

УДК 579.695:579.262:579.222.2

Е. С. Корсакова<sup>a,b</sup>, Е. А. Шестакова<sup>a</sup>, Т. А. Одинцова<sup>c</sup>, Б. А. Бачурин<sup>c</sup>,  
Е. Г. Плотникова<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>b</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

<sup>c</sup> Горный институт УрО РАН, Пермь, Россия

## МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ГЛИНИСТО-СОЛЕВЫХ ШЛАМАХ КАЛИЙНОГО ПРЕДПРИЯТИЯ (Г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Из глинисто-солевых шламов предприятия БКПРУ-2 ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край) выделено 138 штаммов бактерий, которые на основании морфологических и генетических особенностей были объединены в 28 морфогеномогрупп. Представители каждой группы были идентифицированы на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, сравнительное исследование которых показало принадлежность штаммов к классам *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria*. Все обнаруженные бактерии являются галотолерантными, т.к. способны к росту на средах без добавления NaCl и с повышенной концентрацией соли (до 150 г/л). Большинство штаммов росли в щелочных условиях (pH 9.0) и использовали в качестве единственного источника углерода ряд моно- и полиароматических соединений, в том числе полициклические ароматические углеводороды, фталаты.

**Ключевые слова:** глинисто-солевые шламы; филогенетическое разнообразие; бактерии-деструкторы, ароматические соединения; фталаты.

Е. S. Korsakova<sup>a,b</sup>, Е. А. Shestakova<sup>a</sup>, Т. А. Odintsova<sup>c</sup>, В. А. Bachurin<sup>c</sup>,  
Е. G. Plotnikova<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State University, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> Mining Institute, UB RAS, Perm, Russian Federation

## MICROBIAL DIVERSITY IN CLAY-SALT SLUDGE OF THE POTASH ENTERPRISE (BEREZNIKI, PERM KRAI)

From clay-salt sludge of the enterprise Berezniiki-2 of OJSC "Uralkali" (Berezniiki, Perm Territory) 138 bacterial strains were isolated and basing on morphological and genetic features have been combined in 28 morpho(genomo)groups. Representatives of each group have been identified while analyzing the nucleotide sequences of 16S rRNA gene, and comparative analysis showed that those strains belonged to the classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Actinobacteria*. All the bacteria studied are halotolerant, because they are capable of growing on media without NaCl supplementation and with increased salt concentration (up to 150 g/l). Most strains grew in alkaline conditions (pH 9.0) and utilized several mono- and polyaromatic compounds as a sole source of carbon, including polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates.

**Key words:** clay-salt sludge; phylogenetic diversity; bacteria-destructors of aromatic compounds; phthalates.

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВМКМС) Пермского края является одним из крупнейших среди разрабатываемых в мире. В результате деятельности калийных комбинатов предприятий ПАО «Уралкалий» (г. Соликамск и Березники, Пермский край) образуются значительные объемы глинисто-солевых шламов и избыточных рассолов, которые хранятся в специальных гидротехнических сооружениях – шламохранилищах. Формирование состава

шламов определяется, в первую очередь, составом добываемого сырья, а также технологическими факторами последующей рудоподготовки и обогащения, что обуславливает присутствие в них, наряду с легкорастворимыми хлоридными минералами, широкого спектра тяжелых металлов и органических соединений [Бачурин, Одинцова, 2009]. Основным источником последних являются используемые технологические химические реагенты и продукты их трансформации, главными веществ-

вами преобразования которых являются полиэтоксильные соединения (полигликоли, полиоксиалканола и их эфиры, диоксоланы, диоксаны и др.), гетероциклы, углеводородные структуры, включая полициклическую ароматику и фталаты [Бачурин, 2008; Бачурин, Одинцова, Первова, 2014].

По результатам эколого-геохимических исследований было обнаружено, что аккумулярованные в глинисто-солевых шламах органические поллютанты служат мощными источниками загрязнения природных экосистем благодаря их высокой геохимической подвижности и могут рассматриваться как потенциальные вторичные источники контаминации гидросферы – высвобождение их из связанного состояния может происходить при выщелачивании отходов атмосферными осадками [Бачурин, Одинцова, 2006; Бачурин, 2012; Бачурин, Сметанников, Хохрякова, 2014]. В связи с этим при такой комплексной нагрузке абиотических факторов на территории шламохранилищ возникают условия для формирования уникальных сообществ галофильных и галотолерантных микроорганизмов, в том числе способных разлагать экотоксиканты.

Ранее из шламов района солеразработок ВМКМС были выделены и охарактеризованы бак-

терии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов и фталатов родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus* [Плотникова и др., 2001, 2011; Ястребова и др., 2009; Пастухова и др., 2010; Корсакова, Пьянкова, Плотникова, 2013; Кандаурова, Ястребова, Плотникова, 2016]. Описаны новые таксоны архей и прокариот, выделенные из продуктов флотационного обогащения калийных минералов и техногенных вод шламохранилища ПАО «Уралкалий» [Реутских, Саралов, 2012; Саралов и др., 2012а, 2012б; Saralov et al., 2013].

Цель настоящей работы – изучение бактериального сообщества глинисто-солевых шламов калийного предприятия БКПРУ-2 ПАО «Уралкалий» в г. Березники (Пермский край).

## Материалы и методы исследования

**Образцы шламов.** В качестве материала для исследования были выбраны пять образцов, отобранных из шламохранилища калийного предприятия БКПРУ-2 ПАО «Уралкалий» (г. Березники) (табл. 1).

Таблица 1

**Характеристика образцов глинисто-солевых шламов**

№ образца шлама	Регистрационный №	Точка отбора, глубина отбора	Минерализация, мг/кг	ХБА*, мг/кг	НП**, мг/кг
1	219/1	Шлам из шурфа № 1, 0,3 м	26400	902.5	312.5
2	220/2	Шлам из шурфа № 1, 0,5 м	26400	817.5	265.0
3	221/3	Шлам из шурфа № 2, 0,2 м	22650	932.5	340.0
4	222/4	Шлам из шурфа № 3, 0,2 м	35800	1111.0	349.0
5	222/5	Шлам из шурфа № 3, 0,4 м	43000	н.о.***	н.о.

Примечание. \*ХБА – хлороформенный битумоид (компонент органического вещества, извлекаемый из горной породы органическим растворителем – хлороформом, без предварительной обработки соляной кислотой); \*\*НП – нефтепродукты; \*\*\* н.о. – не определяли [Бачурин, Одинцова, 2009].

**Для выделения и роста микроорганизмов** была использована минеральная среда Раймонда (MCP) (Raymond, 1961) с добавлением NaCl (50 г/л). Агаризованные среды получали при добавлении агара («Sigma», США) в концентрации 15 г/л. Для приготовления богатой среды Раймонда (BCP) в MCP добавляли 5 г/л триптона («Fluka», США) и 2.5 г/л дрожжевого экстракта («Difco», США) в качестве ростовых субстратов.

**Микробиологический анализ** образцов шламов проводили общепринятыми методами посева почвенной суспензии на агаризованную BCP с последующим подсчетом колоний микроорганизмов (колониеобразующих единиц, КОЕ) и выделением бактерий из единичных колоний для идентификации [Методы ..., 1991]. Биоразнообразие и плотность видов бактерий-деструкторов оценивали с помощью индексов Шеннона-Уивера, Симпсона и Менхеника, используя дифференцированный подсчет колоний, принадле-

жащих к разным морфо(геномо)типам [Широких и др., 2013; Орлова, 2013].

**Способность бактерий разлагать ароматические углеводороды** оценивали путем культивирования на агаризованной MCP (30 г/л NaCl) при 28°C с добавлением моно(поли)ароматических углеводородов («Fluka», США) в качестве единственного источника углерода и энергии. Нафталин, бифенил, бензол, толуол, фенол и дибутилфталат помещали на крышку перевернутой чашки Петри; орто-фталевую кислоту (о-ФК), бензойную (БК), пара-гидроксибензойную 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 углеводородами оценивали по сравнению с ростом на агаризованных средах того же состава без субстратов (контрольный вариант). Колонии диаметром менее 1 мм оценивали как «+», 1–2 мм – «++», более 3 мм – «+++».

**Рост микроорганизмов при изменении осмолярности среды.** Изучение устойчивости микроорганизмов к NaCl (0–200 г/л) проводили на агаризованной среде БСР, оценивая размер выросших колоний.

**Рост при разных значениях pH** определяли при концентрации  $\text{Na}^+$  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 [Герхардт и др., 1983].

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

**ДНК-типирование** полученных бактериальных изолятов проводили методом ВОХ-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся ВОХ-элементов) с использованием праймера ВОХА1R (5'-СТACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') в соответствии с методикой [Versalovic et al., 1994]. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1.5%-ном агарозном геле на 1 х TBE буфере (89 мМ Трис-НСl, 89 мМ борная кислота, 2,5 мМ ЭДТА, pH 8.2) в течение 2 ч. при напряжённости электрического поля 5.7 V/см и анализировали полученные фрагменты.

**Филогенетический анализ** полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Se-

quencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) в Пермском государственном национальном исследовательском университете (кафедра ботаники и генетики растений). Полученные нуклеотидные последовательности были проанализированы с использованием программ CLUSTAL W, Sequence Scanner v. 2.0, Mega v. 7.0. Поиск гомологичных последовательностей проводили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>).

## Результаты и их обсуждение

Методом прямого посева на агаризованную БСР с содержанием 50 г/л NaCl из образцов шламов было выделено 138 штаммов бактерий. Отбор осуществлялся на основе различий в морфологии колоний микроорганизмов, растущих на агаризованной среде. В результате были сформированы 34 морфологические группы, представители которых были взяты для проведения дальнейших исследований.

Проведена сравнительная характеристика представителей наиболее сходных морфогрупп с применением метода ВОХ-ПЦР. Анализ полученных ВОХ-ПЦР профилей фрагментов геномной ДНК исследуемых бактерий показал, что 22 штамма, близких по морфологическим признакам, принадлежат к 16 геномогруппам (рис. 1). Согласно полученным результатам, выделенные штаммы бактерий были объединены в 28 морфогеномогрупп, далее обозначенных как репрезентативные операционные таксономические единицы (ОТЕ).

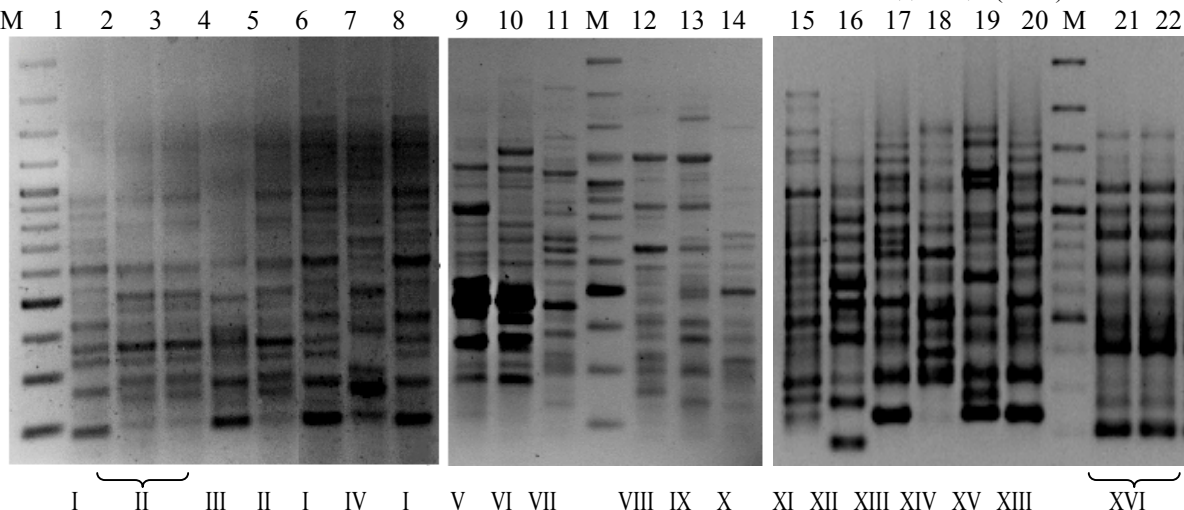


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ВОХ-ПЦР штаммов бактерий, изолированных из образцов шламов:

М – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва), 1 – ВО10; 2 – ВО11; 3 – ВО14; 4 – ВО22; 5 – ВО26; 6 – ВО36; 7 – ВО23; 8 – ВО8; 9 – ВО19; 10 – ВО34-1; 11 – ВО25; 12 – ВО9; 13 – ВО20; 14 – ВО35; 15 – ВО13; 16 – ВО27; 17 – ВО28; 18 – ВО29; 19 – ВО30; 20 – ВО31; 21 – ВО1; 22 – *Rhodococcus* sp. КТ723 (штамм-деструктор нафталина из рабочей коллекции Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН)

Была проведена статистическая оценка альфа-разнообразия представленных микробных сообществ с использованием индексов Шеннона-Уивера (придает большее значение уникальным ОТЕ) и Симпсона (общим ОТЕ), показавшая примерно равные показатели биоразнообразия и выравненности сообществ в исследуемых пробах. Однако, согласно проведенному анализу, образец шлама № 5 характеризуется гораздо большим биоразнообразием уникальных ОТЕ по индексу Шеннона-Уивера ( $H' = 1.316$ ) и меньшим значением общих ОТЕ ( $D = 0.319$ ) при сравнении с пробами № 1–4. Большое количество морфогеномогрупп, низкая численность изолированных бактерий и высокий уровень минерализации ( $43000 \text{ мг/кг}$ ) данной пробы могут быть непосредственно связаны с присут-

ствием галотолерантных и галофильных форм микроорганизмов (табл. 1). Расчет плотности видов (видового богатства) в сообществе по индексу Менхиника ( $D_{Mn}$ ) показал, что наибольшее значение данного параметра выявлено в образце шлама № 2, в котором, в свою очередь, была обнаружена высокая численность бактерий ( $7.84 \times 10^5$ ) и малое количество представленных морфотипов (табл. 2). Вероятно, что такие особенности связаны с параметрами данной пробы, а именно с отбором с глубины 0.5 м, на котором воздействие неблагоприятных биотических факторов снижается (в том числе вымывание бактерий из образца шлама атмосферными осадками), что обуславливает высокую численность обнаруженных бактерий.

Таблица 2

Анализ разнообразия микробных сообществ образцов шламов

Номер образца	Количество ОТЕ	Общая численность бактерий, КОЕ/1 г шлама	Индекс Менхиника ( $D_{Mn}$ )	Индекс Шеннона-Уивера ( $H'$ )	Индекс Симпсона ( $D$ )
1	13	$6.35 \times 10^6$	0.005	0.839	0.463
2	10	$7.84 \times 10^5$	0.011	1.077	0.469
3	15	$7.35 \times 10^6$	0.006	1.047	0.475
4	13	$2.72 \times 10^6$	0.008	0.996	0.482
5	14	$2.27 \times 10^6$	0.009	1.316	0.319

В результате сравнения последовательностей гена 16S рРНК (у 28 изолятов, представителей каждой морфогеномогруппы) с типовыми видами из базы данных EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>) установлено, что 7 культур являются представителями класса *Bacilli*, 8 штаммов относятся к классу

*Gamma proteobacteria*, 11 штаммов – к классу *Actinobacteria* и 2 штамма – к классу *Alphaproteobacteria*. Уровень сходства 16S рДНК изолятов с типовыми штаммами узаконенных видов находился в пределах 98.1–100% (табл. 3).

Таблица 3

Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изолированных бактерий

№ штамма	Типовой штамм	№ GenBank	Сходство, %	Количество нуклеотидов
BO1	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> NCIMB 13082 <sup>T</sup>	Z37138	99.9	800
BO2	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669 <sup>T</sup>	X79186	100	819
BO3	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 <sup>T</sup>	ABRX01000007	99.9	1426
BO4	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 <sup>T</sup>	X60616	99.3	908
BO5	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 <sup>T</sup>	ACNF01000156	100	915
BO6	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b <sup>T</sup>	AF234854	99.9	935
BO8	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>T</sup>	AB176954	98.7	1401
BO9	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 <sup>T</sup>	X79290	99.8	904
BO11	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>T</sup>	AB176954	99.0	1434
BO13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 <sup>T</sup>	AB008509	100	930
BO18	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b <sup>T</sup>	AF234854	100	923
BO19	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>T</sup>	X83408	100	1233
BO20	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 <sup>T</sup>	X79290	99.9	887
BO21	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>T</sup>	X83408	99.2	1388
BO22	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>T</sup>	AB176954	99.0	1438
BO23	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>T</sup>	AB176954	99.2	1404
BO24	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> KMM 1447 <sup>T</sup>	AB176954	99.2	1421
BO25	<i>Arthrobacter nicotiana</i> DSM 20123 <sup>T</sup>	X80739	99.1	1387
BO27	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 <sup>T</sup>	AB008509	99.2	769
BO28	<i>Paracoccus beibuensis</i> JLT1284 <sup>T</sup>	EU650196	98.1	1330
BO30	<i>Paracoccus beibuensis</i> JLT1284 <sup>T</sup>	EU650196	98.2	1330
BO32	<i>Pseudomonas monteilii</i> CIP 104883 <sup>T</sup>	AF064458	99.5	927
BO33	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 <sup>T</sup>	AB099708	99.0	604

Окончание табл. 3

№ штамма	Типовой штамм	№ GenBank	Сходство, %	Количество нуклеотидов
BO34-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 <sup>T</sup>	X83408	100	1401
BO35	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 <sup>T</sup>	X87756	99.7	972
BO37	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 <sup>T</sup>	CP001628	100	414
BO38	<i>Streptomyces somaliensis</i> NBRC 12916 <sup>T</sup>	AB184243	100	1392
BO141	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 <sup>T</sup>	AB021185	100	722

Согласно полученным результатам, преимущественным значением среди выделенных бактериальных штаммов обладали представители классов *Actinobacteria* и *Gamma proteobacteria*, а именно – бактерии родов *Dietzia* (31.77%) и *Stenotrophomonas* (46.11%), соответственно (рис. 2). Что характерно, наибольшим многообразием таксономических групп характеризовались микроорганизмы класса *Actinobacteria*, среди которых доминирующее положение занимали изоляты, филогенетически близкородственные к бактериям рода *Dietzia*. Менее многочисленными были бактерии родов *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* и *Streptomyces* (в порядке уменьшения количества КОЕ/1 г шлама).

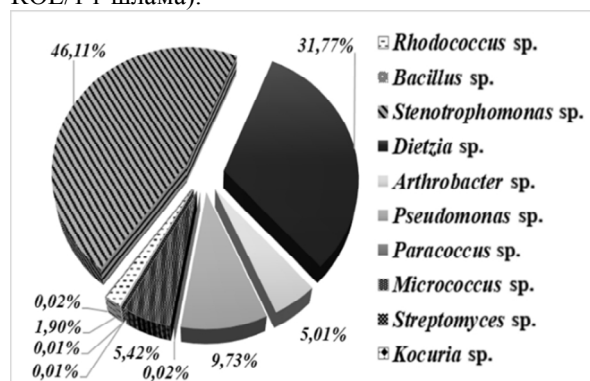


Рис. 2. Относительное содержание различных филогенетических групп (родов) бактерий классов *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli* и *Gamma proteobacteria*

В результате изучения биодegradационных свойств 28 штаммов (представителей сформированных ОТЕ) было выявлено семь наиболее активных штаммов-деструкторов (*Arthrobacter* spp. BO19, BO25, *Bacillus* spp. BO4, BO33, *Kocuria* sp. BO35, *Paracoccus* sp. BO28 и *Rhodococcus* sp. BO1), обладающих широкой субстратной специфичностью и способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии такие соединения, как нафталин, бифенил, орто-фталевую, бензойную, пара-гидроксibenзойную, салициловую кислоты, а также фенол, толуол и бензол. Стоит отметить, что большинство штаммов росли на моно- и полиароматических соединениях, но были также обнаружены бактерии (штаммы *Rhodococcus* sp. BO1, *Dietzia* sp. BO9, *Arthrobacter* spp. BO25, BO34-1, *Bacillus* sp. BO33), использующие в качестве субстрата широко используемое в химической промышленности, трудноразлагаемое и токсичное соединение – дибutilфталат (табл. 4).

Кроме того, было установлено, что все изолированные бактериальные культуры способны к росту на агаризованной среде как без добавления NaCl, так и с повышенной концентрацией соли (30–150 г/л), т.е. являются галотолерантными организмами [Кашнер, 1981]. Среди них присутствуют штаммы, обладающие способностью к росту при особенно высоких концентрациях хлорида натрия – до 150 г/л, а именно спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (табл. 5).

Таблица 4

Рост бактерий на ароматических углеводородах на агаризованной МСР

Штамм	Субстрат									
	Фен.	Бен.	Тол.	Наф.	Биф.	о-ФК	БК	СК	ПГБК	ДФФ
<i>Rhodococcus</i> sp. BO1	+++	++	+	+++	++	+++	+	++	+++	++
<i>Rhodococcus</i> sp. BO2	–	+++	++	++	++	++	+	++	+++	+
<i>Bacillus</i> sp. BO3	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. BO4	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	–
<i>Bacillus</i> sp. BO5	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO6	++	+	–	+	+	++	+	+	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO8	+	++	–	+	+	+	+	+	+	–
<i>Dietzia</i> sp. BO9	–	+	++	+	+	+++	+++	+	–	++
<i>Pseudomonas</i> sp. BO11	++	++	+	++	++	+++	+++	++	–	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. BO13	++	+	–	++	++	++	+	++	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO18	+	+	+	++	++	++	+	+	–	–
<i>Arthrobacter</i> sp. BO19	++	+	+	++	+	+++	++	++	++	–
<i>Dietzia</i> sp. BO20	++	++	+	+	+	–	+++	++	–	+
<i>Arthrobacter</i> sp. BO21	++	++	+	+	++	+	+++	++	++	–

Окончание табл. 4

Штамм	Субстрат									
	Фен.	Бен.	Тол.	Наф.	Биф.	о-ФК	БК	СК	ПГБК	ДБФ
<i>Pseudomonas</i> sp. BO22	++	++	–	+	++	++	+	++	+	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO23	+	++	–	++	++	–	+++	+	+	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO24	+	++	–	++	+	–	+++	++	+	–
<i>Arthrobacter</i> sp. BO25	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
<i>Stenotrophomonas</i> sp. BO27	++	++	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>Paracoccus</i> sp. BO28	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	+	+
<i>Paracoccus</i> sp. BO30	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO32	++	++	–	++	++	+	+	+	+++	–
<i>Bacillus</i> sp. BO33	++	+++	+	+	+	++	+	+	+	+++
<i>Arthrobacter</i> sp. BO34-1	–	+	–	+	++	++	+	+	+++	+++
<i>Kocuria</i> sp. BO35	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	–
<i>Micrococcus</i> sp. BO37	+++	+	–	++	++	++	+	+	+	–
<i>Streptomyces</i> sp. BO38	+++	+	–	++	++	++	+++	++	++	–
<i>Bacillus</i> sp. BO141	++	–	–	++	+++	+++	++	++	++	–

Примечание. Фен. – фенол; Бен. – бензол; Тол. – толуол; Наф. – нафталин; Биф. – бифенил; о-ФК – орто-фталевая кислота; БК – бензойная кислота; СК – салициловая кислота; ПГБК – пара-гидроксibenзойная кислота; ДБФ – дибутилфталат.

Таблица 5

## 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
<i>Rhodococcus</i> sp. BO1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	–	–
<i>Rhodococcus</i> sp. BO2	++	+++	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
<i>Bacillus</i> sp. BO4	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	+	–
<i>Bacillus</i> sp. BO5	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp. BO8	+++	+++	++	+	+	+	+	–	–	–
<i>Dietzia</i> sp. BO9	+	+++	++	++	+++	+	+	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO11	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	–	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. BO13	+++	+++	+++	+	+	+	+	–	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO18	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
<i>Arthrobacter</i> sp. BO19	+++	+++	++	+	+	+	+	–	–	–
<i>Dietzia</i> sp. BO20	+	+++	++	++	+	+	+	–	–	–
<i>Arthrobacter</i> sp. BO21	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO22	++	+++	++	++	+	+	+	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO23	++	+++	++	++	++	++	+	+	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO24	++	+++	++	++	++	++	+	+	–	–
<i>Arthrobacter</i> sp. BO25	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. BO27	+++	+++	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Paracoccus</i> sp. BO28	+++	+++	++	++	++	+	–	–	–	–
<i>Paracoccus</i> sp. BO30	+++	+++	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i> sp. BO32	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus</i> sp. BO33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
<i>Arthrobacter</i> sp. BO34-1	+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	–
<i>Kocuria</i> sp. BO35	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	–	–
<i>Micrococcus</i> sp. BO37	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	–
<i>Streptomyces</i> sp. BO38	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–
<i>Bacillus</i> sp. BO141	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	–

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

Также был исследован диапазон роста бактерий при различных значениях pH в среде культивирования и при различной температуре. Установлено, что значительная часть изолятов (*Bacillus* spp.

BO3, BO4, BO5, BO18, *Rhodococcus* sp. BO2, *Arthrobacter* sp. BO25, *Pseudomonas* sp. BO32) способна к эффективному росту при pH среды от 6,0 до 9,0. Штамм *Rhodococcus* sp. BO1 характеризо-

вался ростом в более широком диапазоне значений рН среды (от 5,0 до 9,0).

У ряда исследуемых штаммов (*Bacillus* spp. BO3, BO18, BO141, *Pseudomonas* spp. BO11, BO14, BO26, *Paracoccus* sp. BO30 и *Kocuria* sp. BO35) была отмечена способность к росту в диапазоне температур от +10°C до 45°C (с оптимумом роста 28°C), относящая их к термотолерантным микроорганизмам. При температуре ниже 10°C рост культуры не наблюдался или был незначительным.

Интересен тот факт, что среди изолированных бактерий встречаются штаммы, сходные по филогенетическому положению с одним и тем же типовым штаммом бактерий, но отличающиеся по ВОХ-ПЦР профилям фрагментов геномной ДНК, субстратной специфичности, а также способности к росту на средах с различными значениями рН и концентрации NaCl. Так, например, выявлено 5 штаммов (BO8, BO11, BO22, BO23, BO24), которые имеют наибольший процент сходства по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с типовым видом *Pseudomonas xanthomarina* КММ 1447Т, но при этом существенно различаются по утилизации ароматических соединений (табл. 4), а штамм *Pseudomonas* sp. BO11 может эффективно использовать в качестве единственного источника углерода орто-фталевую кислоту.

### Заключение

В результате исследования микробного сообщества образцов глинисто-солевых шламов из шламохранилища БКПРУ-2 ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край) получены новые данные по филогенетическому разнообразию культивируемых бактерий района Верхнекамского месторождения солей. Выделено 138 штаммов бактерий-деструкторов различных ароматических углеводов, в том числе фталатов. Филогенетический анализ показал принадлежность изолированных штаммов к трем классам: Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria и Actinobacteria; десяти родам: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* и *Streptomyces*. При изучении их биодegradационных свойств выявлено семь наиболее активных штаммов-деструкторов, способных использовать в качестве ростового субстрата различные углеводороды: нафталин, бифенил, фенол, толуол и бензол, бензойную, пара-гидроксибензойную, салициловую кислоты, а также фталаты (орто-фталат, дибутилфталат). Кроме того, показано, что все изоляты являются галотолерантами (растут в присутствии 100–150 г/л NaCl), а ряд из них – алкалофилами (растут в диапазоне значений рН до 9,0).

Таким образом, установлено, что в районах шламохранилищ сформированы уникальные мик-

робные сообщества, в состав которых входят солеустойчивые бактерии-деструкторы ароматических соединений, являющихся одними из характерных экотоксикантов отходов калийного производства. Выявленные активные галотолерантные бактерии-деструкторы фталатов, моно(поли)ароматических углеводов перспективны для дальнейшего изучения и использования при создании новых биотехнологий ремедиации территорий с высокой минерализацией и контаминацией стойкими органическими загрязнителями.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-44-590968 р\_а и Программами УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект №15-4-4-13) и «Фундаментальный базис инновационных технологий оценки, добычи и глубокой комплексной переработки стратегического минерального сырья» (проект №15-11-5-24).

### Библиографический список

- Бачурин Б.А. Эколого-геохимическая характеристика отходов калийного производства // Горный журнал. 2008. Т. 10. С. 88–91.
- Бачурин Б.А. Эколого-геохимические аспекты выщелачивания техногенно-минеральных образований горного производства // Материалы Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Геологическая эволюция взаимодействия воды с горными породами». 2012. С. 199–202.
- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Органическая геохимия техногенеза горнопромышленного профиля // Минералогия техногенеза. 2006. Т. 7. С. 265–284.
- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Отходы горнообогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2009. Вып. 7. С. 374–380.
- Бачурин Б.А., Одинцова Т.А., Первова Е.С. Эколого-геохимическая характеристика флотореагентов // Материалы II-й Всероссийской научной виртуальной онлайн-конференции «Химическая наука: современные достижения и историческая перспектива». 2014. С. 17–22.
- Бачурин Б.А., Сметанников А.Ф., Хохлаева Е.С. Эколого-геохимическая оценка продуктов переработки глинисто-солевых шламов калийного производства // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. С. 1–8.
- Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии. М.: Мир. 1983. Т. 1–3.
- Кандаурова Ю.М., Ястребова О.В., Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы орто-фталевой кислоты, выделенные из района добычи и перера-

- ботки калийных солей (г. Березники, Пермский край) // Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем». Киров, 2016. С. 329–332.
- Каширер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир. 1981. 365 с.
- Корсакова Е.С., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы стойких органических загрязнителей – эфиров фталевой кислоты, как основа для создания новых экобиотехнологий // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т. 15, № 3 (5). С. 1633–1636.
- Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
- Орлова Ю.С. Использование индексов биологического разнообразия для анализа альгофлоры бассейна р. Алатырь // Вестник Мордовского университета. 2013. Т. 3/4. С. 53–57.
- Пастухова Е.С. и др. Бактерии-деструкторы орто-фталевой кислоты, выделенные из отходов калийного производства // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2010. Вып. 3. С. 24–29.
- Плотникова Е.Г. и др. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. 2001. Т. 70, № 1. С. 61–69.
- Плотникова Е.Г. и др. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* – деструкторы полициклических ароматических углеводородов // Экология. 2011. № 6. С. 459–466.
- Рейтских Е.М., Саралов А.И. *Exiguobacterium* sp. RS34 – галоалкалолентная факультативно анаэробная неспорообразующая бактерия порядка *Vacillales* из шламоохранилища калийного рудника // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2012. Вып. 3. С. 49–53.
- Саралов А.И. и др. *Arhodomonas recens* sp. nov. – умеренно галофильная гаммапротеобактерия из рассолов флотационного обогащения калийных минералов // Микробиология. 2012а. Т. 81, № 5. С. 630–637.
- Саралов А.И. и др. *Halarchaeum solikamskense* sp. nov. – термо-толерантный нейтрофильный галоархэон из пенных продуктов флотационного обогащения калийных минералов // Микробиология. 2012б. Т. 81, № 5. С. 638–644.
- Широких И.Г. и др. Численность и структура комплексов почвенных актиномицетов в районе возможного влияния химически опасного объекта // Почвоведение. 2013. Т. 7. С. 860–866.
- Ястребова О.В. и др. Разнообразие бактерий, выделенных из района разработок месторождения калийных солей Верхнекамья // Вестник Пермского университета. 2009. Вып. 10 (36). Биология. С. 124–129.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinhydrocarbons // Developments in Industrial Microbiology. 1961. Vol. 2, № 1. P. 23–32.
- Saralov A.I. et al. *Haloferax chudinovii* sp. nov., a halophilic archaeon from Permian potassium salt deposits // Extremophiles. 2013. Vol. 17(3). P. 499–504.
- Versalovic J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // Methods in Molecular and Cellular Biology. 1994. Vol. 5(1). P. 25–40.

### References

- Bachurin B.A. [Ecological and geochemical characteristics of the potash production wastes]. *Gornyj žurnal*, V. 10 (2008): pp. 88–91. (In Russ.).
- Bachurin B.A. [Ecological and geochemical aspects of leaching technogenic mineral formations mining production]. *Materialy Vserossijskoj konferencii "Geologičeskaja ėvoljucija vzaimodejstvija vody s gornymi porodami"* [Materials of all-Russian conference with participation of foreign scientists "The geological evolution of the interaction of water with rocks"]. 2012, pp. 199–202. (In Russ.).
- Bachurin B.A., Odintsova T.A. [Organic Geochemistry of mining technogenesis profile]. *Mineralogija tehnogenesa*, V. 7 (2006): pp. 265–284. (In Russ.).
- Bachurin B.A., Odintsova T.A. [Wastes from mining and processing industry as sources of emission of organic pollutants]. *Gornyj informacionno-analitičeskij bjulleten'*, Iss. 7 (2009): pp. 374–380. (In Russ.).
- Bachurin B.A., Odintsova T.A., Pervova E.S. [Ecological and geochemical characteristics of flotation agents]. *Chimičeskaja nauka: sovremennye dostiženija i istoričeskaja perspektiva* [Materials of the II-nd All-Russian scientific virtual online conference "Chemistry: advancements and historical perspective"]. 2014, pp. 17–22. (In Russ.).
- Bachurin B.A., Smetannikov A.F., Khokhryakova E.S. [Ecological and geochemical evaluation of clay-salt slurries of potash ore production]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*, N 6 (2014): pp. 1–8. (In Russ.).
- Gerhardt F. *Metody obščej bakteriiologii* [Methods of General bacteriology]. Moscow, Mir Publ., 1983. V. 1–3. (In Russ.).
- Kandaurova Yu.M., Yastrebova O.V., Plotnikova E.G. [The bacteria-destroyers of ortho-phthalic acid, isolated from the area of extraction and processing of potassium salts. Berezniki, Perm region]. *Biodiagnostika sostojanija prirodnyh i prirodno-technogennyh sistem* [Materials of XIV All-Russian scientific-practical conference with



- international participation "Biodiagnostics of natural and man-made-technogenic systems"]. Kirov, 2016, pp. 329–332. (In Russ.).
- Korsakova E.S., Pyankova A.A., Plotnikova E.G. [Bacteria-destroyers of persistent organic pollutants – phthalic acid esters, as a basis for the creation of new ecobiotechnology]. *Izvestija Samarskogo naučnogo centra RAN*, V. 15, N 3(5) (2013): pp. 1633–1636. (In Russ.).
- Kushner, D.J. *Žizn' mikrobov v ěkstreml'nyh uslovijach* [Microbial Life in Extreme Environments]. Moscow, Mir Publ., 1981. 365 p. (In Russ.).
- Orlova Yu.S. [The use of indices of biological diversity for analysis of algal flora of the Alaty river basin]. *Vestnik Mordovskogo universiteta*, V. 3/4 (2013): pp. 53–57. (In Russ.).
- Pastukhova E.S., Egorova D.O., Yastrebova O.V., Plotnikova E.G. [Bacteria-destroyers of orthophthalic acid isolated from the potassium production wastes]. *Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologija*, Iss. 3 (2010): pp. 24–29. (In Russ.).
- Plotnikova E.G., Altyntseva O.V., Kosheleva I.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Gavrish E.U., Demakov V.A., Boronin A.M. [Bacteria Decomposing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Isolated from Soil and Bottom Sediments in the Region of Salt Mines]. *Mikrobiologija*, V. 70, N 1 (2001): pp. 61–69. (In Russ.).
- Plotnikova E.G., Yastrebova O.V., Anan'ina L.N., Dorofeeva L.V., Lysanskaya V.Ya., Demakov V.A. [Halotolerant bacteria of the genus *Arthrobacter* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons]. *Ėcologija*, N 6 (2011): pp. 502–509. (In Russ.).
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinhydrocarbons. *Developments in Industrial Microbiology*, V. 2, N 1 (1961): pp. 23–32.
- Reutskikh E.M., Saralov A.I. [*Exiguobacterium* sp. RS34 - haloalkalitolerant facultatively anaerobic non-sporulating bacterium of *Bacillales* order isolated from sludge warehouse of potash mining]. *Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologija*, Iss. 3 (2012): pp. 49–53. (In Russ.).
- Saralov A.I., Reutskikh E.M., Kuznetsov B.B., Baslerov R.V., Panteleeva A.N., Suzina N.E. [*Archodomonas recens* sp. nov., a halophilic alkane-utilizing hydrogen-oxidizing bacterium from the brines of flotation enrichment of potassium minerals]. *Mikrobiologija*, V. 81, N 5 (2012): pp. 582–588. (In Russ.).
- Saralov A.I., Reutskikh E.M., Baslerov R.V., Kuznetsov B.B. [*Halarchaeum solikamskense* sp. nov., a thermotolerant neutrophilic haloarchaeon from the foamy products of flotation enrichment of potassium minerals]. *Mikrobiologija*, V. 81, N 5 (2012): pp. 589–595. (In Russ.).
- Saralov A.I., Baslerov R.V., Kuznetsov B.B. [*Haloferax chudinovii* sp. nov., a halophilic archaeon from Permian potassium salt deposits]. *Extremophiles*, V. 17 (3) (2013): pp. 499–504.
- Shirokikh I.G., Tovstik E.V., Dabagh E.V., Ashikhmina T.Y. [The size and structure of the complexes of soil actinomycetes in the area of possible influence of a chemical dangerous object]. *Počvovedenie*, V. 7 (2013): pp. 860–866. (In Russ.).
- Versalovic J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 1994. V. 5(1). P.25–40.
- Yastrebova O.V., Ananyina L.N., Pastukhova (Korsakova) E.S., Plotnikova E.G. [The study of bacteria, isolated from the salt mining of Upper-Kama potassiummagnesium salt deposit]. *Vestnik Permskogo universiteta*, Iss. 10 (Biology) (2009): pp. 124–129. (In Russ.).
- Zvyagintsev D.G., ed. *Metody počvennoj mikrobiologii i biochimii* [Methods of Soil Microbiology and Biochemistry: Textbook]. Moscow: Moscow State University Publ., 1991. 304 p. (In Russ.).

Поступила в редакцию 26.12.2016

### Об авторах

Корсакова Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0002-6907-7562  
 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; korsakovaekaterina08@gmail.com; (342)2808431  
 доцент кафедры ботаники и генетики растений ФГБОУВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»  
 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

### About the authors

Korsakova Ekaterina Sergeyevna, candidate of biology, junior researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS  
**ORCID:** 0000-0002-6907-7562  
 13, Golev str., Perm, Russia, 614081; korsakovaekaterina08@gmail; (342)2808431  
 associate professor of the Department of botany and plant genetics  
 Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Шестакова Елена Анатольевна, инженер  
лаборатории молекулярной микробиологии и  
биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроор-  
ганизмов УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0002-3494-2886  
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;  
sheanton@mail.ru; (342)2808431

Одинцова Татьяна Анатольевна, кандидат  
технических наук, старший научный сотрудник  
лаборатории геоэкологии горнодобывающих  
регионов  
ФГБУН Горный институт УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0001-8316-9327  
614007, г. Пермь, ул. Сибирская, 78-а;  
eco\_chemi@mi-perm.ru; (342)2160196

Бачурин Борис Александрович, кандидат  
геолого-минералогических наук, доцент,  
заведующий лабораторией геоэкологии  
горнодобывающих регионов  
ФГБУН Горный институт УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0001-7200-2986  
614007, г. Пермь, ул. Сибирская, 78-а;  
bba@mi-perm.ru; (342)2167502

Плотникова Елена Генриховна, доктор  
биологических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории молекулярной микробиологии и  
биотехнологии  
ФГБУН Институт экологии и генетики микроор-  
ганизмов УрО РАН  
**ORCID:** 0000-0002-0107-0719  
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;  
peg\_el@mail.ru; (342)2808431  
профессор кафедры ботаники и генетики расте-  
ний  
ФГБОУВО «Пермский государственный нацио-  
нальный исследовательский университет»  
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Shestakova Elena Anatol'evna, engineer of  
laboratory of molecular microbiology and  
biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of  
Microorganism UB RAS  
**ORCID:** 0000-0002-3494-2886  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
sheanton@mail.ru; (342)2808431

Odintsova Tatiana Anatoljevna, Candidate of  
Technical Sciences, senior scientist researcher of the  
laboratory of geoecology mining regions  
Mining institute UB RAS  
**ORCID:** 0000-0001-8316-9327  
78A, Sibirskaya str, Perm, Russia, 614007;  
eco\_chemi@mi-perm.ru; (342)2160196

Bachurin Boris Aleksandrovich, candidate of  
geological-mineralogical sciences, associate of  
professor, head of the laboratory of geoecology  
mining regions  
Mining institute UB RAS  
**ORCID:** 0000-0001-7200-2986  
78A, Sibirskaya str, Perm, Russia, 614007;  
bba@mi-perm.ru; (342) 216-75-02

Plotnikova Elena Genrikhovna, doctor of biology,  
leading researcher of laboratory of molecular  
microbiology and biotechnology  
Institute of Ecology and Genetics of  
Microorganism UB RAS  
**ORCID:** 0000-0002-0107-0719  
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;  
peg\_el@mail.ru; (342)2808431  
professor of the Department of botany and plant  
genetics  
Perm State University.  
15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990



