

УДК 579:873:579.222.2

ДЕСТРУКЦИЯ ДИБУТИЛФТАЛАТА ГАЛОТОЛЕРАНТНЫМ ШТАММОМ *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt

© 2025 г. О. В. Ястребова^{1,*}, А. А. Пьянкова¹, А. В. Назаров¹, Ю. И. Нечаева¹,
Е. С. Корсакова¹, Е. Г. Плотникова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: olyastr@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2024 г.

После доработки 21.12.2024 г.

Принята к публикации 10.01.2025 г.

Дибутилфталат (ДБФ) — ди-н-бутиловый эфир *орто*-фталевой кислоты, широко используется в химической промышленности в качестве пластификатора и является распространенным загрязнителем окружающей среды. Исследована способность галотолерантного штамма *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt (ВКМ Ас-3035), выделенного из ризосферной почвы района солеразработок (Пермский край, Россия), использовать ДБФ в качестве единственного источника углерода и энергии. Штамм NKDBFgelt способен к росту на ДБФ и *орто*-фталевой кислоте (ОФК) — ключевом метаболите деградации ДБФ, при повышенном засолении среды (до 30 и 50 г/л NaCl соответственно), а также к росту на ДБФ в высокой концентрации — до 9 г/л. Штамм осуществлял разложение 75.2% ДБФ (начальная концентрация 200 мг/л) к 72 ч культивирования в отсутствии соли, но при повышенном засолении среды (30–70 г/л NaCl) зарегистрирована деградация ДБФ на уровне 27.8–66.95%. Анализ генома штамма NKDBFgelt выявил кластеры генов, участвующих в разложении ДБФ, ОФК, бензойной кислоты, а также гены, кодирующие ферменты основных путей деградации ароматических соединений. Галотолерантный штамм *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt имеет высокий деградативный потенциал и перспективен при разработке новых биотехнологий восстановления почв, загрязненных сложными эфирами фталевой кислоты.

Ключевые слова: *Pseudarthrobacter*, дибутилфталат, *орто*-фталевая кислота, разложение, хлорид натрия, полный геном

DOI: 10.31857/S0555109925030064 **EDN:** FNVHRW

Фталаты представляют собой промышленные химикаты, которые в основном используются в качестве пластифицирующих добавок для повышения эластичности, морозоустойчивости и долговечности пластмасс. Сложные эфиры фталевой кислоты (ЭФК), в частности дибутилфталат (ДБФ), диэтилфталат (ДЭФ), диметилфталат (ДМФ), широко применяются в промышленном производстве полиэфирных волокон, медицинских и строительных материалов, пищевых пленок, виниловых полимеров и других потребительских товаров. В последнее десятилетие мировое производство фталатов увеличилось почти до 6 миллионов т в год [1, 2]. Пластифицирующие добавки растворяются в полимерных пластиковых смолах, при этом ковалентно не связываются с полимерной основой

и могут легко выщелачиваться в окружающую среду. Эфиры фталевой кислоты, в частности ДБФ, являются одними из наиболее часто обнаруживаемых в окружающей среде стойких органических загрязнителей. Данные соединения могут адсорбироваться почвой и взвешенными твердыми частицами [1, 3]. Агентство по охране окружающей среды США (US EPA) включило шесть ЭФК, в том числе ДБФ, в приоритетные загрязнители окружающей среды, вызывающие нарушение работы эндокринной системы и представляющие опасность для здоровья человека [2].

Вследствие широкого использования пластиковых материалов, ЭФК часто обнаруживаются в сельскохозяйственных почвах разных стран Европы и регионов Китая, где их концентрация

в основном варьируется от 0.05 до 10.4 мг/г почвы, при этом концентрация ДБФ в почве может достигать 57.7 мг/кг, что значительно выше, чем концентрация других ЭФК [4, 5]. Накопление ДБФ негативно влияет на характеристики почвы, резко изменяет численность и состав микробиома ризосферы, оказывает отрицательное воздействие на рост и развитие растений [6, 7]. Есть данные о способности ризосферных бактерий разлагать ДБФ, что способствует снижению концентрации данного экополлютанта в почве [7, 8]. ДБФ в значительных концентрациях обнаружен в почвах и глинисто-солевых шламах на территории соледобывающего производства, ведущего разработки в районе Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС, Пермский край, Россия) [9, 10].

Способность к деградации ЭФК обнаружена у бактерий, выделенных из различных экосистем, подверженных антропогенному загрязнению, в том числе из почв, активного ила, морских и речных донных отложений [2, 11, 12]. Бактериальное разложение сложных эфиров фталевой кислоты (ДБФ, ДМФ, ДЭФ) изучено у бактерий различных таксономических групп, в частности родов *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Methylobacillus* [12–15]. Известна способность к деструкции ДБФ у ряда штаммов семейства *Micrococcaceae*, в частности, штаммов рода *Arthrobacter* [16–18], а также бактерий родов *Pseudarthrobacter* [19], *Paenarthrobacter* [20], *Glutamicibacter* [21]. Известно, что метаболический путь биodeградации ДБФ включает несколько этапов: ДБФ гидролизуетс с образованием монобутилфталата, который трансформируется до орто-фталевой кислоты (ОФК). Разложение ОФК осуществляется с образованием протокатеховой кислоты (ПКК), которая далее метаболизируется через расщепление бензольного кольца по орто- или мета-пути [15, 21, 22]. Для грамположительных бактерий, в частности, штамма *Arthrobacter keyseri* 12В, показано, что деструкция ОФК до ПКК осуществляется через образование цис-3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталата и 3,4-дигидроксифталата в качестве метаболитов [22]. Для штамма *Glutamicibacter* sp. 0426 показана возможность утилизации ДБФ с образованием на начальном этапе бутилметилфталата и бутановой кислоты, ОФК, бензойной кислоты и катехола в качестве метаболитов [21].

К настоящему времени лишь в немногих источниках представлено исследование бактериальной деградации ЭФК в условиях засоления. Так, описаны солеустойчивые бактерии-деструкторы ДБФ родов *Sphingobium* [23], *Pseudomonas* [24], *Rhodococcus* [25].

Цель данной работы — исследование генетических характеристик и способности к деградации штамма *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt, выделенного из ризосферной почвы района солеразрабо-

ток (Пермский край, Россия), способного использовать ДБФ в качестве единственного источника углерода и энергии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Бактериальный штамм NKDBFgelt выделен из образца ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), произрастающего на засоленной почве района промышленных разработок ВМКМС (Соликамск, Россия). Штамм был выделен методом накопительного культивирования образца ризосферной почвы в минеральной среде с ДБФ в качестве субстрата [26].

Среды и условия культивирования. Культивирование бактерий проводилось в минеральной среде 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, 2 мл/л 1%-ного раствора $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 1 мл/л 1%-ного раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [27]. Бактериальные культуры выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды — 100 мл) при 28°C, на термокачалке при 150 об./мин.

В качестве субстратов использовали дибутилфталат (ДБФ) (“Sigma-Aldrich”, США), бутанол, орто-фталевую кислоту (ОФК), протокатеховую кислоту (ПКК), бензойную и салициловую кислоты (БК и СК), нафталин (“Fluka”, США) в концентрации 1.0 г/л.

Для приготовления богатой среды Раймонда (БСР) в минеральную среду Раймонда [27] добавляли 5 г/л триптона (“VWR Life Science Amresco”, США) и 2.5 г/л дрожжевого экстракта (“Biospringer”, Франция) в качестве субстратов.

Ростовые характеристики штамма NKDBFgelt. Рост штамма при различных концентрациях NaCl в среде культивирования изучали при периодическом культивировании в жидких средах МСР и БСР без NaCl в среде и при концентрациях 30, 50, 70 и 100 г/л соли.

Рост штамма при разных концентрациях ДБФ оценивали в среде МСР, в которую вносили ДБФ в концентрациях 1, 3, 5, 7, 9 г/л.

В качестве инокулята использовали культуру в экспоненциальной фазе роста, выращенную на среде МСР с ОФК (1 г/л) в качестве субстрата.

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.

Расчет удельной скорости роста (μ , ч^{-1}) проводили по стандартной формуле: $\mu = (\ln B_2 - \ln B_1) / (t_2 - t_1)$, где B_1 и B_2 — оптические плотности культуры в моменты времени t_1 и t_2 соответственно [28].

Деструкция ДБФ и определение продуктов его разложения. Штамм выращивали в жидкой МСР, содержащей 30 г/л NaCl и ОФК (1 г/л), в течение 72 ч при 28°C на шейкере (150 об./мин). Клетки собирали центрифугированием (5200 g, 5 мин) и отмывали МСР. Отмытые дважды клетки ($ОП_{600} = 2.0$) инокулировали в 1 мл МСР с ДБФ (200⁶⁰⁰ мг/л), не содержащей хлорид натрия и в присутствии 0, 30, 50, 70 г/л NaCl, помещали в стеклянные флаконы ("Sigma-Aldrich", Германия) объемом 4 мл, закрытые тефлон-содержащими крышками и инкубировали при 28°C при аэрации на роторном шейкере (150 об./мин). Концентрацию ДБФ, монобутилфталата (МБФ) и ОФК определяли после 0, 6, 24, 48 и 72 ч культивирования во всем объеме среды. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

Оценку разложения ДБФ и наличие МБФ осуществляли методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Экстракцию ДБФ проводили равным объемом гексана в течение 120 мин на шейкере при 100 об./мин. Остаточную воду удаляли из образцов путем введения безводного сульфата натрия. Анализ проводили на газовом хроматографе-масс-спектрометре "Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI" (США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS SN US 15189741-1 (30 × 0.25 мм), газ-носитель — гелий (1 мл/мин), температура испарителя — 230°C, объем пробы — 0.2 мкл. Анализ хроматограмм проводили с помощью программы MassHunter Workstation Qualitative Analysis 10.0 ("Agilent", США). Расчет концентрации анализируемых веществ осуществляли по площадям пиков в сравнении с площадью пиков контрольного образца.

Наличие ОФК в среде культивирования определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC-20AD Prominence ("Shimadzu", Япония) с колонкой (C-18150 × 4.6 мм, "Shima-Aldrich", США) и УФ-детектором SPD-20A (при 205 нм) в системе ацетонитрил — 0.1%-ная H₃PO₄ (70 : 30). В качестве подвижной фазы использовали 80%-ный раствор ацетонитрила при скорости потока 1.0 мл/мин и температуре 40°C. Идентификацию проводили при сравнении времени выхода пиков экстрактов со стандартными растворами ОФК в концентрациях 50 и 100 мг/л, время удерживания (*t_R*) ОФК составляло 5.9 мин. Количественное содержание рассчитывали с помощью пакета программ "LCsolution" ("Shimadzu", Япония).

Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit ("QIAGEN", Германия), следуя протоколу производителя.

Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ. Секвенирование штамма выполняли на приборе SURFSeq 5000 ("GeneMind", Китай).

Сборка генома была проведена с помощью SPAdes 3.15.4 [29]. Оценка качества и обрезка ридов выполнена с помощью программ FastQC v0.11.7 [30] и Trimmomatic v0.39 [31]. Сборка плазмиды осуществлялась с применением plasmidSPAdes [32]. Предсказание и аннотация генов выполнена с помощью Bakta [33], дополнительно аннотация генов проведена с использованием Clusters of Orthologous Groups (COG) [34] и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [35]. Для поиска гомологичных белков использовался BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика штамма NKDBFgelt. Штамм был выделен из образца ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), произрастающего на засоленной почве вблизи солеотвала (Соликамск, Россия). Минерализация образца почвы составила 4.81 г/кг [26].

По морфолого-физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам исследуемый штамм NKDBFgelt был отнесен к бактериям семейства *Micrococcaceae*. На основе анализа гена 16S рРНК установлено, что штамм имел наибольшее сходство (на уровне 99.83%) с двумя типовыми штаммами видов *Pseudarthrobacter oxydans* и *Pseudarthrobacter polychromogenes* [26]. В базе данных GenBank ген 16S рРНК штамма NKDBFgelt зарегистрирован под номером PQ579963.

При проверке штамма NKDBFgelt к использованию ряда ЭФК и ароматических соединений в качестве единственного источника углерода и энергии показана способность штамма к эффективному росту на ДБФ и возможных продуктах разложения ДБФ — орто-фталевой, протокатеховой и бензойной кислотах. Штамм NKDBFgelt не способен к росту на бутаноле. Известно, что на ранних этапах биodeградации возможна деэтерификация ДБФ с образованием монобутилфталата, который метаболизируется до ОФК с дальнейшей ее деструкцией оксидазами с образованием ПКК [15, 21]. На примере штамма-деструктора ДБФ *Glutamicibacter* sp. 0426 показано, что декарбоксилирование ОФК может проходить с образованием БК, которая под действием бензоат-4-монооксигеназы метаболизируется до 4-гидроксibenзоата, а затем — до ПКК [21].

Рост штамма NKDBFgelt при высоких концентрациях ДБФ. Показано, что штамм способен к росту на ДБФ в качестве субстрата в концентрации до 9 г/л. Наиболее высокие значения плотности культуры (0.9 ед.) и наиболее высокая удельная скорость роста ($\mu = 0.022 \pm 0.003$ ч⁻¹) зафиксирована

ны в среде с 3 г/л ДБФ. Повышение концентрации субстрата приводило к снижению удельных скоростей роста и максимальных значений оптической плотности штамма (рис. 1; табл. 1). Большинство описанных в литературе бактерий-деструкторов ДБФ, в том числе рода *Pseudarthrobacter*, растут на ДБФ в концентрации до 1.2 г/л [16–19]. Известны штаммы бактерий *Methylobacillus* sp. V29b, *Bacillus* sp. NCIM 5220, способные к росту на ДБФ в концентрации 2 г/л [12, 15].

Рост штамма NKDBFgelt в присутствии высоких концентраций соли. Поскольку штамм NKDBFgelt выделен из техногенно-засоленной почвы, исследована его способность к росту при повышенных концентрациях соли (NaCl) в разных средах: в БСР и в минеральной среде (МСР) с ДБФ и ОФК в качестве субстратов (рис. 2; рис. 3; табл. 2).

Показано, что штамм способен к росту в БСР в присутствии до 110 г/л NaCl. Наиболее высокие значения плотности культуры и удельной скорости роста ($OP_{600} = 2.25$ ед.; $\mu = 0.08 \pm 0.002$ ч⁻¹) наблюдались в полноценной среде без добавления соли. В средах с концентрацией соли до 110 г/л для штамма показано увеличение длительности лаг-фазы

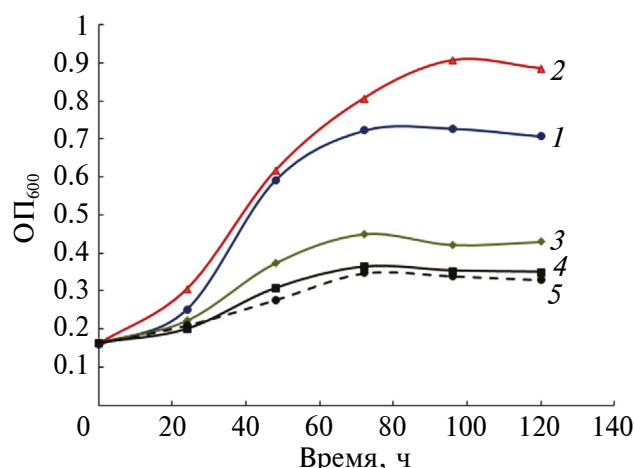


Рис. 1. Рост штамма NKDBFgelt в МСР с разными концентрациями ДБФ (г/л): 1 — 1.0; 2 — 3.0; 3 — 5; 4 — 7.0; 5 — 9.0.

роста, снижение значений удельной скорости роста и оптической плотности культуры. Максимальное значение оптической плотности культуры при культивировании штамма в присутствии 110 г/л NaCl составило 1.29 ед. В среде культивирования с добавлением 120 г/л NaCl рост штамма отсутствовал. На основании полученных данных штамм NKDBFgelt может быть отнесен к галотолерантным микроорганизмам по классификации Кашнера [37]. Из немногочисленных сообщений известна устойчивость бактерий рода *Pseudarthrobacter* к повышенному засолению среды, в частности описан ризосферный штамм *Pseudarthrobacter* sp. BF2P4-5, способный к росту в полноценных средах, содержащих до 200 г/л NaCl [38, 39].

При культивировании штамма NKDBFgelt в МСР с ОФК в качестве субстрата повышение концентрации NaCl в среде приводило к более существенному снижению ростовых параметров, чем в полноценной среде. Установлено, что штамм способен к росту в МСР с ОФК в качестве субстрата в присутствии до 50 г/л NaCl. Наиболее высокая плотность культуры и удельная скорость роста штамма на ОФК ($\mu = 0.031 \pm 0.003$ ч⁻¹) наблюдалась в среде без добавления соли. С повышением концентрации соли в среде увеличивалась длительность лаг-фазы роста, снижалась плотность и удельная скорость роста культуры (рис. 3; табл. 2). Штамм рос на ДБФ (1 г/л) в среде в присутствии 30 г/л NaCl. Наиболее высокая плотность культуры штамма наблюдалась в среде без добавления соли (табл. 2). В литературе описан деструктор фенантрена *Pseudarthrobacter* sp. L1SW, способный к росту на ОФК (0.4 г/л), а также к росту в минеральной среде, содержащей до 10 г/л NaCl [40], а также штамм *Sphingobium* sp. TJ, способный к росту на ДБФ (0.5 г/л) в присутствии до 40 г/л NaCl [23]. Известно, что высокое засоление среды подавляет рост бактериальных культур вследствие осмотического и токсического стресса [37, 40]. Отсутствие роста штамма NKDBFgelt на ДБФ при более низком засолении среды, чем при выращивании в полноценной среде, указывало также на негативное воздействие солености на процесс разложения ДБФ и его метаболитов.

Таблица 1. Параметры роста штамма NKDBFgelt при разных концентрациях ДБФ

ДБФ, г/л	Удельная скорость роста (ч ⁻¹)	Максимальное значение OP_{600}	Лаг-фаза роста (ч)
1	0.022 ± 0.001	0.721	24
3	0.022 ± 0.003	0.905	24
5	0.015 ± 0.003	0.45	24
7	0.012 ± 0.002	0.36	24
9	0.010 ± 0.001	0.34	24

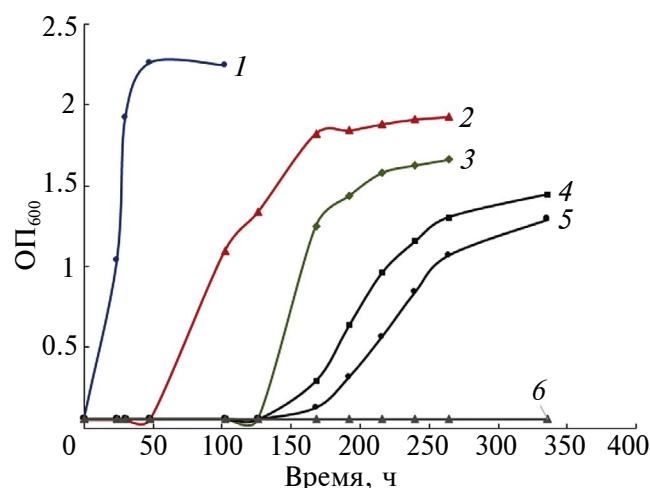


Рис. 2. Рост штамма NKDBFgelt в БСР с разными концентрациями NaCl (г/л): 1 — без NaCl; 2 — 70; 3 — 90; 4 — 100; 5 — 110; 6 — 120.

Деструкция ДБФ штаммом NKDBFgelt. Изучена деструкция ДБФ в концентрации 200 мг/л штаммом NKDBFgelt без NaCl в среде культивирования и в условиях засоления в эксперименте с отмытыми клетками (рис. 4). Установлено, что в среде без соли штамм утилизировал 75.2% ДБФ к 72 ч культивирования. В литературе описана способность бактерий семейства *Micrococcaceae* к разложению ДБФ. Так, известны штаммы рода *Arthrobacter*, способные к частичной или полной деструкции ДБФ в концентрации до 1 г/л [14–17].

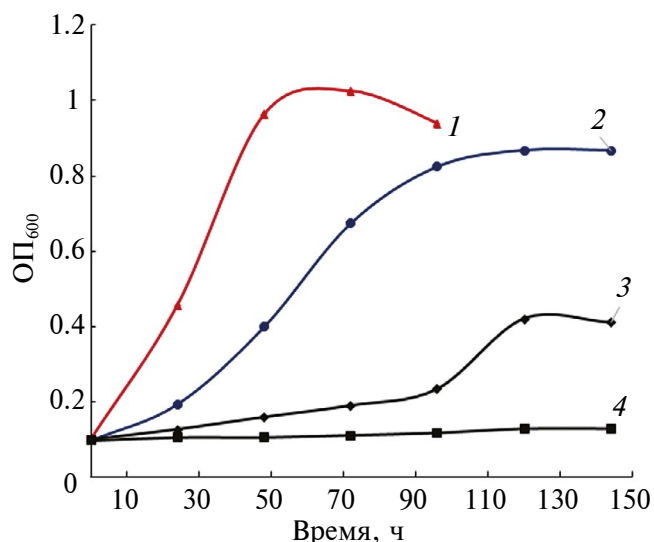


Рис. 3. Рост штамма NKDBFgelt в МСР с ОФК с разными концентрациями NaCl (г/л): 1 — без NaCl; 2 — 30; 3 — 50; 4 — 70.

Описан штамм *Pseudarthrobacter* sp. E5, который разлагает ДБФ в концентрации 200 мг/л за 48 ч [19], а также штамм *Glutamicibacter* sp. 0426, осуществляющий деструкцию ДБФ в концентрации 300 мг/л за 12 ч [21].

Повышение содержания хлорида натрия в среде до 30, 50 и 70 г/л приводило к снижению уровня деградации ДБФ штаммом NKDBFgelt. В присутствии 30 г/л NaCl клетками штамма осуществлялась деструкция 66.95% ДБФ за 72 ч. При содер-

Таблица 2. Параметры роста штамма NKDBFgelt в БСР и в минеральной среде с ОФК и ДБФ при разных концентрациях NaCl

Субстрат	NaCl (г/л)	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Максимальное значение OP_{600}	Лег-фаза роста (ч)
БСР	0	0.08 ± 0.002	2.25	0
	70	0.03 ± 0.003	1.92	48
	90	0.05 ± 0.003	1.66	126
	100	0.02 ± 0.001	1.44	126
	110	0.017 ± 0.004	1.29	168
ОФК	0	0.031 ± 0.003	1.025	0
	30	0.020 ± 0.003	0.867	96
	50	0.024 ± 0.003	0.418	96
ДБФ	0	0.024 ± 0.003	0.90	0
	30	0.025 ± 0.003	0.72	0

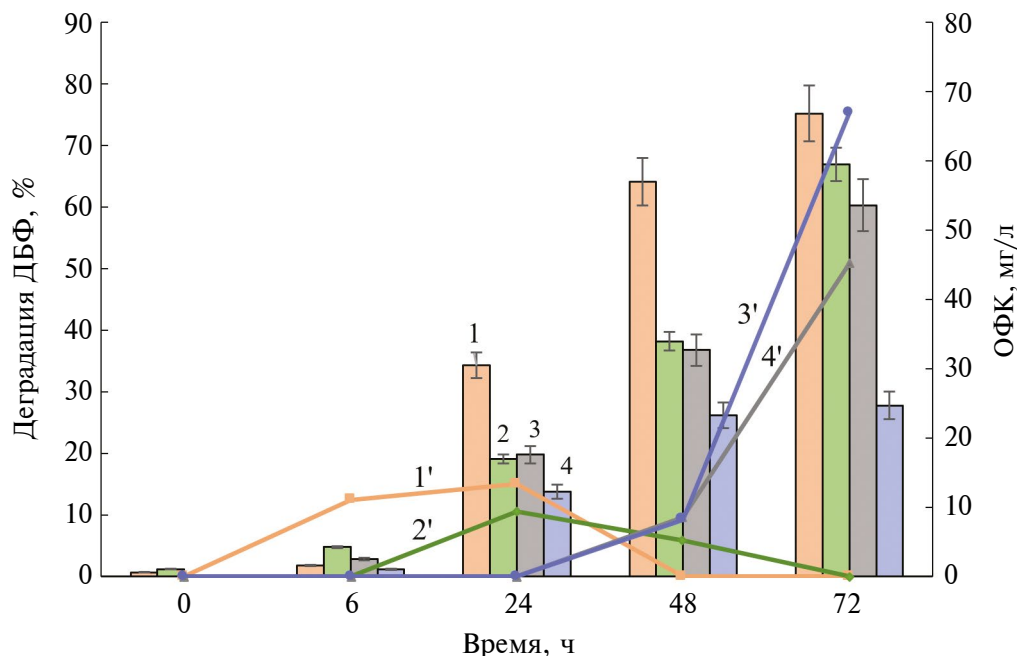


Рис. 4. Разложение ДБФ (%) 1–4) и содержание ОФК (мг/л, 1'–4') в среде при культивировании штамма NKDBFgelt при разных концентрациях NaCl: 1, 1' — без NaCl; 2, 2' — 30; 3, 3' — 50; 4, 4' — 70 г/л.

жании 50 и 70 г/л NaCl в среде, деградация ДБФ составила 60.27 и 27.8% соответственно (рис. 4).

При культивировании штамма NKDBFgelt с ДБФ методом ГХ-МС не удалось идентифицировать монобутилфталат — первый продукт деструкции ДБФ [15, 22], предположительно, из-за быстрого его разрушения клетками штамма и низкой концентрации в среде.

В экспериментах с отмытыми клетками методом ВЭЖХ зафиксировано наличие ОФК — возможного метаболита бактериальной деструкции ДБФ [21, 22]. С возрастанием солёности среды, к 72 ч культивирования происходило повышение концентрации ОФК в среде культивирования в присутствии 50 и 70 г/л NaCl до 45.0 и 67.0 мг/л соответственно (рис. 4). Можно предположить, что увеличение солёности оказывает более негативное воздействие на процесс деструкции ОФК клетками штамма, чем на гидролиз ДБФ до ОФК.

Изучение способности бактерий к росту и деградации ЭФК в условиях повышенного засоления представлено в немногих сообщениях. В частности, описан штамм *Acinetobacter baumannii* DP-2, способный к деградации 85.8% ДБФ (9.8 мг/л) при концентрации 5 г/л NaCl в среде [36], штамм *Pseudomonas fluorescens* B-1, утилизирующий бутилбензилфталат (10 мг/л) при содержании 150 г/л NaCl в среде культивирования [24], а также штамм *Rhodococcus ruber* YC-YT1, растущий на ди-(2-этилгексил)фталате (0.1 г/л) при концентрации NaCl до 120 г/л. [25]. Галотолерантный штамм *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt способен

к эффективному росту на ДБФ (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии в присутствии 30 г/л соли и деградации ДБФ (200 мг/л) в присутствии 30–70 г/л NaCl.

Геномный анализ штамма *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt. В ходе проведения полногеномного секвенирования штамма NKDBFgelt была произведена сборка генома *de novo*, собрано 416 контигов. Геном штамма NKDBFgelt представлен кольцевой хромосомой и одной плазмидой. Общая длина генома штамма составила 4548770 п.н., состав пар Г + Ц в ДНК — 65.54%. В процессе аннотации и анализа генома определено 4267 генов, включая 57 последовательностей тРНК, 4 — рРНК (1 — 5S рРНК, 1 — 16S рРНК, 2 — 23S рРНК) и 4180 генов, кодирующих белки.

С использованием базы данных COG [34] был проаннотирован 3351 ген, что составляет 80.17% от общего количества предсказанных генов. Анализ показал, что гены были включены в 23 функциональные категории COG, при этом основная часть генов отвечала за транспорт и метаболизм углеводов (12.24%), транспорт и метаболизм аминокислот (10.30%), транскрипцию (9.34%), трансляцию, структуру рибосом и биогенез (6.23%), транспорт и метаболизм коферментов (6.09%), транспорт и метаболизм липидов (5.76%), производство и преобразование энергии (5.34%), транспорт и метаболизм неорганических ионов (5.31%). С использованием базы данных KEGG было проаннотировано 2072 аминокислотных последовательностей, что составило 48.56% от всех предсказанных последовательностей белков.

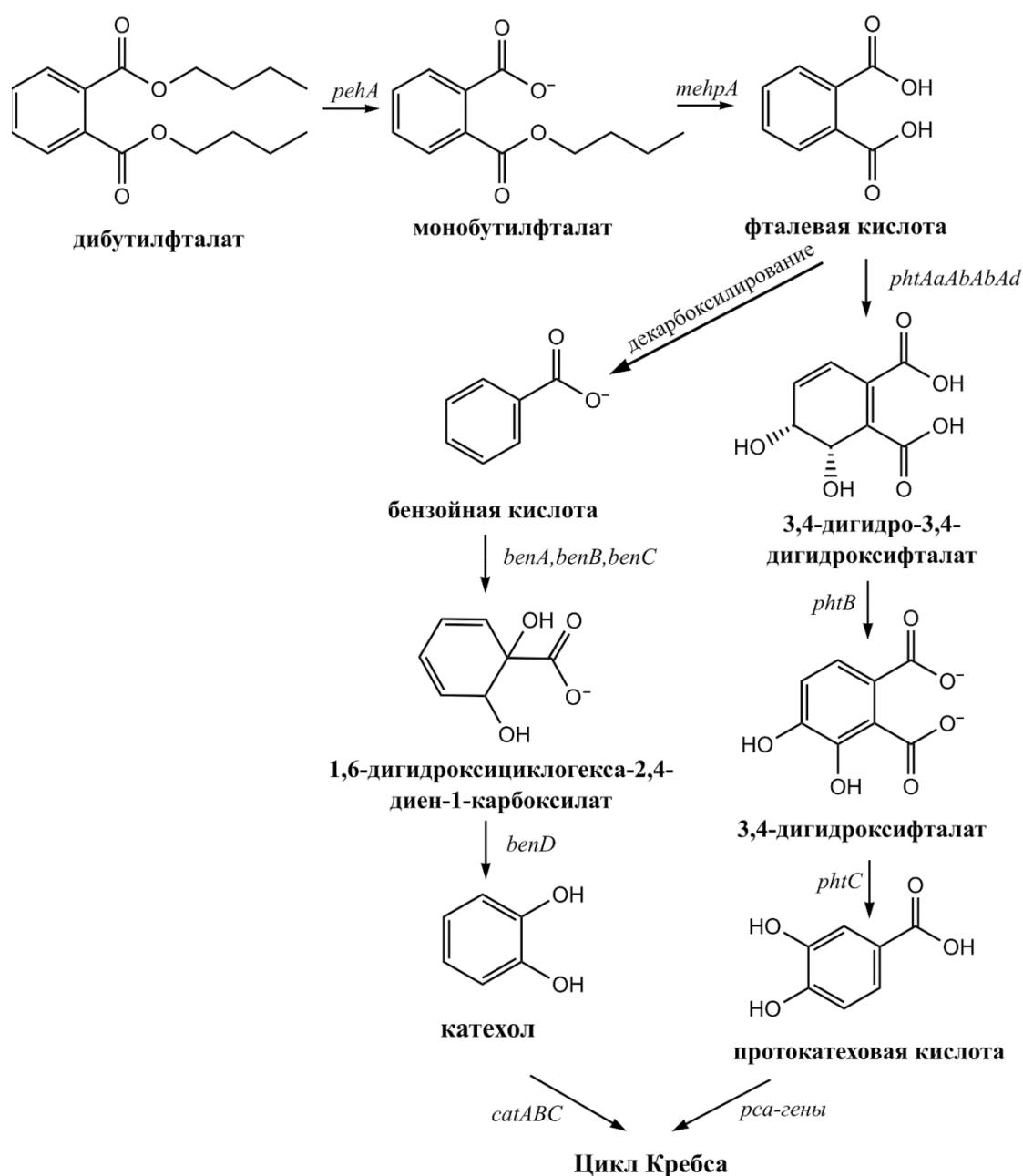


Рис. 5. Схема предполагаемого пути деградации дибутилфталата штаммом *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt.

Анализ метаболических путей KEGG [35] выявил, что наибольшее количество генов относится к следующим путям: углеводный обмен (13.46%), метаболизм аминокислот (6.94%), мембранный транспорт (6.13%), метаболизм кофакторов и витаминов (5.02%), трансляция (3.72%), метаболизм нуклеотидов (3.42%), энергетический метаболизм (3.23%). Кроме того, показано, что 39 генов относится к путям, ассоциированным с биodeградацией ксенобиотиков, в частности, к путям разложения ЭФК.

Кластеры генов, участвующих в разложении ДБФ.

Согласно ранее проведенным исследованиям, на первом этапе ЭФК трансформируются до моноэфиров с последующей деградацией до ОФК с участием карбоксилэстераз, липаз, эстераз и альфа/бета-гидролаз [41]. В геноме штамма NKDBFgelt идентифицировано 4 гена, кодирующих карбоксилэстеразы, 40 генов, кодирующих альфа/бета гидролазы и 3 гена, кодирующих эстеразы, что может указывать на то, что штамм обладает высоким потенциалом к деградации ЭФК. Для поиска

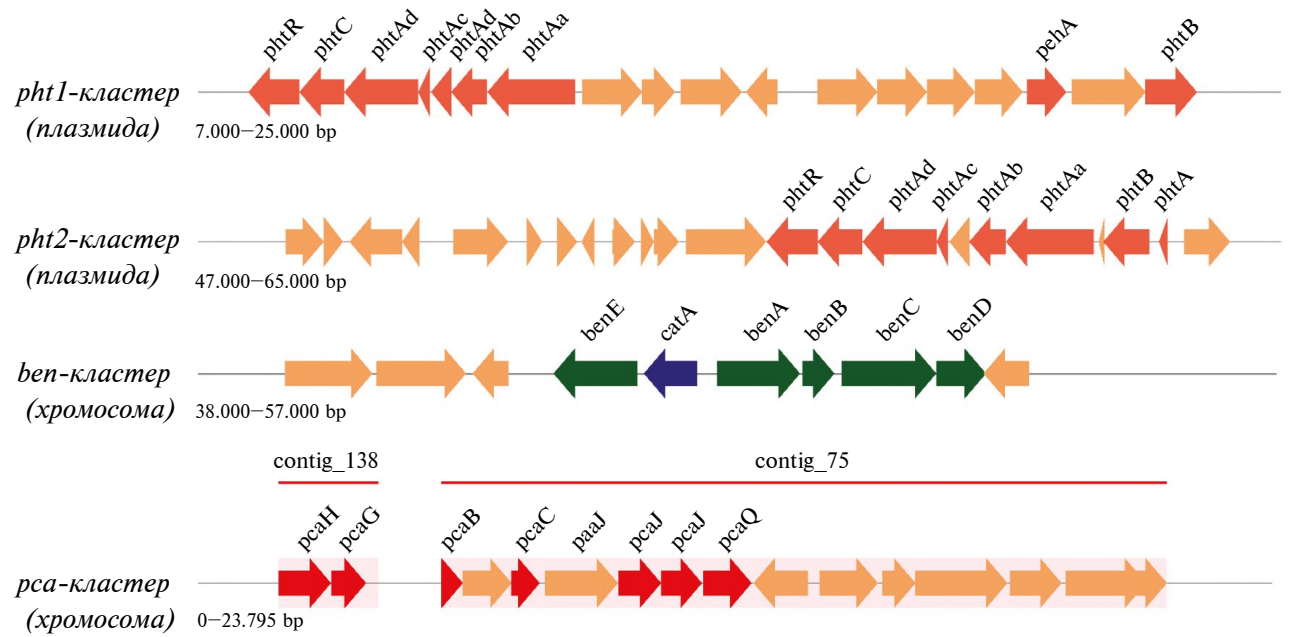


Рис. 6. Ключевые для деградации ДБФ кластеры генов в геноме *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt.

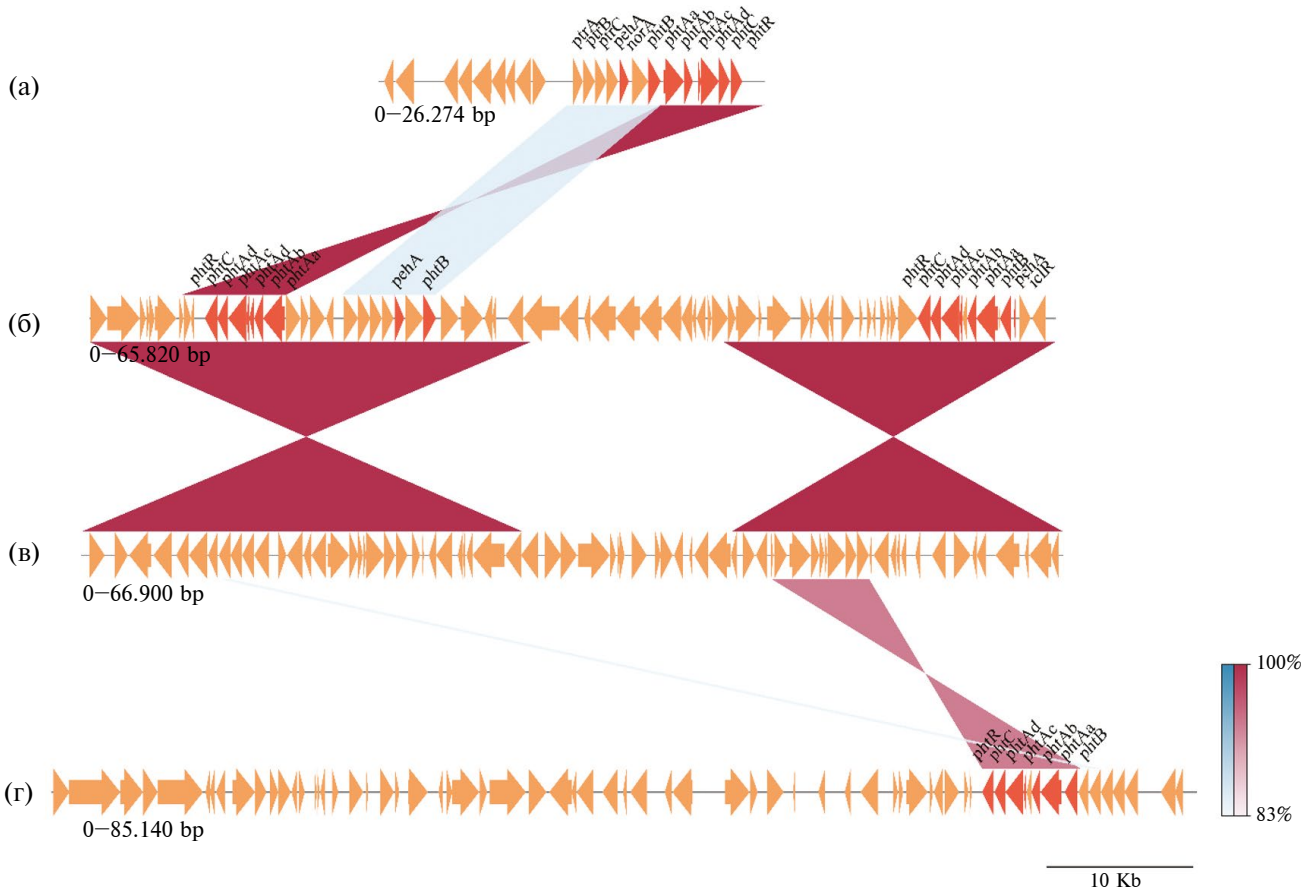


Рис. 7. Сравнительный анализ *pht*-кластеров генов штаммов *Arthrobacter keyseri* 12B (а), *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt (б), *Pseudarthrobacter defluvii* E5 (в), *Arthrobacter* sp. 68b (г).

белков, потенциально участвующих в разложении ДБФ было проведено сравнение исследуемого генома с геномами близкородственных штаммов, способных к разложению ЭФК.

Анализ показал высокую гомологию транслированной аминокислотной последовательности гена, расположенного в плазмиде штамма NKDBFgelt, с транслированными аминокислотными последовательностями генов *pehA* *Arthrobacter keyseri* (90.4%) и *pehA* *Arthrobacter* sp. 68b (87.4%), кодирующими гидролазу сложных эфиров фталата. В геноме штамма NKDBFgelt также обнаружен другой ген, имеющий высокий процент сходства (98.02%) с геном *mehpH* *Rhodococcus* sp. EG-5 [42], который кодирует моно(2-этилгексил) фталат гидролазу (GenBank: BAU22081.1). Установлено, что транслированные аминокислотные последовательности выявленных генов имеют 100%-процентное сходство с транслированными аминокислотными последовательностями генов, кодирующих *N*-карбамоилсаркозин-амидогидролазу и альфа/бета-гидролазу соответственно, штамма *Pseudarthrobacter defluvii* E5. Ранее у штамма *P. defluvii* E5 была описана способность к деградации ЭФК и показано, что вышеуказанные гены имеют высокую гомологию с *pehA* и *mehpH* соответственно [19].

Второй этап превращения ДБФ предполагает биodeградацию ОФК до ПКК (рис. 5). В плазмиде штамма NKDBFgelt содержится 2 копии *pht*-оперона, который включает в себя 7 генов (*phtB*, *phtAa*, *phtAb*, *phtAc*, *phtAd*, *phtC*, *phtU*), кодирующих различные субъединицы 3 ферментов деградации ОФК, а также регулятор транскрипции семейства IclR (*phtR*) (рис. 6). Ранее *pht*-оперон был описан у *P. defluvii* E5 [19], *Arthrobacter keyseri* 12B [22], *Arthrobacter* sp. 68b [43], *Arthrobacter* sp. ZJUTW [16] (рис. 7). Поиск гомологичных белков показал наибольшее сходство транслированных аминокислотных последовательностей генов *pht*-оперона с белковыми последовательностями штаммов, у которых ранее была описана способность к деградации ОФК (рис. 7). На основании полученных данных, можно предположить, что деградация ОФК до ПКК у штамма NKDBFgelt происходит по следующему пути: ОФК окисляется фталат-3,4-диоксигеназой (ЕС 1.13.1.3) до 3,4-дигидро-3,4-дигидроксифталата, который затем дегидрируется фталат-3,4-*цис*-дигидродиол дегидрогеназой (ЕС:1.3.1) до 3,4-дигидроксифталата, последний затем декарбоксилируется 3,4-дигидроксифталат декарбоксилазой (ЕС 4.1.1.69) до ПКК (рис. 5). Кластер генов *pca*, участвующий в разложении ПКК до соединений цикла Кребса, у штамма NKDBFgelt расположен в хромосоме и включает в себя гены *pcaH*, *pcaG*, *pcaB*, *pcaC*, *pcaD*, *pcaI*, *pcaJ* и *pcaQ* (рис. 6).

Кроме того, в геноме штамма NKDBFgelt обнаружены гены: *benA*, *benB*, *benC*, *benD*, *benE*, *benK*, *catA*, *catB*, *catC*, *catD*, *catEa* и *catEb*, участвующие в разложении бензойной кислоты (рис. 6). Гены *benE* и *benK* кодируют транспортный белок, а гены *benA*, *benB*, *benC* участвуют в первой стадии разложения бензойной кислоты до *цис*-1,2-дигидрокси-5 циклогекса-3,5-диенкарбоксилата. Далее фермент, который кодируется геном *benD*, преобразует данный метаболит в катехол. Гены *catA*, *catB*, *catC*, *catD*, *catEa* и *catEb* кодируют ферменты, которые катализируют расщепление катехола до соединений цикла Кребса. Присутствие в геноме *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt вышеописанных генов может свидетельствовать о возможном наличии альтернативного пути деградации ОФК через образование бензоата, что ранее было описано для штаммов *Pseudarthrobacter defluvii* E5 [19] и *Glutamibacter* sp. 0426 [21]. Более детальное установление метаболизма ОФК штаммом NKDBFgelt требует дальнейших исследований.

Результаты проведенных исследований показали, что галотолерантный штамм *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt, выделенный из ризосферы растений, произрастающих на засоленной почве (район ВМКМС, Пермский край, Россия), является активным деструктором ДБФ. Штамм способен использовать ДБФ в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации до 9 г/л, осуществляет разложение ДБФ в условиях повышенного засоления (до 70 г/л NaCl), а также растет в полноценной среде в присутствии до 110 г/л NaCl. Анализ генома штамма NKDBFgelt выявил кластеры генов, участвующих в разложении ЭФК, ОФК, БК, а также гены, кодирующие ферменты основных путей деструкции ароматических соединений. Культурально-физиологические и геномные особенности *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt указывают на его большой деструктивный потенциал и перспективность использования штамма при разработке новых биотехнологий восстановления почв, загрязненных сложными эфирами фталевой кислоты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 124020500028–4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naveen K.V., Saravanakumar K., Zhang X., Sathiyaseelan A., Wang M.-H. // *Environ. Res.* 2022. V. 214. № 1. Article 113781. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113781>
2. Das M.T., Kumar S.S., Ghosh P., Shah G., Malyan S.K., Bajar S. et al. // *J. Hazard. Mater.* 2021. V. 409. Article 124496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124496>
3. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 80. № 2. P. 183–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
4. Kong X., Jin D.C., Tai X., Yu H., Duan G.L., Yan X.L. et al. // *Sci. Total. Environ.* 2019. V. 667. P. 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.385>
5. Zornikova G., Jarosova A., Hrivna L. // *Acta Univ. Agric. Et. Silv. Mendel. Brun.* 2011. V. 59. P. 233–238. <https://doi.org/10.11118/actaun201159030233>
6. Yue D.M., Yu X.Z., Li Y.H. // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2015. V. 12. P. 3009–3016. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0704-y>
7. Gao M., Dong Y., Zhang Z., Song Z. // *Environ. Pollut.* 2020. V. 265. Article 114800. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114126>
8. Azaizeh H., Castro P.M.L., Kidd P. // *Organic Xenobiotics and Plants.* / Eds. P. Schröder, C. D. Collins. *Plant Ecophysiology.* V. 8. Springer, 2011. P. 191–215. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9852-8_9
9. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2006. Т. 2. С. 7–9.
10. Корсакова Е. С., Шестакова Е. А., Хайрулина Е. А., Назаров А. В. // *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9 (18). № 2 (1). С. 591–593.
11. Cheng J.J., Liu Y.A., Wan Q., Yuan, L., Yu X.Y. // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 640. P. 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.336>
12. Patil, N.K., Karegoudar, T.B. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 21. № 8–9. P. 1493–1498. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-7369-0>
13. Jin D., Kong X., Liu H., Wang X., Deng Y., Jia M., Yu X. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. Article 1012. <https://doi.org/10.3390/ijms17071012>
14. Lu Y., Tang F., Wang Y., Zhao J., Zeng X., Luo Q., Wang L. // *J. Hazard. Mater.* 2009. V. 168. № 2–3. P. 938–943. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.126>
15. Kumar V., Maitra S.S. // *Biotech.* 2016. V. 6. № 200. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0524-5>
16. Liu T., Li J., Qiu L., Zhang F., Linhardt R.J., Zhong W. // *Biotechnol. Bioeng.* 2020. V. 117. P. 3712–3726. <https://doi.org/10.1002/bit.27524>
17. Nandi M., Paul T., Kanaujiya D.K., Baskaran D., Pakshirajan K., Pugazhenti G. // *Water Supply.* 2021. V. 21. № 5. P. 2084–2098. <https://doi.org/10.2166/ws.2020.347>
18. Wen Z.D., Gao D.-W., Wu W.-M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 10. P. 4683–4690. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5568-z>
19. Chen F., Chen Y., Chen C., Feng L., Dong Y., Chen J., et al. // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 794. Article 148719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148719>
20. Shariati S., Ebenau-Jehle C., Pourbabaee A.A., Alikhani H.A., Rodriguez-Franco M., Agne M. et al. // *Biodegradation.* 2022. V. 33. P. 59–70. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09966-7>
21. Ren C., Wang Y., Wu Y., Zhao H.-P., Li L. // *Biodegradation.* 2024. V. 35(1). P. 87–99. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10032-7>
22. Eaton R.W. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 12. P. 3689–3703. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3689-3703.2001>
23. Jin D., Kong X., Cui B., Bai Z., Zhang H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 24046–24054. <https://doi.org/10.3390/ijms141224046>
24. Xu X.-R., Li H.-B., Gu J.-D. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2007. V. 68. P. 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.012>
25. Yang T., Ren L., Jia Y., Fan S., Wang J., Wang J. et al. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2018. V. 15. Article 964. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050964>
26. Корсакова Е.С., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. // *Вестник Пермского университета. Серия Биология.* 2023. № 4. С. 349–355. <https://doi.org/10.17072/1994-9952-2023-4-349-355>
27. Raymond R.L. // *Developments in Industrial Microbiology.* 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
28. Непрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
29. Pribelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus, A., Korobeynikov A. // *Current Protocols in Bioinformatics.* 2020. V. 70. № 1. e102.
30. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data; Babraham Bioinformatics, Babraham Institute: Cambridge, UK. 2010.
31. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
32. Antipov D., Hartwick N., Shen M., Raiko M., Lapidus A., Pevzner P. // *Bioinformatics.* 2016. V. 32. № 22. P. 3380–3387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493>
33. Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A., Beyvers S., Blom J., Goesmann A. // *Microbial Genomics.* 2021. V. 7. № 11. Article 000685. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
34. Tatusov R., Galperin M., Natale D., Koonin E. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 6–33. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
35. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № D1. P. D199–D205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1076>

36. Li C., Liu C., Li R., Liu Y., Xie J., Li B. // *Toxics*. 2022. V. 10. Article 532. <https://doi.org/10.3390/toxics10090532>
37. Кашинер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 365 с.
38. Latif A., Ahmad R., Ahmed J., Shah M. M., Ahmad R., Hassan A. // *Sci. Hortic.* 2023. V. 319. Article 112115. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112115>
39. Issifu M., Songoro E.K., Onguso J., Ateka E.M., Ngumi V.W. // *Bacteria*. 2022. V. 1. P. 191–206. <https://doi.org/10.3390/bacteria1040015>
40. Li J., Peng W., Yin X., Wang X., Liu Z., Liu Q. et al. // *J. Hazard. Mater.* 2024. V. 465. Article 133138. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133138>
41. Ren L., Lin Z., Liu H., Hu H. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 3. P. 1085–1096. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8687-5>
42. Iwata M., Imaoka T., Nishiyama T., Fujii, T. // *J. Biosci. Bioeng.* 2016. V. 122. № 2. P. 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.01.008>
43. Stanislauskienė R., Rudenkov M., Karvelis L. // *Biologija*. 2011. V. 57. № 3. P. 45–54.

Degradation of Dibutyl Phthalate by Halotolerant Strain *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt

O. V. Yastrebova^{a,*}, A. A. Pyankova^a, A. V. Nazarov^a, Yu. I. Nechaeva^a, E. S. Korsakova^a,
E. G. Plotnikova^a

^a*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

*e-mail: olyastr@mail.ru

Dibutyl phthalate (DBP) is the di-n-butyl ester of *ortho*-phthalic acid, widely used in the chemical industry as a plasticizer and is a common environmental pollutant. The ability of the halotolerant strain *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt (VKM Ac-3035) isolated from the rhizosphere soil of a salt mining area (Perm Krai, Russia) to use DBP as the sole source of carbon and energy was studied. The strain NKDBFgelt was capable of growth on DBP and *ortho*-phthalic acid (PA) at high salinity (up to 30 g/L and 50 g/L NaCl, respectively), as well as growth on DBP at a high concentration — up to 9 g/L. The strain degraded 75.2% DBP (initial concentration 200 mg/L DBP) by 72 h of cultivation in the absence of salt. With increased salinity of the medium (30–70 g/L NaCl), DBP degradation was recorded at a level of 66.95–27.8%. Analysis of the genome of the strain NKDBFgelt revealed clusters of genes involved in the degradation of DBP, PA, benzoic acid, as well as genes encoding enzymes of the main degradation pathways of aromatic compounds. The halotolerant strain *Pseudarthrobacter* sp. NKDBFgelt has a high degradative potential and is promising in the development of new biotechnologies for the restoration of soils contaminated with phthalic acid esters.

Keywords: *Pseudarthrobacter*, dibutyl phthalate, *ortho*-phthalic acid, degradation, sodium chloride, complete genome