

ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ДЕНИТРИФИКАТОРЫ '*HALOMONAS NITRITOFILUS*' ИЗ СОДОВЫХ ОЗЕР БУРЯТИИ

© 2011 Е.А.Семёнова, Е.А.Гильванова, Н.Г.Усанов

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН

Поступила 27.05.2011

Выполнен целевой скрининг денитрифицирующих грамотрицательных бактерий, фенотипически близких к бактериям рода *Halomonas*. Выделенные штаммы отличаются от "классических" *Halomonas* диапазоном рН для роста (7,0 – 11,0) и скоростями денитрификации, в несколько раз превышающими известные значения, а также устойчивостью к нитриту натрия в высоких концентрациях и способностью восстанавливать нитрит даже при его очень низких стартовых концентрациях в щелочных средах. Филогенетический анализ гена 16S рРНК полученных изолятов выявил их принадлежность к аморфной III филогенетической группе ("ungrouped" *Halomonas*) с уровнем сходства 93-98%. Внутри этой группы выделенные галомонады образовывали 2 компактных кластера с высокими уровнями сходства 97-100% и сходными фенотипическими признаками. В каждом кластере предложены номинанты на новый вид '*Halomonas nitritophilus*'.

Ключевые слова: *Halomonas*, денитрификация, нитрит.

Род *Halomonas* [1] входит в группу грамотрицательных гамма-протеобактерий и, по данным NCBI, включает на настоящий момент порядка 50 видовых групп и более 750 штаммов, охарактеризованных как *Halomonas* sp. Типовым считается вид *H. elongata* [2] относящийся к мезофильным и экстремально галофильным микроорганизмам, развивающимся на органо-минеральных средах с высокими концентрациями хлорида натрия. Интерес к изучению разнообразия галомонад проявляется как с точки зрения исследования особенностей функционирования природных экосистем, так и для решения прикладных задач. Отдельным и, на наш взгляд, перспективным направлением является выделение и исследование культур *Halomonas*, устойчивых к высоким концентрациям нитрит анионов и способных к полной денитрификации нитратов до газообразного азота. Возможными направлениями использования таких микроорганизмов являются очистка воды от концентрированных примесей нитритов и нитратов, аноксические процессы окисления органических поллютантов в воде [3] и др.

Впервые толерантность денитрифицирующих галомонад к очень высоким концентрациям нитрита натрия (до 10% масс.) была обнаружена сотрудниками лаборатории прикладной микробиологии ИБ УНЦ РАН в 2000 – 2003 гг. Тогда на основании изучения токсичности NaNO_2 при различных значениях рН среды был сделан вывод, что скрининг нитритотолерантных бактерий следует проводить в ассоциациях алкалофильных и алкалотолерантных микроорганизмов. Нашей задачей стало выделение из природных источников культур галомонад, устойчивых к высоким концентрациям нитрита натрия, описание их культурально-морфологических, физиолого-биохимических и генетических признаков, а также идентификация и определение их филогенетической позиции.

Семёнова Екатерина Александровна, канд. биол. наук, e-mail: sea@anrb.ru; Гильванова Елена Альбертовна, канд. биол. наук, e-mail: gelena@anrb.ru; Усанов Николай Глебович, канд. биол. наук.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили галоалкалофильные денитрифицирующие бактерии рода *Halomonas* из коллекции Института биологии УНЦ РАН, а также вновь выделенные из природных мест обитания изоляты (табл. 1). Исходным материалом для выделения нитритостойчивых бактерий, предположительно относящихся к роду *Halomonas*, служили различные образцы природного материала, имеющие естественный уровень рН в интервале 8,4 – 10,1 и минерализации 5,5 – 330 г/л. Скрининг проводили методом накопительных культур в анаэробных условиях на селективных средах с последующим пассажем для получения чистой культуры.

Селективная питательная среда, обозначенная GF, имела следующий состав, г/л: дрожжевой экстракт – 10, KH_2PO_4 – 4, Na_2CO_3 – 2, NaCl – 10, NaNO_2 – 20; рН 9,2 – 9,4. Единственным акцептором электронов служил нитрит натрия. Дальнейшее исследование полученных культур проводили на аналогичных питательных средах при температуре 30 – 37°C. Аноксический рост культур изучали в специальных стеклянных пробирках с завинчивающимися крышками, заполненных до верха питательной средой. Аэробное культивирование проводили в конических колбах объемом 250 мл на воздушно-термостатируемых качалках типа УВМТ-12-250 при скорости перемешивания 150 – 200 об/мин.

Морфологию, подвижность и размеры клеток исследовали с помощью фазовой оптической и сканирующей зондовой микроскопии на микроскопах Carl Zeiss (Германия) и Solver Pro-M (NT-MDT, г. Зеленоград, Россия).

Изучение физиолого-биохимических характеристик исследуемых микроорганизмов проводили, руководствуясь требованиями к описанию новых групп бактерий семейства *Halomonadaceae* [4], а также методами, описанными в руководствах: [5, 6, 7].

Для выявления спектра аэробно или анаэробно используемых субстратов их вносили в количестве 5 г/л в среду, содержащую 20 г/л NaCl, 4 г/л KH_2PO_4 и 5 г/л бактериологического агара. В качестве индикатора кислотообразования в среду добавляли 0,1 г/л тимолового синего. Сахара в виде концентрированных водных растворов вносили в стерильную щелочную среду непосредственно перед засевом. Посев проводили уколом в центр агарового столбика. Для создания анаэробных условий поверхность среды покрывали слоем 2% агара.

Для получения рН зависимости нужные значения рН устанавливали подтитровкой среды 20% раствором Na_2CO_3 . Для определения потребности в хлориде натрия концентрированный раствор NaCl вносили в жидкую среду с оптимальным значением рН до получения необходимой концентрации от 0 до 25% соответственно. Температурную зависимость определяли при оптимальных значениях рН и минерализации среды. Для определения устойчивости к антибиотикам в агаризованную среду GF вводили соответствующие растворы до конечной концентрации: ампициллина – 20 мкг/мл, канамицина – 10 мкг/мл, рифампицина – 150 мкг/мл, тетрациклина – 10 мкг/мл, налидиксовой кислоты – 15 мкг/мл, стрептомицина – 10 мкг/мл, хлорамфеникола – 25 мкг/мл, спектомицина – 100 мкг/мл.

Выделение ДНК проводили методом фенольной экстракции [8]. Последовательности 16S рРНК генов (1463 – 1507 п.о.) были получены методом ПЦР, с использованием концевых праймеров 16SF27 и 16SR1512 и реакционной смеси, содержащей стандартные концентрации дНТФ и *Taq*-полимеразы (Fermentas, Литва) и ДНК-матрицу. Полимеразную реакцию проводили в амплификаторе MasterCycler Personal (Eppendorf, Германия). Секвенирование гена 16S рРНК проводили на секвенаторе Perkin-Elmer ABI PRISM™ 373 с использованием универсальных для большинства прокариот праймеров. Анализ полученных последовательностей штаммов IB-G4, IB-I6, IB-NN3-2с, IB-O7-1, IB-Ar4, IB-559, IB-O18 и IB-O7-6 и построение филогенетических древ были выполнены с помощью программ BioEdit [9] и TREECON [10]. В филогенетический анализ были включены последовательности длиной не менее 1430 п.о., имевшие позиции с 38 по 1506, согласно нумерации E.coli [11].

Качественный и количественный анализ анионного состава культуральной жидкости проводили методом высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭФ) на приборе АКИ «Нанофор 01» (г. Санкт-Петербург, Россия), в кварцевом капилляре длиной $l = 75$ см, внутренний диаметр $d_{\text{вн}} = 70$ мкм; при рабочем напряжении 11 кВ; детектирование – не прямое в ультрафиолетовой области с длиной волны $\lambda = 254$ нм; буферный раствор – хроматный электролит (5 мМ оксида хрома (VI), 20 мМ диэтанолamina, 1,65 мМ N-цетил-N,N,N-триметиламмония бромид). Статистически досто-

верная чувствительность метода по нитрит аниону составляла 0,5 мг/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью скрининга денитрифицирующих бактерий, предположительно относящихся к роду *Halomonas*, развивающихся на минимальном субстрате и при этом проявляющих устойчивость к нитриту натрия, было обследовано 24 природных образца, включавших пробы чернозема (Челябинская и Кировская обл.), песка и литорального грунта с прибрежных зон Красного и Черного морей, ила со дна содовых и соленых озер (Республика Бурятия и Оренбургская обл.), почвы, отобранные в районах горячих источников (Республика Бурятия и Камчатка). Фактором селекции служил NaNO_2 , вносимый в питательную среду в качестве акцептора электронов в концентрации 2% масс. Накопительные культуры инкубировали при 37°C, 48 ч. Пробы, демонстрировавшие активное образование газа (предположительно азота), высевали на щелочной питательный агар. Больше всего денитрификаторов было выделено из образцов придонного осадка содовых озер респ. Бурятии, и немногочисленная группа изолятов получена из соляного отвала одного из озер г. Соль-Илецка, из проб буровых растворов для скважин, из проб литорального грунта (Израиль), из проб прибрежной зоны и пустынной почвы штата Аризона (США) (табл.1). Всего были выделены 21 денитрифицирующий изолят. Полученные штаммы были объединены в коллекцию нитритрезистентных денитрификаторов. Выделенные штаммы несколько различались формой, цветом и размером колоний, морфологией клеток. При анаэробном росте в жидкой среде некоторые из штаммов коллекции образовывали плотный слизистый осадок, который поднимался к поверхности среды образующимися в большом количестве пузырьками газа. Для детального изучения выбрали 5 изолятов, обобщающих основные морфотипы коллекции – штаммы IB-G4, IB-I6, IB-O18, IB-O7-1, IB-SL3 (табл. 1).

Вегетативные клетки практически всех изолятов представляли собой граммотрицательные, факультативно анаэробные, подвижные палочки размером $(0,7 \div 1,0) \times (1,5 \div 2,5)$ мкм. Иногда можно было наблюдать образование цепочек от 2 до 4 сцепленных между собой клеток. Отличались только клетки штамма IB-O18, они представляли собой кокки $0,7 \div 1,0$ мкм в диаметре. Подвижность клеток остальных изолятов обеспечивалась за счет одного или двух боковых жгутиков, расположенных с одной стороны клетки. Жгутики были длинные, в несколько раз превосходящие размеры клеток, однако часто обламывались при приготовлении препаратов.

Основные физиолого-биохимические свойства пяти нитритрезистентных культур представлены в таблице 2.

Таблица 1. Источники грамотрицательных нитритрезистентных изолятов, выделенных на селективной среде и их генотипическая характеристика

Изоляты	Место отбора	Характеристика пробы	pH	Селективная среда	Длина прочитанного участка гена 16S рРНК (пн)	Номера депонированных последовательностей в EMBL
IB-G4	Бурятия, содовое озеро	Придонный осадок	8,4	GF	1480	AM490139
IB-I6	Израиль, г. Кармель	Горная почва	9,2	GF	1507	AJ302088
IB-Ag4	Штат Аризона, США	Почва под пальмой	8,6	GF	1507	AJ309564
IB-559	Западная Сибирь, скв. 559 Кирско - Котгынского месторождения	Буровой раствор из нефтяной скважины, глубина 2700 м	8,7	GF	1505	AJ309560
IB-NN3-2c	Бурятия, содовое озеро Нухэ-Нур	Бактериальные маты со дна	9,8	GF	1463	AM490135
IB-O7-1	Бурятия, содовое озеро Оронгойское	Иловый осадок	10,1	GF	1472	AM490137
IB-O7-6	Бурятия, содовое озеро Оронгойское	Иловый осадок	10,1	GF	1466	AM490138
IB-O18	Бурятия, содовое озеро Оронгойское	Иловый осадок	10,1	GF	1477	AM490136

Температурный интервал для роста большинства изолятов был определен от 6 до 48°C с оптимумом 36 – 40°C. Диапазон значений pH для роста большинства культур на среде без нитрита составлял 6,5 – 11,5 с оптимумом pH 9,0 – 9,5. В присутствии 1% масс. NaNO₂ рост всех культур наблюдался только при pH 7,5 и выше. Исключение составлял штамм IB-I6, который проявлял способность к активному росту в присутствии нитрита натрия в диапазоне pH 7,0 – 11,5. Все культуры коллекции представляли собой факультативно анаэробные гетероорганотрофные галоалкалофильные грамотрицательные денитрифицирующие бактерии, проявляли положительную каталазную и оксидазную реакцию. Изоляты росли на средах, содержащих до 25% NaCl, с оптимумом 4 - 8%, что указывало на их принадлежность к умеренным галофилам. Как известно, развитие алкалофилов также сопряжено с зависимостью от ионов Na⁺ [12, 13]. Облигатная потребность большей части культур нашей коллекции в катионах Na⁺ для своего

роста стала еще одним общим физиологическим признаком. Минимальный уровень концентраций иона Na⁺ лежал в области значений 30 - 35 мМ по NaCl. Тем не менее, имелись исключения. Штамм IB-I6 обнаруживал рост на «безнатриевой» среде с фоновой концентрацией Na⁺ 1,5 - 1,7 мМ.

В качестве источников энергии микроорганизмы использовали различные органические субстраты, такие, как дрожжевой экстракт, некоторые органические кислоты, углеводы и полиспирты. Все бактерии не были способны гидролизовать крахмал и казеин. Три культуры гидролизуют желатин (IB-I6, IB-O7-1, IB-O18). Практически все гидролизуют эскулин в большей или меньшей степени, кроме штамма IB-O18.

Для сравнительной оценки в таблице 2 представлены также некоторые биохимические и культуральные свойства классических видов рода *Halomonas* (*H. elongata*, *H. variabilis*) и денитрификаторов *H. desiderata*, *H. halodenitrificans*, взятые из литературных источников [1, 14, 15].

Таблица 2. Сравнительная фенотипическая характеристика некоторых нитритрезистентных изолятов, классических видов рода *Halomonas* (*H. elongata*, *H. variabilis*) и денитрифицирующих галомонад, имеющих наиболее высокое сходство по гену 16S рРНК (*H. desiderata*, *H. halodenitrificans*)

Характеристика	IB-G4	IB-I6	IB-O7-1	IB-SL3	IB-O18	<i>H. elongata</i> ¹	<i>H. variabilis</i> ¹	<i>H. desiderata</i> ¹	<i>H. halodenitrificans</i> ¹
Форма клеток	палочки	палочки	палочки	палочки	кокки	палочки	искривл. палочки	палочки	короткие палочки
Размеры клеток, мкм	1 × 3	0,7 × 2	НД	НД	НД	НД	0,8 × 3	0,6 × 2,6	0,5 × 1,2
Подвижность	+	+	НД	НД	НД	+	+	+	–
Жгутикование	+	+	НД	НД	НД	+	+	+	–
Пигментация	прозрач.	беж.	бел.	беж.	бел.	бел.	беж.	беж.	беж.
Окраска по Граму	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Факультативный анаэроб	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+	НД	НД	+	НД
Оксидаза	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Уреаза	+	+	+	+	+	+	+	–	НД
Восстановление NO ₃ ⁻	+	+	+	+	+	+	–	+	+

Восстановление NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Нитратное дыхание	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Нитритное дыхание	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Концентрация NaNO ₂ , %	0,01-8	0,05-8	0,05-5	0,05-5	0,1-8	НД	НД	НД	НД
Потребность в Na ⁺ , М	0,051	0,001	0,034	НД	0,204	НД	НД	+	НД
Концентрация NaCl, %, рН 9,4 (интервал/оптимум)	0,1-18/ 2-4	0-18/ 2-4	0-20/ 2-4	0,5-25/ 2-4	1-18/ 2-4	0-20/ 3-8	1-25/ 10	0-18/ 1-5	3-20/ 5-9
рН, интервал/оптимум	7,0-11,5/ 9,4	6,5-11,5/ 9,4	6,5-11,5/ 9,4	7,0-10,5/ 9,4	7,0-10,5/ 9,4	5-10	6-9	7-11/ 9,5	5-10
Температура, °С	6-48	6-50	6-40	6-40	6-40	4-45	15-37	10-48	5-37
Гидролиз крахмала	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз желатины	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Гидролиз казеина	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Гидролиз эскулина	+	+	+/-	+/-	-	+	+	НД	-
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	+	НД
Образование сероводорода	-	-	-	-	-	-	-	НД	-
Образование кислоты из:									
D-глюкозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L-арабинозы	-	+	+	-	-	+	-	-	-
лактозы	-	-	-	-	-	+	-	-	-
маннита	-	+	+	+	-	+	-	-	-
сахарозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Субстраты:									
Дрожжевой экстракт	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
Ацетат	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактат	-	-	+/-	+/-	+/-	НД	НД	+	НД
Глицерин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбит	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Маннит	-	+	+	+	+/-	+	-	+	НД
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+	-	+	НД
Фруктоза	+	+	+	+	+/-	НД	-	+	НД
Арабиноза	-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	НД
Устойчивость к антибиотикам:									
ампициллин	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
канамицин	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
рифампицин	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
тетрацилин	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
налидиксовая кислота	+	+	+	+	+	НД	НД	НД	НД
стрептомицин	+	+/-	+	-	+/-	НД	НД	НД	НД
хлорамфеникол	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
спектомицин	-	+	+/-	+/-	-	НД	НД	НД	НД

Прим. НД – нет данных; + положительная реакция; - отрицательная реакция; +/- признак проявляется в слабой степени.

¹По литературным данным [1, 14, 15]

Определение антибиотикоустойчивости некоторых штаммов коллекции выявило, что все культуры устойчивы к ампициллину (до 20 мкг/мл), канамицину (до 10 мкг/мл), рифампицину (до 150 мкг/мл), тетрациклину (до 10 мкг/мл) и налидиксо-

вой кислоте (до 15 мкг/мл). У всех штаммов проявляется чувствительность к хлорамфениколу. А также практически все чувствительны к спектомицину и стрептомицину. Устойчивость к стрептомицину

обнаружена только у штаммов IB-G4 и IB-O7-1, а к спектомицину только у IB-I6.

Учитывая совокупность культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, все вновь выделенные бактерии предварительно были отнесены к роду *Halomonas* [1, 16].

По последним данным, одним из главных таксономических маркеров при идентификации бактерий рода *Halomonas* служит их способность к полной денитрификации [17]. Все наши бактерии полностью восстанавливали нитраты до газообразного азота, используя NO_3^- в качестве единственного акцептора электронов. Однако, более подробное изучение сложного процесса денитрификации позволило нам выявить не известные до этого особенности. Считается, что содержание NaNO_2 в нейтральных средах (как и NaNO_3 , из которого образуется нитрит) ограничено концентрацией 1,5 – 3 г/л [3, 18]. В отличие от известных денитрификаторов, полученные нами культуры галомонад обладали устойчивостью и способностью к восстановлению сравнительно высоких концентраций нитрита натрия. Максимум содержания NaNO_2 в средах, на которых наблюдался рост наших изолятов, варьировал в пределах от 30 до 80 г/л (табл. 1), при оптимуме 10 – 15 г/л.

В процессе определения минимального порога концентрации нитрита, как единственного акцептора электронов, было обнаружено, что 13 изолятов способны к аноксическому росту и денитрификации в щелочных условиях даже при низких концентрациях NaNO_2 (до 0,2 г/л). Все они восстанавливали это соединение до концентраций, не детектируемых методами ВЭКЭФ. Вместе с тем, также были определены 8 изолятов, не способных к росту при содержании нитрита в среде менее 0,2 – 1,0 г/л (табл. 2), но развивающихся при наличии более высоких концентраций этого окислителя. Наиболее требовательным к концентрации нитрита в среде оказался штамм IB-O7-6, восстанавливающий NaNO_2 лишь при его концентрациях в питательных средах выше 2,6 г/л.

Все эти данные вызывают множество вопросов и требуют детального исследования, которое будет произведено в дальнейшем.

Таксономическое положение нитритрезистентных культур было определено для 8 наиболее интересных штаммов - IB-G4, IB-I6, IB-NN3-2с, IB-O7-1, IB-Ar4, IB-559, IB-O18 и IB-O7-6. Согласно полученным данным анализа секвенированных последовательностей гена 16S рРНК, все культуры входили в γ -подгруппу протеобактерий и были близки к микроорганизмам рода *Halomonas*.

Филогенетические взаимоотношения нитритрезистентных бактерий с другими галомонадами представлены в виде дерева на рисунке. Род *Halomonas* разделяют на условные филогенетические группы I и II, а также группу III (“ungrouped” *Halomonas*), которая включает разноудаленные виды с четкой дифференциацией фенотипических

признаков и в будущем вполне может быть разбита на несколько филогенетических групп или даже родов [14, 16]. Уровень сходства последовательностей наших штаммов с последовательностями 16S рРНК представителей филогенетической группы I составил 92,2 – 95,2%, для группы II – в пределах 91,5 – 95,1%, тогда как с ближайшими представителями “ungrouped” *Halomonas* этот показатель находился на уровне 92,5 – 98,4%. На основе полученных данных для сравнительного анализа гена 16S рРНК были выбраны представители ближайших видов *Halomonas*. В том числе были включены новые виды, входящие в III группу [19, 20, 21, 22]; а также ближайшие представители группы I, включающей типовой вид *H. elongata* и др. [2, 23, 24], и группы II [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]. При подборе анализируемых последовательностей также учитывали результаты поиска гена 16S рРНК ближайших типовых штаммов, используя программу On-line Seqmatch v.3 [32].

Результаты проведенного нами филогенетического анализа согласуются с заключением Agrahal et al. [14] и Lee et al. [34] о гетерогенности рода *Halomonas*, сделанном на основании результатов анализа последовательностей 16S и 23S рРНК [35]. Типовой вид рода *Halomonas elongata* формировал обособленный подкластер вместе с близкородственными видами *H. halmophila*, *H. eurihalina*, *H. salina*, *H. halophila* и *H. organivorans* с достаточно высоким значением “bootstrap”-анализа 75%. Наиболее многочисленной группой видов *Halomonas* с высоким значением показателя достоверности кластеризации (98%), включавшей 9 видов, являлась вторая (II) филогенетическая группа среди бактерий рода *Halomonas*.

Филогенетический анализ позволил выявить на филограмме две группы, образуемые нашими культурами. Как и ожидалось, все восемь штаммов были локализованы внутри обширной аморфной группы III – “ungrouped” *Halomonas*. Первая группа А, состоявшая из штаммов IB-559, IB-G4, IB-NN3-2с, IB-O7-6 и IB-O18, образовывала два когерентных кластера с достоверными показателями “bootstrap”-анализа 61 и 100%. Внешний кластер был объединен четырьмя штаммами не только очень высоким значением “bootstrap”, но и достаточно высоким уровнем гомологии нуклеотидных последовательностей внутри этой группы 97,0 – 99,8%. Вторая группа В, включавшая IB-Ar4, IB-I6 и IB-O7-1, образовывала компактный кластер с высоким показателем “bootstrap” и уровнем сходства последовательностей внутри этой группы 98,5 – 100%. Необходимо отметить, что ближайшим родственником для штаммов этой группы оказался *Halomonas desiderata* [15] – представитель так называемых “ungrouped” *Halomonas* с уровнем сходства последовательностей 98 – 98,4% внутри этой группы. Несколько отстояла от внешнего кластера группы А культура IB-O18. Она отличалась не только невысоким уровнем генетического родства

97 – 97,8%, но и на фенотипическом уровне, в частности, культура имела несхожий с другими морфотип колоний, форму клеток, вариабельную окраску по Граму и отличалась повышенной потребо-

стью в ионах натрия (более 0,2 М). С членами группы В эта культура имела еще меньшее сходство последовательностей – 96,3 - 97%.

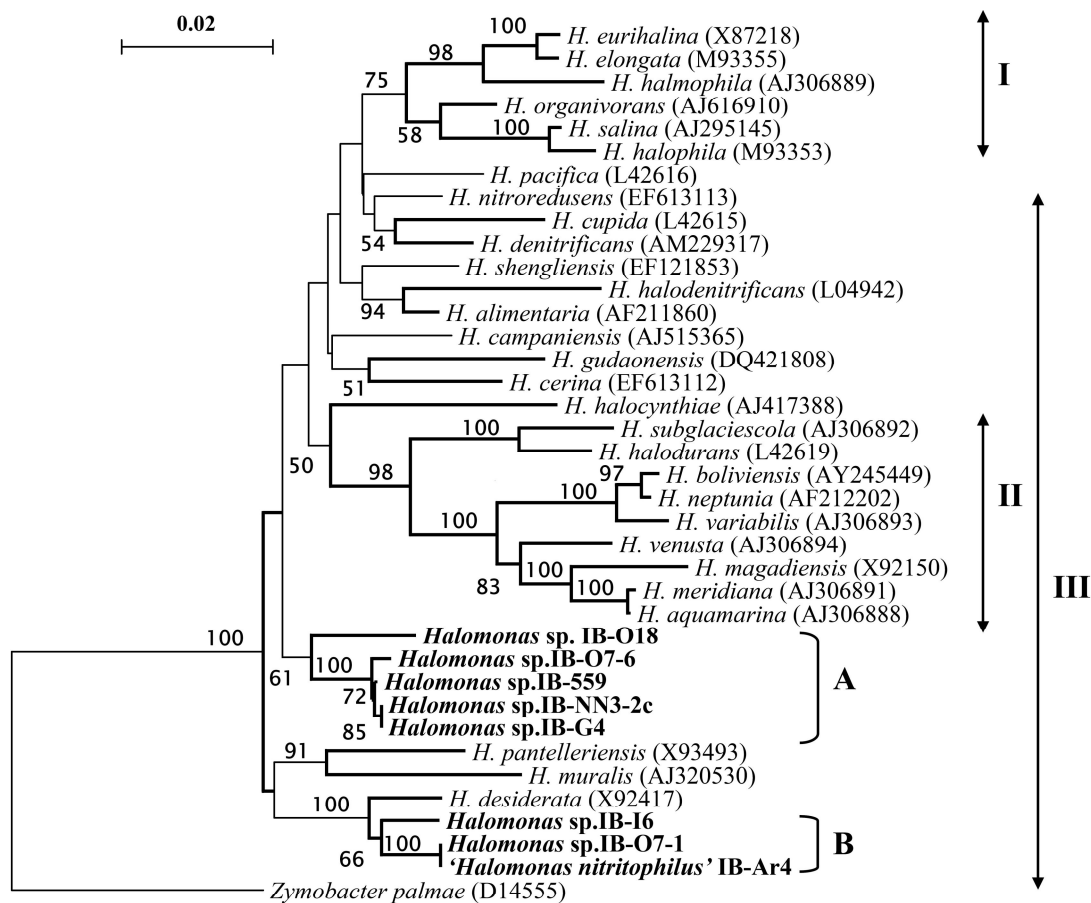


Рис. Филогенетическое дерево нитритрезистентных бактерий рода *Halomonas*. Корень определен включением последовательности *Zymobacter palmae* [33] в качестве внешней группы. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 100 альтернативных деревьев; значения менее 50% не указаны.

Полные последовательности генов 16S рРНК нитритрезистентных культур были депонированы в базе данных EMBL (European Molecular Biology Laboratory)/GenBank под номерами, представленными в Таблице 1. AM490139, AJ302088, AM490135, AM490137, AJ309564, AJ309560, AM490136, AM490138.

Изученные нами штаммы значительно отличались на филогенетическом и фенотипическом уровнях как от типового вида *H. elongata* [2] и близких к нему организмов *H. halmophila*, *H. eurihalina* [36, 37], так и от *H. muralis*, *H. pantelleriensis*, *H. halodenitrificans* [38, 39], с которыми они имели наиболее высокий уровень сходства 16S рРНК 94,6-97,7%. Наиболее существенными характеристиками, дифференцирующими наши штаммы от указанных видов, являлись: диапазон рН, сдвинутый в щелочную область (7 – 11); более широкий температурный интервал (6 – 48°C),

но наиболее важным признаком была способность к полной денитрификации NO_3^- до газообразного азота в щелочных условиях, устойчивость к очень высоким концентрациям NO_2^- до 1,2 М (80 г/л), а иногда даже потребность в наличии некой минимальной концентрации нитрита натрия. Наиболее близкие к нашим изолятам физиолого-биохимические характеристики отмечены у денитрификатора *H. desiderata* [15], имевшего наибольший процент генетического сходства со штаммами группы В. К сожалению, на сегодняшний день в литературе нет данных по изучению роста представителей рода *Halomonas* на средах, содержащих нитрит натрия более 0,01 – 0,02 М, в условиях денитрификации. С учетом всего вышесказанного становится очевидным, что любой из исследованных штаммов, может быть предложен в качестве нового вида, например, '*Halomonas nitritophilus*', и, в частности, культуры IB-G4, IB-16 и IB-O18.

Один из соавторов статьи, к.б.н., доцент Усанов Николай Глебович, скоропостижно скончался при подготовке статьи к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mata J. A., Martinez-Canovas J., Quesada E. and Bejar V. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species // Systematic and Applied Microbiology. 2002. V. 25. P. 360-375.
2. Vreeland R. H., Litchfield C. D., Martin E. L. and Elliot E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria // International Journal of Systematic Bacteriology. 1980. V. 30. P. 485-495.
3. Гильванова Е.А., Усанов Н.Г. Количественная оценка биоцидной активности химических соединений с помощью микробных ассоциаций почвы // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 3. С. 329 - 334.
4. Arahall D. R., Vreeland R. H., Litchfield C. D., Mormile M. R., Tindall B. J., Oren A., Bejar V., Quesada E. and Ventosa A. Recommended minimal standards for describing new taxa of the family *Halomonadaceae* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. V. 57. P. 2436-2446.
5. Определитель бактерий Берджи: Пер с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. 800 с.
6. Методы общей бактериологии: В 3-х томах. Пер. с англ. / под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984.
7. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
8. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current protocols in molecular biology. Chapter 2 / ed. by Frederick M., Ausubel et al. 2001.
9. Hall T. BioEdit Biological Sequence Alignment Editor Version 7.0.9. 2007
10. Van de Peer Y. and De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Computer Applications in the Biosciences. 1994. V. 10. P. 569-570.
11. Brosius J., Palmer M. L., Kennedy P. J. and Noller H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli* // Proceed. National Academy of Sciences of the United States of America. 1978. V. 75. P. 4801-4805.
12. Деткова Е.Н. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий из содовых озер // Алкалофильные микробные сообщества. М.: Наука, 2007. С. 348-373.
13. Krulwich T. A. and Guffanti A. A. The Na⁺ cycle of extreme alkalophiles: A secondary Na⁺/H⁺ antiporter and Na⁺/solute symporters // J. Bioenerg. Biomembranes. 1989. V. 21. P. 663-677.
14. Arahall D. R., Ludwig W., Schleifer K. H. and Ventosa A. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. V. 52. P. 241-249.
15. Berendes F., Gottschalk G., Heine-Dobbernack E., Moore E. R. B. and Tindall B. J. *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works // Systematic and Applied Microbiology. 1996. V. 19. P. 158-167.
16. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. Springer US, 2005. 2816 p.
17. Gonzalez-Domenech C. M., Martinez-Checa F., Bejar V. and Quesada E. Denitrification as an important taxonomic marker within the genus *Halomonas* // Systematic and Applied Microbiology. 2010. V. 33. P. 85-93.
18. Chung J., Bae W., Lee Y. W., Ko G. B., Lee S. U. and Park S. J. Investigation of the effect of free ammonia concentration upon leachate treatment by shortcut biological nitrogen removal process // J. Environmental Science and Health: Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. 2004. V. 39. P. 1655-1665.
19. Gonzalez-Domenech C. M., Martinez-Checa F., Quesada E. and Bejar V. *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008. V. 58. P. 803-809.
20. Kim K. K., Jin L., Yang H. C. and Lee S. T. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. V. 57. P. 675-681.
21. Romano I., Giordano A., Lama L., Nicolaus B. and Gambacorta A. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy // Systematic and Applied Microbiology. 2005. V. 28. P. 610-618.
22. Wang Y. N., Cai H., Yu S. L., Wang Z. Y., Liu J. and Wu X. L. *Halomonas gudaonensis* sp. nov., isolated from a saline soil contaminated by crude oil // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. V. 57. P. 911-915.
23. Baumann L., Bowditch R. D. and Baumann P. Description of *Deleya* gen. nov. created to accommodate the marine species *Alcaligenes aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus*, *A. venustus* and *Pseudomonas marina* // Internat. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 793-802.
24. Quesada E., Ventosa A., Ruiz-Berraquero F. and Ramos-Cormenzana A. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria // International Journal of Systematic Bacteriology. 1984. V. 34. P. 287-292.
25. Akagawa M. and Yamasato K. Synonymy of *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis* subsp. homari, and *Deleya aesta*: *Deleya aquamarina* comb. nov. as the type species of the genus *Deleya* // Internat. J. Systematic Bacteriology. 1989. V. 39. P. 462-466.
26. Fendrich C. *Halovibrio variabilis* gen. Nov. sp. Nov., *Pseudomonas halophilia* sp. nov. and a new halophilic aerobic Coccoid Eubacterium from Great Salt Lake Utah, USA // Syst Appl Microbiol. 1988. V. 11. P. 36-43.
27. Franzmann P. D., Burton H. R. and McMeekin T. A. *Halomonas subglaciescola*, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica // Internat. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 27-34.
28. Hebert A. M. and Vreeland R. H. Phenotypic comparison of halotolerant bacteria: *Halomonas halodurans* sp. nov. nom. rev. comb. nov. // Internat. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 347-350.
29. James S. R., Dobson S. J., Franzmann P. D. and McMeekin T. A. *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from antarctic saline lakes // Systematic and Applied Microbiology. 1990. V. 13. P. 270-278.
30. Kaye J. Z., Marquez M. C., Ventosa A. and Baross J. A. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: Halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. V. 54. P. 499-511.
31. Quillaguaman J., Hatti-Kaul R., Mattiasson B., Alvarez M. T. and Delgado O. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. V. 54. P. 721-725.
32. (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

33. Okamoto T., Taguchi H., Nakamura K., Ikenaga H., Kurai-shi H. and Yamasato K. *Zymobacter palmae* gen. nov. sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap // Archives of Microbiology. 1993. V. 160. P. 333-337.
34. Lee J. C., Jeon C. O., Lim J. M., Lee S. M., Lee J. M., Song S. M., Park D. J., Li W. J. and Kim C. J. *Halomonas taeanensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern in Korea // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. V. 55. P. 2027-2032.
35. Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г., Гавриш Е.Ю., Демаков В.А., Евтушенко Л.И. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov. – умеренно галофильная бактерия из ассоциации микроорганизмов, утилизирующей нафталин // Микробиология. 2007. Т. 76. № 3. С. 369 - 376.
36. Dobson S. J., James S. R., Franzmann P. D. and McMeekin T. A. Emended description of *Halomonas halmophila* (NCMB 1971(T)) // Internat. J. Systematic Bacteriology. 1990. V. 40. P. 462-463.
37. Quesada E., Valderrama M. J., Bejar V., Ventosa A., Gutierrez M. C., Ruiz-Berraquero F. and Ramos-Cormenzana A. *Volcaniella eurihalina* gen. nov. sp. nov., a moderately halophilic nonmotile gram-negative rod // Internat. J. Systematic Bacteriology. 1990. V. 40. P. 261-267.
38. Dobson S. J. and Franzmann P. D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al., 1983), *Halomonas* (Vreeland et al., 1980), and *Halovibrio* (Fendrich, 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons, 1952) into a single genus *Halomonas* and placement of the genus *Zymobacter* in the family Halomonadaceae // Internat. J. Systematic Bacteriology. 1996. V. 46. P. 550-558.
39. Heyrman J., Balcean A., De Vos P. and Swings J. *Halomonas muralis* sp. nov., isolated from microbial biofilms colonizing the walls and murals of the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria) // Internat. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. V. 52. P. 2049-2054.

HALOALKALIPHILIC DENITRIFIERS '*HALOMONAS NITRITOFILUS*' FROM SODA LAKES BURYATIYA

© 2011 E.A.Semenova, E.A.Gilvanova, N.G.Usanov

The directed screening of denitrifying gram-negative bacteria, phenotypically similar to bacteria of the genus *Halomonas* is carried out. Isolates differ from the "classical" *Halomonas* in pH range for growth (7.0 - 11.0) and rates of denitrification exceeding the known values is several times greater, and in resistance to high concentrations of sodium nitrite and ability to reduce very low starting concentrations of nitrite ion in alkaline conditions. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene obtained isolates identified them as belonging to an amorphous group III phylogenetic ("un-grouped" *Halomonas*) with the level of similarity of 93-98%. The isolates formed two compact clusters within this group with high levels of similarity of 97-100% and similar phenotypic properties. Nominees for a new species of '*Halomonas nitritophilus*' have been proposed in each cluster.

Key words: *Halomonas*, denitrification, nitrite.