.L. Stingley [et al.] // Microbiology. – 2004. – V. 150, № 11. – P. 3749-3761.

135. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea / J.A. Colquhoun [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 74. – P. 27-40.

136. Oie, C.S.I. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliphilic and moderately halophilic microorganism / C.S.I. Oie, C.E. Albaugh, B.M. Peyton // Water Res. – 2007. – V. 41. – P. 1235-1242.

137. Oren, A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications / A. Oren // J. Ind. Microbiol. & Biotechnol. – 2002. – V. 28. – P. 56-63.

138. Oren, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity / A. Oren // Saline Systems. – 2008. – V. 4, № 2. – doi:10.1186/1746-1448-4-2.

139. Ornston, L.N. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. Enzymes of catechol pathway / L.N. Ornston // J. Biol. Chem. – 1966. – V. 166. – P. 9-14.

140. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants / L.L. Daane [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – V. 52. – P. 131-139.

141. Palleroni, N.J. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings [et al.] 1983. / N.J. Palleroni, J.F. Bradbury // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1993. – V. 43, № 3. – P.606-609.

142. Phylogenetic relationships within the family *Halomonadaceae* based on comparative 23S and 16S rRNA gene sequence analysis / R.R. de la Haba [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – V. 60. – P. 737-748.

143. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. / B.P. Hedlund [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 251-259.

144. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with salicornia growing in tunisian hypersaline soils / F. Mapelli [*et al.*] // BioMed Research International. – 2013. – Article ID 248078. – 13 p.

145. Prokaryotic genetic diversity through out the salinity gradient of a coastal solar saltern / S. Benlloch [*et al.*] // Environ.Microbiol. – 2002. – V. 4. – P. 349-360.

146. Purification and characterisation of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038 / M.J. Larkin [*et al.*] // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181, № 19. – P. 6200-6204.

147. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium / E.G. Plotnikova [*et al.*] // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2011. – V. 80, № 5. – P. 703-712.

148. The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph / M. Argandonña [*et al.*] // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 244. – P. 69-74

149. Transfer of *Halomonas canadensis* and *Halomonas israelensis* to the genus *Chromohalobacter* as *Chromohalobacter canadensis* comb. nov. and *Chromohalobacter israelensis* comb. nov. / D.R. Arahal [*et al.*] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001a. – V. 51. – P. 1443-1448.

150. Quesada, E. Moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. In : A. Ventosa (Ed.) Halophilic Microorganisms // Springer. Germany.: Verlag, 2004. – P. 135-153.

151. Quorum sensing in some representative species of *Halomonadaceae* / A. Tahrioui [*et al.*] // Life. – 2013. – V. 3 (1). – P. 260-275.

152. Raymond, R.L. Microbial oxidation of n-paraffinichydrocarbons.// Develop. Ind. Microbiol. – 1961. – V.2, – №1. – P.23-32.

153. Reddy, C.C. Purification and properties of benzoate-4-hydroxylase from a soil pseudomonad / C.C. Reddy, C.S. Vaidyanathan // Arch. Biochem. Biophys. – 1976. – V. 177, № 2. – P. 488-498.

154. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera / M. Schlöter [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 2038-2046.
155. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples / A.E.R. Bastos [et al.] // Arch. Microbiol. – 2000. – V. 174. – P. 346-352.
156. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth / S. Tiwari [et al.] // Biology and Fertility of Soils. – 2011. – V. 47, № 8. – P. 907-916.
157. Saralov, A.I. *Haloferax chudinovii* sp. nov., a halophilic archaeon from Permian potassium salt deposits / A.I. Saralov, R.V. Baslerov, B.B. Kuznetsov // Extremophiles. – 2013. – V. 17 (3). – P. 499-504.
158. Seo, J.S. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds / J.S. Seo, Y.S. Keum Q.X. Li // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2009. – V.6. – P.278- 309.
159. Singh, O.V. Extremophiles. Sustainable resources and biotechnological implications. // Om V.Singh. – New Jersey.: John Wiley & Sons, – 2012. – 429 p.
160. The National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: Database of biomedical and genomic information.– Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (26.08.2013).
161. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. / E. Yabuuchi [et al.] // Microbiol. Immunol. –1995. – V. 39. – P. 897-904.
162. Vamsee-Krishna, C. Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD and *Acinetobacter lwoffii* ISP4 / C. Vamsee-Krishna, Y. Mohan, P.S. Phale // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – V. 72. – P. 1263-1269.
163. 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. – V. 10. – P. 569-570.

164. Variability of enzyme system of Nocardioform bacteria as a basis of their metabolic activity / I.P. Solyanikova [*et al.*] // J Environ Sci Health B. – 2008. – V. 43, № 3. – P. 241-52.

165. Vedler, E. Megaplasms and the degradation of aromatic compounds by soil bacteria. Microbial Megaplasms / Ed. E. Schwartz. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. – P.33-53.

166. Ventosa, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria / A. Ventosa, J.J. Nieto, A. Oren // Microbiol. Mol. Boil. Rev. – 1998. – V. 62. – P. 504-544.

167. Ventosa, A. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms / A. Ventosa, J.J. Nieto // J. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – V. 11. – P. 84-95.

168. Zhou, N.-Y. *nag* genes *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism / N.-Y. Zhou, S.L. Fuenmayor, P.A. Williams // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – P. 700-708.

169. Zununi-Vahed, S. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran / S. Zununi Vahed [*et al.*] // Mikrobiologiya. – 2011. – V. 80 (6). – P. 826-33.

170. Zvyagintsev, D.G. Mycelial bacteria of saline soils / D. G. Zvyagintsev, G. M. Zenova, G. V. Oborotov // Eurasian Soil Science. – 2008. – V. 41, № 10. – P. 1107-1114.

171. Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome / V. Kavamura [*et al.*] // PLoS ONE. – 2013. – V. 9, № 8. – P. 1-10.

172. Web-Type Evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene / L.A. Kulakov [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 1754-1764.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

LOCUS **KC538827** 927 bp DNA linear BCT 01-APR-2013

DEFINITION **Nesterenkonia sp. M55-2N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**

ACCESSION KC538827

VERSION KC538827

KEYWORDS .

SOURCE Nesterenkonia sp. M55-2N

ORGANISM Nesterenkonia sp. M55-2N

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;

Micrococcineae; Micrococcaceae; Nesterenkonia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 927)

AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.

TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
growing on technogenically salinized soils

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 927)

AUTHORS Korsakova,E.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JAN-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
Street, Perm, Perm Region 614081, Russian Federation

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..927

/organism="Nesterenkonia sp. M55-2N"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="M55-2N"

/isolation_source="rhizosphere of plants growing on
technogenically salinized soil"

/db_xref="taxon:1312504"

/country="Russia"

rRNA <1..>927

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 tcgaacgatg aagaccgtgc ttgcacggtg ggattagtgg cgaacgggtg agtatcacgt
61 gagtaacctt ccctaactc tgggataagc ccgggaaact gggctaata ccgatacga
121 ccagtcctcg catggggtgc tggtgaaag atttatcggg tttggatgga ctgcggcct
181 atcagcttgt tggtaggta aaggctcacc aaggcgatga cgggtagccg gcctgagagg
241 gtgaccggcc acactgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtgggg
301 aatattgcac aatgggagaa agcctgatgc agcgacgccg cgtgcgggat gacggccttc
361 ggggtgtaaa ccgctttcag caggaagaa gcgcaagtga cggtagctgc agaagaagcg
421 ccggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg cgcgagcgtt atccggaatt
481 attgggcgta aagagctcgt aggcggtttg tcacgtctgc tgtgaaagcc cggggctcaa
541 ccccggtgtg gcagtgggta cgggcagact agagtgcagt aggggagact ggaattcctg
601 gtgtagcggg gaaatgcgca gatatacagg ggaacaccga tggcgaaggc aggtctctgg
661 gctgttactg acgctgagga gcgaaagcat ggggagcgaa caggattaga taccctggta
721 gtccatgccg taaacgttgg gcactagggt tggggaacat tccacgtttt ccgcgcgcta
781 gctaacgcat taagtgcgcc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac tcaaaggaat
841 tgacgggggc ccgcacaagc ggcggagcat gcggattaat tcgatgcaac gcgaagaacc
901 ttaccaaggc ttgacatgga ccggacc

```

//

LOCUS **KC992726** 748 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013
 DEFINITION **Kocuria sp. M45-1N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KC992726
 VERSION KC992726
 KEYWORDS .
 SOURCE Kocuria sp. M45-1N
 ORGANISM Kocuria sp. M45-1N
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Micrococcineae; Micrococcaceae; Kocuria.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 748)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 748)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..748
 /organism="Kocuria sp. M45-1N"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M45-1N"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically salinized soil"
 /db_xref="taxon:1343149"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>748
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgctgggtg gattagtggc gaacgggtga gtaatacgtg agtaacctgc ccttgactct
 61 gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac tggatactac ckyycwycgc atgggtgggtg
 121 gtggaaaggg ttttactggt ttggatggg ctcacggcct atcagcttgt tgggtgggta
 181 atggctcacc aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gtgaccggcc aactggggac
 241 tgagacacgg cccagactcc tacgggaggg agcagtgggg aatattgcac aatgggcgga
 301 agcctgatgc agcgacgccg cgtgagggat gacggcctc ggggtgtaa ccttttcag
 361 tagggaagaa gcgagagtga cggtacctgc agaagaagcg ccggctaact acgtgccagc
 421 agccgcggta atacgtaggg cgcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt
 481 aggcggtttg tcgctctgc tgtgaaagcc cggggctcaa cccgggtct gcagtgggta
 541 cgggcagact agagtgcagt aggggagact ggaattcctg gtgtagcggg gaaatgcgca
 601 gatatcagga ggaacaccga tggcgaaggg aggtctctgg gctgttactg acgtgagga
 661 gcgaaagcat ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgttgg
 721 gcactaggtg tgggggacat tccacgtt
 //

LOCUS **KC992727** 1390 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013
 DEFINITION **Halomonas sp. M45-2N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KC992727
 VERSION KC992727
 KEYWORDS .
 SOURCE Halomonas sp. M45-2N
 ORGANISM Halomonas sp. M45-2N
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales;
 Halomonadaceae; Halomonas.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1390)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1390)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1390
 /organism="Halomonas sp. M45-2N"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M45-2N"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically salinized soil"
 /db_xref="taxon:1343147"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>1390
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgcaagtcga gcggaaacga tggagcttgc tccaggcgtc gagcggcgga cgggtgagta
 61 atgcatagga atctgcccgg tagtggggga taacctgggg aaaccaggc taataccgca
 121 tacgtcctac gggagaaagc aggggatctt cggacctgc gctatcggat gagcctatgt
 181 cggattagct tgttggtgag gtaaaggctc accaaggcga cgatccgtag ctggtctgag
 241 aggatgatca gccacatcgg gactgagaca cggcccgaac tcctacggga ggcagcagtg
 301 gggaaatatt gacaatgggc gaaagcctga tccagccatg ccgcgtgtgt gaagaaggct
 361 ttcggtgtgt aaagcacttt cagtgaggaa gaaggccttg gggccaatac ccccgaggaa
 421 ggacatcact cacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg
 481 ggggtgcgagc gttaatcgga attactgggc gtaaagcgcg cgtaggcggc gtgataagcc
 541 ggttgtagaa gcccgggct caacctggga acggcatccg gaactgtcag gctagagtgc
 601 aggagaggaa ggtagaattc ccggtgtagc ggtgaaatgc gtagagatcg ggaggaatac
 661 cagtggcgaa ggcggccttc tggactgaca ctgacgtga ggtgcgaaag cgtgggtagc
 721 aacaggatt agataccctg gtatgccacg ccgtaaacga tgcgactag ccgttgggg
 781 ccttgagacc tttgtggcgc agttaacgcg ataagtcgac cgctgggga gtacggccgc
 841 aaggttaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggagca tgtggttaa
 901 ttcatgcaa cggaagaac ctacacctc cttgacatcg tgcgaacttg gtagagatac
 961 cttggtgcct tcgggaacgc acagacaggt gctgcatggc tgcgtcagc tcgtgtgtg
 1021 aaatgtggg ttaagtcccg taacgagcgc aacccttgc cctatttgc agcgattcgg
 1081 tcgggaactc tagggagact gccggtgaca aaccggagga aggtggggac gacgtcaagt
 1141 catcatggc cttacgggta gggctacaca cgtgctacaa tggccggtac aaaggggtgc
 1201 gaagccgcga ggtggagcta atcccgaata gccggtctca gtccggtatc gagtctgcaa
 1261 ctgactccg tgaagtcgga atcgtagta atcgtgaatc agaatgtcac ggtgaatacg
 1321 ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tggactgcac cagaagtgtg
 1381 tagcctaact

LOCUS **KC992728** 800 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013
 DEFINITION **Zhihengliuella sp. M45-5N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KC992728
 VERSION KC992728
 KEYWORDS .
 SOURCE Zhihengliuella sp. M45-5N
 ORGANISM Zhihengliuella sp. M45-5N
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Micrococcineae; Micrococcaceae; Zhihengliuella.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 800)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 800)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..800
 /organism="Zhihengliuella sp. M45-5N"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M45-5N"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically salinized soil"
 /db_xref="taxon:1343151"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>800
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgctgggtgg attagtggcg aacgggtgag taacacgtga gtaacctgcc ctgactcca
 61 ggataagccc gggaaactgg gtctaatact ggatattcaa tttccatcgc atggtggtt
 121 ttggaaagga ttctggtcga ggagggactc gcggcctatc agcttgttgg tgaggtaatg
 181 gtcaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagaggggtg accggccaca ctgggactga
 241 gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc
 301 ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct ctttcagtag
 361 ggaagaagcg aaagtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gtaactacg tgccagcagc
 421 cgcggttaata ctaggggcgc aagcgttatc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg
 481 cggtttgcg cgtctgccgt gaaagtccgg ggcttaactc cggatctgcg gtgggtacgg
 541 gcagactaga gtgctgtagg ggagactgga attcctggtg tagcggtgaa atgcgcagat
 601 atcaggagga acaccgatgg cgaaggcagg tctctgggca gtaactgacg ctgaggagcg
 661 aaagcatggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgttgggca
 721 ctagatgtgg gggacattcc acgttctccg cgtcgtagct aacgcattaa gtgccccgcc
 781 tggggagtac ggccgcaagg
 //

LOCUS **KC992729** 893 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013

DEFINITION **Zhihengliuella sp. M46-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**

ACCESSION KC992729

VERSION KC992729

KEYWORDS .

SOURCE Zhihengliuella sp. M46-2

ORGANISM Zhihengliuella sp. M46-2

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;

Micrococcineae; Micrococcaceae; Zhihengliuella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 893)

AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.

TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
growing on technogenically salinized soil

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 893)

AUTHORS Korsakova,E.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
Street, Perm, Perm Region 614081, Russia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..893

/organism="Zhihengliuella sp. M46-2"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="M46-2"

/isolation_source="rhizosphere of plants growing on
technogenically salinized soil"

/db_xref="taxon:1343152"

/country="Russia"

rRNA <1..>893

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 ttgctgggtg gattagtggc gaacgggtga gtaacacgtg agtaacctgc cctcgactcc
61 aggataagcc cgggaaactg ggtctaatac tggatattca atttctgccg catggtgggt
121 ttggaaagg attctggtcg aggagggact cgcggcctat cagcttggtg gtgaggtaat
181 ggctaccaa ggcgacgacg gtagccggcg ctgagagggt gaccggccac actgggactg
241 agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgaaag
301 cctgatgcag cgaccccgcg tgagggatga cggccttcgg gttgtaaacc tcttcagta
361 gggaagaagc gaaagtgcg gtacctgcag aagaagcgcc ggctaactac gtgccagcag
421 ccgcggtaat acgtagggcg caagcggtat ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag
481 gcggtttgtc gcgtctgccg tgaaagtccg gggcttaact ccggatctgc ggtgggtacg
541 ggcagactag agtgctgtag gggagactgg aattcctggt gtagcgggtg aatgcgcaga
601 tatcaggagg aacaccgatg gcgaaggcag gtctctgggc agtaactgac gctgaggagc
661 gaaagcatgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgttgggc
721 actagatgtg ggggacattc cacgttttcc gcgtcgtagc taacgcatta agtgccccgc
781 ctggggagta cggccgcaag gctaaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg
841 cggagcatgc ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt accaaggctt gac

```

//

LOCUS **KC992730** 1372 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013
 DEFINITION **Halomonas sp. M46-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KC992730
 VERSION KC992730
 KEYWORDS .
 SOURCE Halomonas sp. M46-5
 ORGANISM Halomonas sp. M46-5
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales;
 Halomonadaceae; Halomonas.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1372)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1372)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1372
 /organism="Halomonas sp. M46-5"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M46-5"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically salinized soil"
 /db_xref="taxon:1343148"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>1372
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tagcttgcta gatgctgacg agcggcggac gggtagtaa tgcattaggaa tctgcccgg
 61 agtgggggat aacctgggga aacccaggct aataccgcat acgtcctacg ggagaaaggg
 121 ggctccggct cccgctattg gatgagccta tgcggatta gctggttgg gaggtaatg
 181 ctcaccaagg cgacgatccg tagctggtct gagaggatga tcagccacat cgggactgag
 241 acacggcccg aactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgacaatg ggggcaaccc
 301 tgatccagcc atgccgcgtg tgtgaagaag gccctcgggt tgtaaagcac tttagcgag
 361 gaagaacgcc tgggtggtta taccatcag gaaagacatc actcgcagaa gaagcaccgg
 421 ctaactccgt gccagcagcc gcggaatac ggagggtgca agcgtaac ggaattactg
 481 ggcgtaaagc gcgctaggt ggcttgataa gccggttg aaagccccgg gctcaacctg
 541 ggaacggcat ccggaactgt caagctagag tacaggagag gaaggtagaa ttccgggtg
 601 agcggtgaaa tgcgtagaga tcgggaggaa taccagtggc gaaggcggcc ttctggactg
 661 atactgacac tgaggtgca aagcgtgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc
 721 acgccgtaaa cgatgtcgac cagccgttgg gtgcctagcg cactttgtgg cgaagttaac
 781 gcgataagtc gaccgcctgg ggagtagcgc cgcaaggta aaactcaa atgaattgacgg
 841 gggccgcac aagcgggtga gcatgtggt taattcgatg caacgcgaag aaccttacct
 901 acccttgaca tcctgcgaac ccggaagaga ttccgggggt ccttcgggaa cgcagagaca
 961 ggtgtgcat ggctgtcgtc agctcgtgt gtgaaatgt gggtaagtc ccgtaacgag
 1021 cgcaaccctt gtcttattt gccagcgagt aatgtcggga actctaagga gactgccggt
 1081 gacaaaccgg aggaagggtg ggacgacgtc aagtcacat gcccttacg ggtagggcta
 1141 cacacgtgct acaatggccg gtacaaagg ctgcgaactc gcgagagcaa gcgaatccct
 1201 taaagccggt ctgagtcgg atcggagtct gcaactcgac tccgtgaagt cggaatcgct
 1261 agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttccc ggcttgtag acaccgccc
 1321 tcacacatg ggagtggtg gcaccagaag tggtagcct aacgcaagag gg

//

LOCUS **KC992731** 892 bp DNA linear BCT 07-JUN-2013
 DEFINITION **Microbacterium sp. M46-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KC992731
 VERSION KC992731
 KEYWORDS .
 SOURCE Microbacterium sp. M46-6
 ORGANISM Microbacterium sp. M46-6
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Micrococcineae; Microbacteriaceae; Microbacterium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 892)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soil
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 892)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-APR-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..892
 /organism="Microbacterium sp. M46-6"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M46-6"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically salinized soil"
 /db_xref="taxon:1343150"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>892
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gtcgaacggt gaacacggag ctgtctgtt gggatcagt gcgaacgggt gagtaacacg
 61 tgagcaacct gcccctgact ctgggataag gcctggaaac ggcgtctaat actggatatg
 121 tgacgtgac gcatggtctg cgtctggaaa gaatttcggt tggggatggg ctgcggcct
 181 atcagcttgt tggtaggta atggctcacc aaggcgtcga cgggtagccg gcctgagagg
 241 gtgaccggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggg agcagtgggg
 301 aatattgcac aatgggcgca agcctgatgc agcaacgccg cgtgagggat gacggccttc
 361 ggggtgtaa cctcttttag caggaagaa gcgaaagtga cgtacctgc agaaaaagcg
 421 ccggctaact acgtgccagc agccgcggt atacgtagg cgcaagcgtt atccggaatt
 481 attggcgta aagagctcgt aggcggttg tcgctctgc tgtgaaatcc ggaggctcaa
 541 cctccggcct gcagtgggta cgggcagact agagtgcgt aggggagatt ggaattcctg
 601 gtgtagcggg ggaatgcgca gatatcagga ggaacaccga tggcgaaggc agatctctgg
 661 gccgtaactg acgtgagga gcgaaaggg ggggagcaaa caggcttaga taccctggta
 721 gtccaccccg taaacgttgg gaactagtgt tgggtccat tccacggatt ccgtgacgca
 781 gctaacgcat taagtcccc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac taaaggaat
 841 tgacggggac ccgcacaagc ggcggagcat gcggattaat tcgatgcaac gc

//

LOCUS **KF010924** 1340 bp DNA linear BCT 22-JUL-2013
 DEFINITION **Alteromonas sp. M46-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KF010924
 VERSION KF010924
 KEYWORDS .
 SOURCE Alteromonas sp. M46-7
 ORGANISM Alteromonas sp. M46-7
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales;
 Alteromonadaceae; Alteromonas.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1340)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soils
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1340)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAY-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1340
 /organism="Alteromonas sp. M46-7"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M46-7"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically-salinized soil"
 /db_xref="taxon:1342303"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>1340
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gcaagtcgaa cggtagcagg atgwgcttgc acatcgctga cgagtggcgg acgggtgagt
 61 aatgcttggg aactgcctt tgcgaggggg ataacagttg gaaacgactg ctaataccgc
 121 atgatgtcta cggaccaaag ggggcttita gctctcgcgc aaagagaggc ccaagtgaga
 181 ttagctagta ggtgaggtaa gagctcacct aggcgacgat ctctagctgt tctgagagga
 241 agatcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggga gcagtgggga
 301 atattgcaca atgggggcaa ccctgatgca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggccttcg
 361 ggttgtaaag cactttcagt tgtgaggaag ggtgctggt taataccag taacattgac
 421 gtagcaaca gaagaagcac cggctaactc cgtgccagca gccgcggtaa tacggagggt
 481 gcgagcgta atcggaatta ctgggcgtaa agcgcacgca ggcggttgt taagctagat
 541 gtgaaagccc cgggctcaac ctgggacggt cattagaac tggcagactc gagtcttga
 601 gaggggagtg gaattccagg ttagcggtg aaatgcgtag atatctggag gaacatcagt
 661 ggcgaaggcg actccctggc caaagactga cgctcatgtg cgaaagtgtg ggtagcgaac
 721 aggattagat accctggtag tccacaccgt aaacgctgtc tactagctgt ttgtgaattt
 781 aatttgtaag tagcgaagct aacgcgataa gtagaccgcc tggggagtac ggccgcaagg
 841 ttaaaactca aatgaattga cggggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg
 901 atgcaacgcg aagaacctta cctacacttg acatgctgag aactttccag agatggattg
 961 gtgccttcgg gaactcagac acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat
 1021 gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc ctgttccta gttgccagca ttagttggg
 1081 cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg gaggaagggt gggacgacgt caagtcatca
 1141 tggcccttac gtgtagggt acacacgtgc tacaatggca agtacagagg gaagcgagac
 1201 agtgatgtgg agcggacccc ttaaagcttg tcgtagtccg gattggagtc tgcaactcga
 1261 ctccatgaag tcggaatcgc tagtaatcgc aggtcagaat actgcggtga atacgttccc
 1321 gggccttgta cacaccgccc
 //

LOCUS **KF010925** 892 bp DNA linear BCT 22-JUL-2013

DEFINITION **Kocuria sp. M46-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**

ACCESSION KF010925

VERSION KF010925

KEYWORDS .

SOURCE Kocuria sp. M46-10

ORGANISM Kocuria sp. M46-10

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;

Micrococcineae; Micrococcaceae; Kocuria.

REFERENCE 1 (bases 1 to 892)

AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.

TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
growing on technogenically salinized soils

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 892)

AUTHORS Korsakova,E.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-MAY-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
Street, Perm, Perm Region 614081, Russia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..892

/organism="Kocuria sp. M46-10"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="M46-10"

/isolation_source="rhizosphere of plants growing on
technogenically-salinized soil"

/db_xref="taxon:1342305"

/country="Russia"

rRNA <1..>892

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 ttgctgggtg gattagtggc gaacgggtga gtaatacgtg agtaacctgc ccttgactct
61 gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac tggatactac ctctaccgc atggygggtg
121 gtggaaaggg ttttactggt ttggatggg ctcacggcct atcagcttgt tggtagggta
181 atggctcacc aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gtgaccggcc aactggggac
241 tgagacacgg cccagactcc tacgggaggg agcagtgggg aatattgcac aatgggcgga
301 agcctgatgc agcgacgccg cgtgagggat gacggcctc ggggtgtaa ccttttcag
361 tagggaagaa gcgagagtga cggtacctgc agaagaagcg ccggctaact acgtgccagc
421 agccgcggta atacgtaggg cgcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt
481 aggcggtttg tcgctctgc tgtgaaagcc cggggctcaa cccgggtct gcagtgggta
541 cgggcagact agagtgcagt aggggagact ggaattcctg gtgtagcggg gaaatgcgca
601 gatatcagga ggaacaccga tggcgaaggg aggtctctgg gctgttactg acgtgagga
661 gcgaaagcat ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgttgg
721 gcactaggtg tgggggacat tccacgtttt ccgcgccgta gctaacgcat taagtcccc
781 gcctggggag tacggccgca aggctaaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc
841 ggcgagcat gcggattaat tcgatgcaac gcgaagaacc ttaccaaggc tt

```

//

LOCUS **KF010926** 819 bp DNA linear BCT 22-JUL-2013
 DEFINITION **Isoptericola sp. M46-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KF010926
 VERSION KF010926
 KEYWORDS .
 SOURCE Isoptericola sp. M46-11
 ORGANISM Isoptericola sp. M46-11
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Micrococcineae; Promicromonosporaceae; Isoptericola.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 819)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soils
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 819)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAY-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..819
 /organism="Isoptericola sp. M46-11"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M46-11"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically-salinized soil"
 /db_xref="taxon:1342304"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>819
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgcaagtcga acggtgaagc ccagcttgct ggggtggatca gtggcgaacg ggtgagtaac
 61 acgtgagcaa cctgccctcc acttcgggat aagccttga aacgggggtct aataccggat
 121 atgagcatct gccgcatggt ggggtgtgga aagttttcg gtggaggatg ggctcgcggc
 181 ctatcagctt gttggtgggg tgatggccta ccaaggcgtc gacgggtagc cggcctgaga
 241 gggcgaccgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg
 301 ggaatattgc acaatgggcg aaagcctgat gcagcgacgc cgctgaggg atgacggcct
 361 tcgggttga aacctcttc agcaggaag aaggctcgg ttgacggtac ctgcagaaga
 421 agcgccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggcgcaag cggtgtccgg
 481 aattattggg cgtaaagagc tcgtaggcgg tctgtcgcgt ctggtgtgaa aacccgaggc
 541 tcaacctcgg gcttgcacg ggtacgggca gactagagtg cggtagggga gactggaatt
 601 cctggtgtag cgggtggaatg gcgagatc aggaggaaca ccgatggcga aggcaggtct
 661 ctgggccgca actgacgctg aggagcgaaa gcatggggag cgaacaggat tagataccct
 721 ggtagtccat gccgtaaagc ttgggcacta ggtgtggggc tcattccacg agttccgtgc
 781 cgcagctaac gcattaagt cccgcctgg ggagtacgg
 //

LOCUS **KF010927** 1405 bp DNA linear BCT 22-JUL-2013

DEFINITION **Kushneria sp. M47-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**

ACCESSION KF010927

VERSION KF010927

KEYWORDS .

SOURCE Kushneria sp. M47-1

ORGANISM Kushneria sp. M47-1

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales;

Halomonadaceae; Kushneria.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1405)

AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.

TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
growing on technogenically salinized soils

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1405)

AUTHORS Korsakova,E.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-MAY-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
Street, Perm, Perm Region 614081, Russia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1405

/organism="Kushneria sp. M47-1"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="M47-1"

/isolation_source="rhizosphere of plants growing on
technogenically-salinized soil"

/db_xref="taxon:1342306"

/country="Russia"

rRNA <1..>1405

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1  tgcaagtcga gcggtaacag gggtagcttg ctacccgctg acgagcggcg gacgggtgag
61  taatgcatgg gtatctgccc ggtagtgggg gataactcgg ggaaaccgga gctaataccg
121  catactcct acgggagaaa gcagggggtc ttcggacctt gcgctatcgg atgagcccat
181  gtcggattag ctgttggtg aggtaacggc tcaccaaggc gacgatccgt agctggtctg
241  agaggatgat cagccacacc gggactgaga cacggcccgg actcctacgg gaggcagcag
301  tggggaatat tggacaatgg gggaaccct gatccagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg
361  ccttcgggtt gtaaagcact ttcagtgggg aagaaggcat gatgattaat actcgtcatg
421  aaggacatca cccacagaag aagcaccggc taactccgtg ccagcagccg cgtaatacag
481  gaggtgcaa gcgtaatcg gaattactgg gcgtaaaggg cgcgtaggcg gcttgccaag
541  ccggatgtga aagccccggg ctcaaccggg gaacggcatt cggaactggt aggctagagt
601  gcaggagagg aaggtggaat tccgggtgta gcggtgaaat gcgtagagat cgggaggaat
661  accagtggcg aaggcggcct tctggactga cactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggta
721  gcaaacagga ttgataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgtcgacc agccgttgga
781  ccccttgagg gtttggtggc gcagttaacg caataagtcg accgcctggg gactacggcc
841  gcaaggctaa aactcaaatg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggtt
901  aattcgatgc aacgcgaaga accttacctg ctctgacat cctgcgaatt cctcagagat
961  gaggaagtgc cttcggaac gcagagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtg
1021  tgaaatgttg ggttaagtcc cgtaacgagc gcaacccta tcccttttg ccagcgcgta
1081  atggcgggaa cttcaggagg actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gacgacgtca
1141  agtcatcatg gcccttacga gcagggttac acacgtgcta caatggccgg taaaagggt
1201  tgcaagcgg cgacgtgaag ccaatcccag aaagccggcc tcagtccgga tcggagtctg
1261  caactcgact ccgtgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtgg atcagaatgc cacggtgaat
1321  acgttcccgg gcctgtaca caccgccgtg cacacatgga gagtggactg caccagaagt
1381  ggtagctta accttcggga gagcg

```

LOCUS **KF010928** 1316 bp DNA linear BCT 22-JUL-2013
 DEFINITION **Microbacterium sp. M47-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.**
 ACCESSION KF010928
 VERSION KF010928
 KEYWORDS .
 SOURCE Microbacterium sp. M47-2
 ORGANISM Microbacterium sp. M47-2
 Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
 Micrococcineae; Microbacteriaceae; Microbacterium.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1316)
 AUTHORS Nazarov,A.V., Korsakova,E.S., Anan'ina,L.N. and Plotnikova,E.G.
 TITLE Phylogenetic diversity of bacteria from the rhizosphere of plants
 growing on technogenically salinized soils
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1316)
 AUTHORS Korsakova,E.S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (06-MAY-2013) Laboratory of Molecular Microbiology and
 Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
 of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev
 Street, Perm, Perm Region 614081, Russia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1316
 /organism="Microbacterium sp. M47-2"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="M47-2"
 /isolation_source="rhizosphere of plants growing on
 technogenically-salinized soil"
 /db_xref="taxon:1342307"
 /country="Russia"
 rRNA <1..>1316
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 caagtcgaac ggtgaacacg gagcttgctc tgtgggatca gtggcgaacg ggtgagtaac
 61 acgtgagcaa cctgccctgg actctgggat aagcgctgga aacggcgtct aatactggat
 121 atgagacgtg gccgcatggt caacgtttgg aaagattttt cggctcggga tgggctcgcg
 181 gcctatcagc ttgttggtga ggtaatggct caccaaggcg tcgacgggta gccggcctga
 241 gagggtgacc ggccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt
 301 ggggaatatt gcacaatggg cgaaagcctg atgcagcaac gccgcgtgag ggatgacggc
 361 ctgcgggttg taaacctctt ttagcaggga agaagcgaga gtgacggtag ctgcagaaaa
 421 agcaccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggggtgcaag cgttatccgg
 481 aattattggg cgtaaagagc tcgtaggcgg ttgtcgcgt ctgctgtgaa atctgggggc
 541 tcaaccccca gcctgcagtg ggtacgggca gactagagtg cggtagggga gattggaatt
 601 cctggtgtag cggtggaatg cgcagatatc aggaggaaca ccgatggcga aggcagatct
 661 ctgggccgta actgacgtg aggagcgaaa gggtagggag caaacaggct tagataccct
 721 ggtagtccac cccgtaaacg ttgggaacta gttgtgggt ccattccacg gattccgtga
 781 cgcagctaac gcattaagt cccgcctgg ggagtacggc cgcaaggcta aaactcaaag
 841 gaattgacgg ggaccgcac aagcgcgga gcatgcggat taattcgatg caacgcgaag
 901 aaccttacca aggctgaca tatacgagaa cgggccagaa atggtcaact cttggacac
 961 tcgtaaacag gtggtgcatg gttgtcgtca gtcgtgtcg tgagatgttg ggtaagtcc
 1021 cgcaacgagc gcaaccctcg ttctatgttg ccagcacgta atggtgggaa ctcatggat
 1081 actgccgggg tcaactcgga ggaagggtgg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatgt
 1141 cttgggctt acgcatgcta caatggccgg tacaaggggc tgcaataaccg tgaggtggag
 1201 cgaatcccaa aaagccggtc ccagttcgga ttgaggtctg caactcgacc tcatgaagtc
 1261 ggagtcgcta gtaatcgag atcagcaacg ctgagggtgaa tacgttcccg ggtctt

//

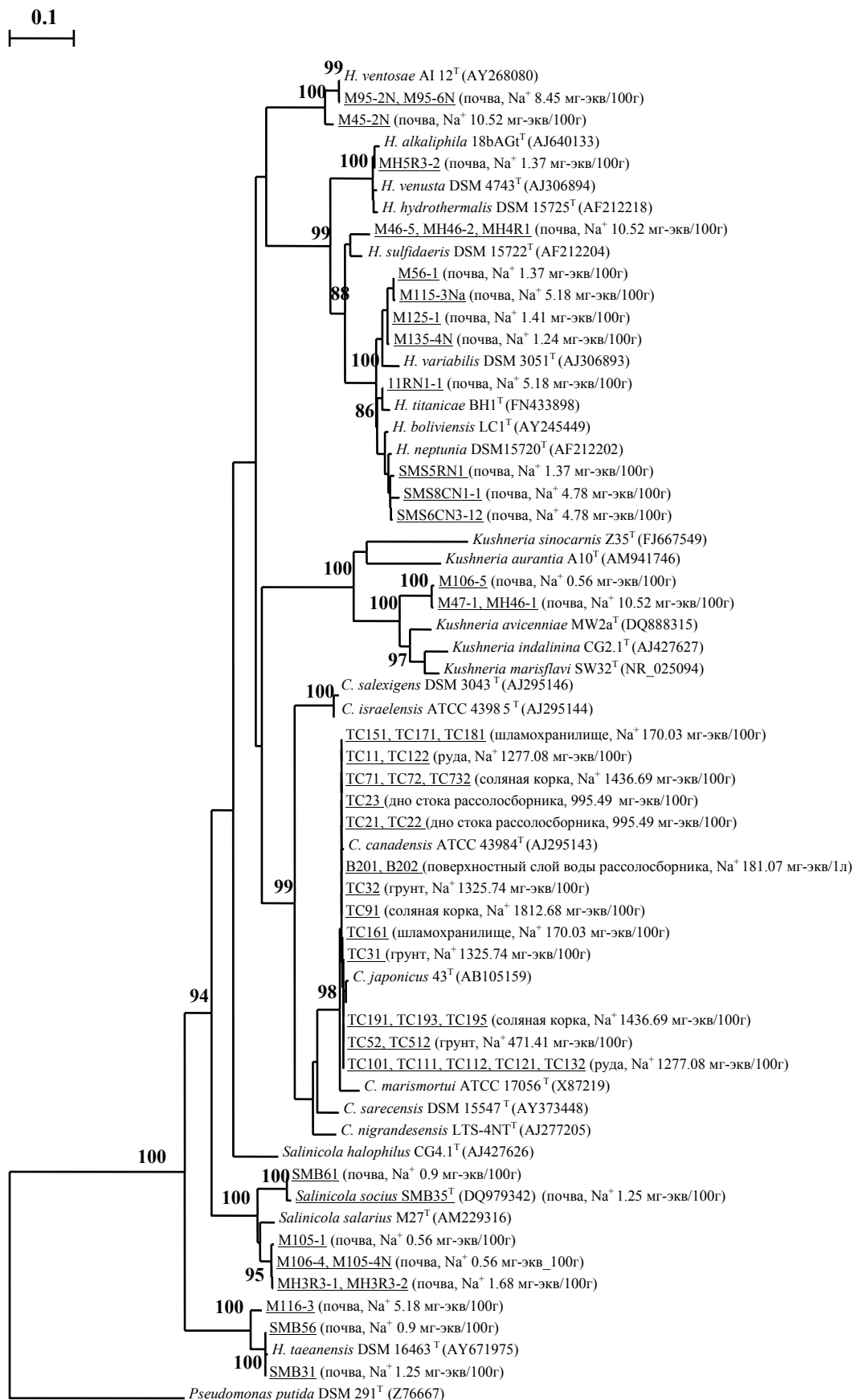
Нуклеотидные последовательности функциональных генов
штамма *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=BKM AC 2631D)

phtB

CCGTCGTGGTGACGGAAGGCGACGCCACGTCGATGGCCGACAACGAACGCGCCGTCGCC
GACGTCGTGGACGCGTTTCGGGCCGCTCACCACGCTCGTCTGCGTCGTCGGCGTATTCGACT
ACTTCACCGAGATTCCGCAACTGCCCAAGAACAAGATCAGCGAGGCGTTCGATCAACTCT
TCGGCGTCAACGTCAAGAGCAACCTGCTCAGCGTGAAGGCGGCGCTCGACGAGCTGATCG
AGAACGAGGGCGACATCATCCTCACCTCTCCAACGCTGCGTTCTACCCCGGTGGCGGCG
GCCCCTGTATGTGGCGTCGAAGTA

benA

GCCACGAGAGCCAGATTCCCGAATGTCGGCGACTACTTCACCACGTACATGGGCCGCCA
GCCGATCGTGATCTCCCGCAACAAGGAGGGCGAACTCAACGCCCTGGTGAACGCGTGCA
GCCACCGCGGCGCCATGCTGTGCAGGCGCAAGACGGACAACCGGACCACGTTACCTGC
CCGTTCCACGGCTGGACGTTCAACAATTCGGGCAAGCTCCTCAAGGTCAAGGACCCGCGT
GAGGCCGGCTACCCGGAGCAGTTCAACAAGGACGGCTCCACGACCTACCAAGGTCGC
GCGGTTTCGAGAACTACCGCGGTTTCCTGTTCGGCAGCCTCAACGCCGACGTCCACCGCT
CGAGGAGCACCTCGGTGACACCACGAAGATCATCGACATGATCGTCGACCAGTCGCCCCGA
CGGCCTCGAGGTCCTGCGCGGTGCGTCCACCTACACCTACGACGGCAACTGGAAGCTGCA
GACCGAGAACGGTGCCGACGGCTACCACGTGTCCGCCACCCACTGGAACCTACGCCGCCAC
C



Филогенетическое древо, построенное с использованием метода neighbor-joining, показывающее положение исследуемых изолятов в семействе *Halomonadaceae*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК длиной 1248 п.н. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Изоляты с идентичными генами 16S рРНК, выделенные из одного образца, перечислены через запятую. В скобках указаны местообитания изолятов и содержание катионов натрия в образцах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю признательность научному руководителю доктору биологических наук Плотниковой Елене Генриховне за предоставленную тему исследований, помощь при планировании экспериментов и обсуждении полученных результатов, внимание и поддержку.

Выражаю глубокую благодарность заведующему лабораторией молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, чл.-корр. РАН Демакову Виталию Алексеевичу и сотрудникам лаборатории: н.с., к.б.н. Ананьиной Людмиле Николаевне, с.н.с., к.б.н. Егоровой Дарье Олеговне, с.н.с., к.б.н. Назарову Алексею Владимировичу, н.с., к.б.н. Ястребовой Ольге Викторовне и инженеру Шестаковой Елене Анатольевне за помощь в проведении исследований, обсуждении результатов, внимание и ценные советы.

Выражаю искреннюю благодарность заведующей отделом «Всероссийская коллекция микроорганизмов» ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, д.б.н. Евтушенко Людмиле Ивановне за научные консультации.

Благодарю сотрудника группы физико-химических исследований ИЭГМ УрО РАН Шерстобитову Наталью Петровну за помощь в определение содержания катионов Na^+ в исследуемых образцах.