УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА.
СЕРИЯ ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

2024, Т. 166, кн. 1
С. 5–22

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 579.26+579.222

doi: 10.26907/2542-064X.2024.1.5-22

ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ РОДА *Dietzia*

А.А. Пьянкова, Е.Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, 614081, Россия

Аннотация

Проведены исследования шести штаммов-деструкторов бензойной кислоты рода *Dietzia*, изолированных из засоленных экотопов, расположенных на территории солеразработок Верхнекамского и Якшинского месторождений (Пермский край, Республика Коми, Россия). Бензойная кислота (БК) может накапливаться в экосистемах в результате техногенных процессов, а также при микробиологическом разложении сложных органических соединений, содержащих ароматическое кольцо. Установлено, что исследуемые штаммы близкородственны видам *D. psychralcaliphila*, *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis*, *D. cercidiphylli* и *D. maris*. Штаммы являются галотолерантными организмами, способными использовать БК в качестве единственного источника углерода и энергии как в отсутствие соли, так и в присутствии 50–70 г/л NaCl. В штаммах выявлены *benA*-гены, кодирующие α-субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы – ключевого фермента разложения БК. Нуклеотидные последовательности генов *benA* исследуемых штаммов имеют наибольшее сходство (79.32–91.38%) с гомологичными последовательностями представителей класса *Actinomycetes* (родов *Dietzia, Mycolicibacterium*, *Geodermatophilus*, *Pseudonocardia*, *Corynebacterium*, *Raineyella*). Охарактеризованные активные деструкторы БК рода *Dietzia* могут быть использованы при разработке технологий биоремедиации загрязненных моно(поли)ароматическими поллютантами объектов окружающей среды, подверженных засолению.

Ключевые слова: месторождение калийно-магниевых солей, галотолерантные бактерии, *Dietzia*, бензойная кислота, гены 16S рРНК, *benA*.

Введение

Представители рода *Dietzia* (семейство *Dietziaceae,* класс *Actinomycetes*) являются широко распространенными бактериями, изолированными из почв (в том числе пустыни Египта и холодной пустыни Гималаев), воздуха, содового озера и морской воды, с поверхности растений, соленых пищевых продуктов, сточных вод, а также клинических образцов человека [1, 2]. В настоящее время род *Dietzia*, по данным базы List of prokaryotic names with standing in nomenclature [3], включает 12 видов. Бактерии рода *Dietzia* применяются в медицинской, химической, пищевой и ряде других отраслей промышленности, перспективны как потенциальный источник ферментов для использования в промышленной ферментации как источник каротиноидных пигментов, а также в качестве

основных бактерий-деструкторов органических поллютантов при биоремедиации загрязненных почв и сточных вод [1].

Представители рода *Dietzia* являются одними из наиболее часто упоминаемых в научной литературе бактерий, способных разлагать алифатические и ароматические углеводороды, а также более сложные органические соединения, являющиеся стойкими загрязнителями окружающей среды [4, 5, 6]. Известно, что промежуточным продуктом разложения многих ароматических соединений (фенола, толуола, бифенила, фталатов и др.) является бензойная кислота (БК) [7, 8]. Накопление БК в окружающей среде связано как с метаболической активностью микроорганизмов и растений, так и с промышленной деятельностью человека. Так, БК и ее производные применяются как сырье в синтезе ряда химических соединений, в качестве консерванта пищевых продуктов, в медицине и парфюмерной промышленности [9]. Данные о способности использовать БК в качестве единственного источника углерода и энергии бактериями рода *Dietzia* в научной литературе крайне ограничены [10].

Ранее бактерии рода *Dietzia* были выделены из подземных и надземных экотопов района добычи и переработки калийно-магниевых солей (Верхнекамское и Якшинское месторождения солей) [11, 12]. Поскольку в образцах засоленных почв, шламов, рассолов, из которых были выделены бактерии, помимо высокого уровня засоления выявлен широкий спектр органических поллютантов, в том числе ароматических соединений [13, 14], можно предположить, что бактерии рода *Dietzia,* изолированные из техногенно засоленных экотопов, способны осуществлять разложение БК.

Цель настоящей работы – физиолого-экологическая и генетическая характеристика бактерий-деструкторов бензойной кислоты рода *Dietzia*, выделенных из района солеразработок Верхнекамского (Пермский край) и Якшинского (Республика Коми) месторождений.

1. Материалы и методы

1.1. Объекты исследований. Для исследования были отобраны бактерии рода *Dietzia*, выделенные ранее из образцов соляных пород, почвы/грунта около солеотвалов, донных отложений шламохранилищ, расположенных в районе промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей (Пермский край), а также из рассола скважины Якшинского месторождения (Республика Коми) (табл. 1).

1.2. Физиолого-экологическая характеристика. Для определения устойчивости к высоким концентрациям NaCl бактерии высевали на агаризованную богатую среду Раймонда (БСР) [11] как без добавления соли, так и при концентрации NaCl до 150 г/л. Бактерии культивировали при температуре 28 °С в течение 2 недель. Рост бактерий оценивали по появлению и размеру колоний.

Рост бактерий при различных значениях pH определяли при концентрации 30 г/л NaCl. Штаммы культивировали на агаризованной среде БСР при pH 7.0, а также на модифицированной среде Пфеннига (г/л): NH_4Cl – 0.5, KH_2PO_4 – 0.5, $MgCl_2$ – 0.5, $CaCl_2$ – 0.05, NaCl – 30, дрожжевой экстракт – 0.5, пептон – 5, агар – 15, pH 9.5 [15]. Рост учитывали на седьмые сутки культивирования.

Для оценки роста при различных температурах штаммы культивировали на агаризованной БСР (30 г/л NaCl) при 4, 28, 35 и 40 °С. Рост учитывали на седьмые сутки культивирования.

Табл. 1

Местообитание и идентификация штаммов рода *Dietzia*

Штамм	Ближайший типовой штамм по гену 16S рРНК из базы данных EzBioCloud	Сходство, %*	Образец выделения	Ссылка
Верхнекамское месторождение солей				
YKS72R1	*D. cinnamea* IMMIB RIV-399^T	99.60	Каменная соль, глубина 411.5–411.6 м	н. р.
BFL18	*D. psychralcaliphila* JCM 10987^T	99.45	Грунт, 1 м от шламохранилища	н. р.
PMK9(8)	*D. psychralcaliphila* JCM 10987^T	99.56	Грунт, 0.5 м от рассолосборника	н. р.
CXP24	*D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis* DSM 44907^T	100	Донные отложения, техногенный щелочной водоем, г. Березники	[12]
CXP37	*D. cercidiphylli* YIM 65002^T	99.89	Донные отложения, техногенный щелочной водоем, г. Березники	н. р.
BNL4	*D. maris* DSM 43672^T	100	Грунт, 0.1 м от шламохранилища	н. р.
NDT10	*D. maris* DSM 43672^T *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis* DSM 44907^T	99.89	Ризосфера ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), 3 м от солеотвала, г. Соликамск	н. р.
Якшинское месторождение солей				
YM18	*D. psychralcaliphila* JCM 10987^T	100	Рассол из скважины	[11]
YM9	*D. maris* DSM 43672^T, *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis* DSM 44907^T	99.89	Рассол из скважины	[11]

Обозначения: н. р. – настоящая работа, * – сходство (%) указано на основе сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемого штамма и ближайших валидных типовых штаммов из базы данных EzBioCloud.

1.3. Способность штаммов к росту на бензойной кислоте проверяли при культивировании в минеральной среде Раймонда (МСР) [16] с добавлением 30 г/л NaCl и БК до конечной концентрации 1 г/л. Культивирование проводили на шейкере Environmantal Shaker – Incubator ES-20/60 (“Biosan”, Латвия) при температуре 28 °С и скорости вращения 140 об/мин в течение 14 сут. Оптическую плотность (A_{600}) культуральной жидкости измеряли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Удельную скорость роста (μ, ч$^{-1}$) рассчитывали по стандартной формуле:

$$\mu = \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{t_2 - t_1},$$

где A_1 и A_2 – оптические плотности культуры в моменты времени t_1 и t_2 соответственно [17].

1.4. ДНК-типирование штаммов бактерий проводили методом BOX-ПЦР [18] на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler (“Bio-Rad Laboratories”, США). Для визуализации ПЦР-продуктов проводили электрофорез в горизонтальном 2%-ном агарозном геле в 1х буфере ТБЭ (трис-борат-ЭДТА) (трис («Хеликон», Россия) – 10.8 г/л, борная кислота («Химпродукт», Россия) – 5.5 г/л, ЭДТА («Хеликон», Россия) – 4 мл/л, вода дистиллированная – 79.7 мл/л) в течение 1.5 ч при комнатной температуре и напряжении 5–15 В/см. Полученные фрагменты анализировали после окрашивания агарозного геля раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 5–10 мин и фотографирования в УФ-свете с помощью системы гельдокументирования BioDocAnalyze (“Bio-Rad Laboratories”, США). Размеры полученных фрагментов определяли с помощью маркера длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия).

1.5. Выделение ДНК из клеток исследуемых штаммов. Единичную колонию чистой культуры бактерий при помощи микробиологической петли помещали в микропробирку «Эппендорф», содержащую 100 мкл 0.05 М NaOH. Микропробирки нагревали в течение 15 мин при температуре 95 °С, затем охлаждали в течение 20 мин при температуре –20 °С. Данную процедуру повторяли четыре раза.

1.6. Амплификация, секвенирование и анализ гена 16S рРНК. Фрагменты гена 16S рРНК амплифицировали с применением универсальных бактериальных праймеров 27F и 1492R [19] на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler (“Bio-Rad Laboratories”, США). Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystem”, США) согласно рекомендациям производителя. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 [20]. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли при использовании баз данных EzBioCloud [21], GenBank [22], Integrated Microbial Genomes and Microbiomes (IMG) [23]. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили с использованием программы MEGA 7.0.

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК исследуемых штаммов рода *Dietzia* депонированы в базе данных GenBank под номерами MW077883, MW077876, ON527781, OP787982-OP787987.

1.7. ПЦР, секвенирование и филогенетический анализ гена *benA*. Амплификацию фрагмента гена *benA* (длиной 521 п.н.), кодирующего α-субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы, проводили при использовании праймеров benA-F (5′-GCCCACGAGAGCCAGATTCCC-3′) и benA-R (5′-GGTGGCGGCGTAGTTCCAGTG-3′), как описано в работе [24]. В качестве положительного контроля использовали ДНК штамма-деструктора бензойной кислоты *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 [25].

Секвенирование и филогенетический анализ гена *benA* проводили, как описано выше (см. раздел 1.6). Нуклеотидные последовательности генов *benA* депонированы в базе данных GenBank под номерами OP824730, OP824731.

1.8. Статистический анализ данных. При статистической обработке результатов исследования рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение трех независимых экспериментов, используя встроенные функции Microsoft Office Excel 2007.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Таксономическая характеристика бактерий рода *Dietzia*. Штаммы рода *Dietzia*, выделенные из района солеразработок (табл. 1), на агаризованной БСР формировали округлые блестящие непрозрачные колонии размером 2–3 мм, с ровным краем, гладкой поверхностью, выпуклым профилем, однородной структурой и мягкой консистенцией. Цвет колоний штаммов варьировал от ярко-оранжевого до кораллово-красного.

У нескольких штаммов было уточнено таксономическое положение (табл. 1). В результате сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длиной 729–935 п.н.) исследуемых бактерий и типовых штаммов рода *Dietzia* показано, что штаммы филогенетически близки видам *D. cinnamea*, *D. psychralcaliphila*, *D. maris*, *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis*, *D. cercidiphylli*, представители которых были изолированы из разных местообитаний (табл. 1, рис. 1).

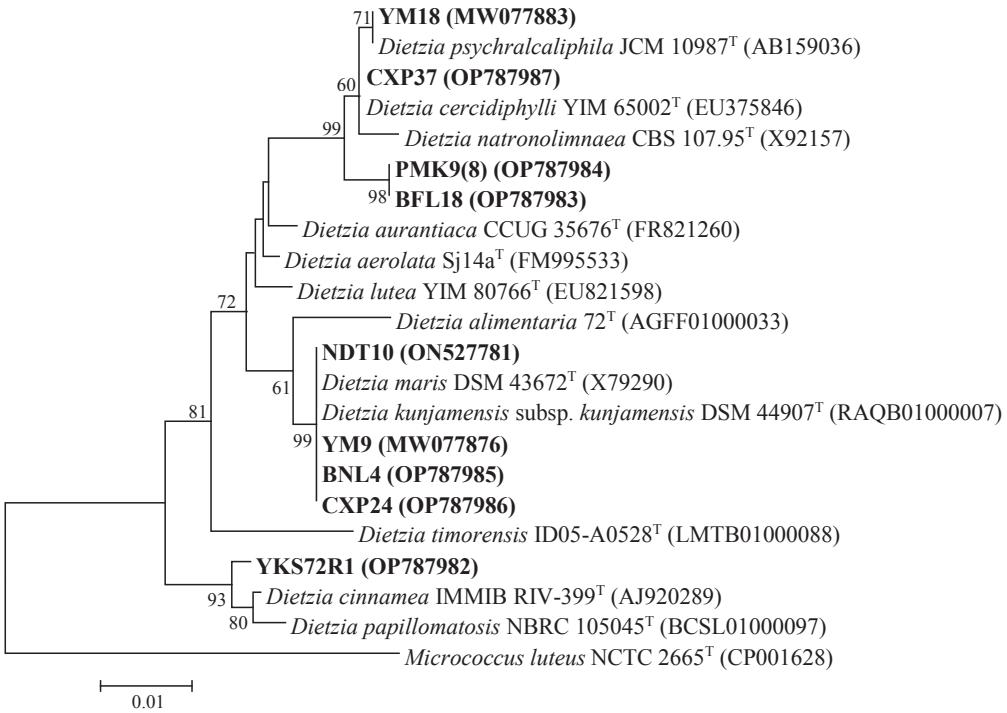

Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода “neighbor-joining”, показывающее положение исследуемых изолятов в роде *Dietzia*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “Jukes-Cantor”. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). В скобках указаны номера в базе данных GenBank. В качестве внешней группы использована последовательность гена 16S рРНК типового штамма вида *Micrococcus luteus*

Из экотопов Верхнекамского месторождения выделены бактерии, близкородственные всем вышеперечисленным видам. Из рассолов скважины (карналлит, глубина залегания – 412.6–416.0 м) Якшинского месторождения выделены штаммы, близкородственные виду *D. psychralcaliphila* (100% сходства с типовым штаммом), а также видам *D. maris* и D. *kunjamensis* subsp. *kunjamensis* (99.89% сходства с типовыми штаммами).

На филогенетическом дереве представлено положение исследуемых штаммов в системе рода *Dietzia* (рис. 1).

Анализ профилей продуктов амплификации, полученных методом BOX-ПЦР, исследуемых изолятов показал, что все штаммы проявляют генетическую гетерогенность и обладают уникальными BOX-профилями (рис. 2).

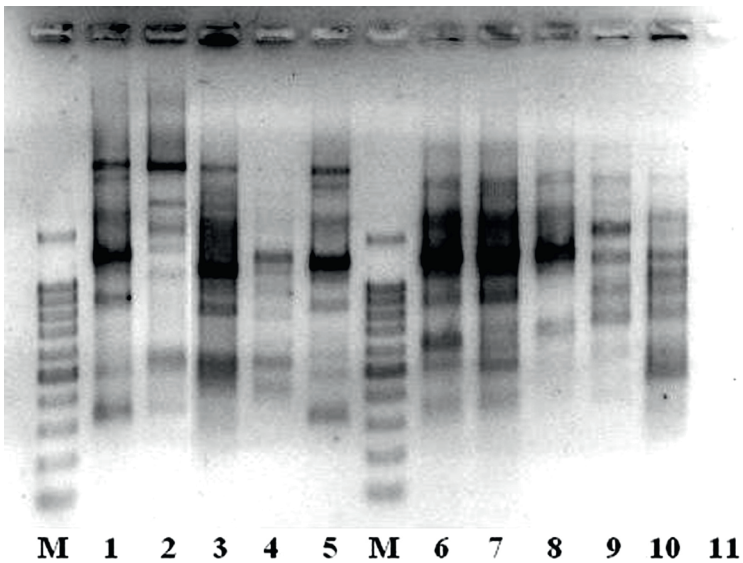

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации BOX-ПЦР штаммов рода *Dietzia*: M – маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder; штаммы: 1 – YKS72R1, 2 – BFL18, 3 – PMK9(8), 4 – YM18, 5 – BNL4, 6 – NDT10, 7 – YM9, 8 – CXP24, 9 – CXP37, 10 – *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, 11 – отрицательный контроль

Результаты исследований показали, что бактерии рода *Dietzia* разных видов широко распространены в засоленных экотопах районов добычи и переработки калийно-магниевых солей (Пермский край и Республика Коми), и, кроме того, штаммы, филогенетически близкие одному виду, демонстрировали уникальные профили генома (BOX-профили).

2.2. Эколого-физиологические характеристики бактерий. Исследована способность штаммов расти в условиях повышенной минерализации среды. Установлено, что большинство культур способны к эффективному росту как в отсутствии NaCl в среде культивирования, так и при концентрации соли до 100 г/л, за исключением штаммов NDT10 и CXP37, которые растут в присутствии до 70 г/л NaCl. *Dietzia* spp. YKS72R1, YM9, PMK9(8) и BFL18 способны к росту при содержании 150 г/л NaCl в среде (табл. 2). Согласно классификации Кашнера, штаммы являются галотолерантными микроорганизмами [26]. В целом, полученные результаты согласуются с литературными данными, однако типовые штаммы видов *D. cinnamea* [27] и *D. psychralcaliphila* [28] растут на среде

с более низким содержанием соли (120 и 100 г/л соответственно), чем близкородственные им штаммы YKS72R1, BFL18 и PMK9(8) (табл. 2).

Табл. 2

Рост штаммов рода *Dietzia* при различных концентрациях NaCl и температурах

Штамм	Содержание NaCl, г/л							Диапазон температур, °С
	0	30	50	70	100	125	150	
YKS72R1	+++	+++	+++	+++	+	+	+	4–37
BFL18	+++	+++	++	++	++	++	+	4–37
PMK9(8)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	4–37
CXP24	+++	+++	+++	+++	+	–	–	4–37
CXP37	+++	+++	+++	+++	+	+	–	4–37
BNL4	+++	+++	+++	+++	+	–	–	10–37
NDT10	+++	+++	+++	+++	–	–	–	4–37
YM18	++	+++	+++	+++	+	–	–	4–37
YM9	+++	+++	+++	+++	+	+	+	4–37

Обозначения: «+» – диаметр колоний до 2 мм, «++» – диаметр колоний 2–4 мм, «+++» – диаметр колоний 5 мм и выше; «–» – отсутствие роста бактерий.

Все исследуемые штаммы показывали активный рост на среде БСР при pH 7.0, а также на среде Пфеннига при pH 9.5. При исследовании способности штаммов расти при разной температуре выявлено, что все штаммы растут на БСР при 4–37 °С, за исключением штамма BNL4, который растет в диапазоне температур 10–37 °С.

2.3. Биодеградационные свойства бактерий. Многие из описанных в научной литературе штаммов рода *Dietzia* осуществляют разложение алифатических и ароматических углеводородов [29–32]. *С*пособность использовать бензоат в качестве единственного источника углерода и энергии установлена для одного штамма рода, *Dietzia* sp. TA1, изолированного из термитника [10].

Результаты наших исследований показали, что шесть из девяти штаммов, близкородственных видам *D. psychralcaliphila*, *D. cercidiphylli, D. maris* и *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis*, способны использовать в качестве ростового субстрата бензойную кислоту (табл. 3).

Так как штаммы были выделены из образцов с повышенным уровнем засоления, была исследована их способность использовать БК в качестве ростового субстрата при различных концентрациях NaCl в среде культивирования. Все деструкторы БК демонстрировали активный рост в среде без содержания NaCl, пять штаммов, кроме штамма YM18, росли при 50 г/л NaCl. Штаммы NDT10 и PMK9(8) были способны к росту на МСР с БК при 70 г/л NaCl. В присутствии 100 г/л соли рост бактерий на МСР с БК не был выявлен (табл. 3). На рис. 3 приведены кривые роста активного деструктора *Dietzia* sp. NDT10 на МСР с БК при различных концентрациях NaCl.

У штаммов BFL18 и YM18 наблюдалось увеличение длительности лагфазы до 216 ч (9 сут) и 264 ч (11 сут) с увеличением концентрации NaCl до 50 г/л и 30 г/л в среде соответственно. Однако величины максимальной A_{600} и удельной

скорости роста оставались сходными как при выращивании в среде без добавления хлорида натрия, так и при повышенных концентрациях NaCl (табл. 3).

Табл. 3

Параметры роста штаммов рода *Dietzia* на МСР с БК (1 г/л) при различных концентрациях хлорида натрия

Параметры роста	Концентрация NaCl в среде, г/л			
	0	30	50	70
Штамм BFL18				
μ, $ч^{-1}$	0.012 ± 0.002	0.01 0± 0.001	0.014 ± 0.002	–
A_{600}	1.19	1.09	1.19	–
Лаг-фаза роста, ч	72	96	264	–
Штамм PMK9(8)				
μ, $ч^{-1}$	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.002
A_{600}	0.60	0.43	0.32	0.34
Лаг-фаза роста, ч	72	72	96	168
Штамм YM18				
μ, $ч^{-1}$	0.012 ± 0.002	0.018 ± 0.002	–	–
A_{600}	1.07	1.07	–	–
Лаг-фаза роста, ч	96	216	–	–
Штамм NDT10				
μ, $ч^{-1}$	0.013 ± 0.002	0.023 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.006 ± 0.001
A_{600}	1.16	0.99	0.96	1.07
Лаг-фаза роста, ч	96	168	264	360
Штамм CXP24				
μ, $ч^{-1}$	0.009 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.008 ± 0.002	–
A_{600}	1.24	1.10	0.97	–
Лаг-фаза роста, ч	72	216	264	–
Штамм CXP37				
μ, $ч^{-1}$	0.013 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.008 ± 0.002	–
A_{600}	1.11	1.14	1.16	–
Лаг-фаза роста, ч	96	168	216	–

Обозначение: «–» – рост культуры отсутствовал.

Штамм PMK9(8) способен расти на МСР с БК при концентрации NaCl до 70 г/л. Наиболее эффективный рост штамм демонстрировал при выращивании на МСР с БК без хлорида натрия. По мере увеличения концентрации NaCl в среде происходило увеличение продолжительности лаг-фазы и снижение максимальной A_{600}. Величина удельной скорости роста не изменялась. У штаммов NDT10, CXP24, CXP37 также наблюдалось увеличение длительности лаг-фазы при повышении концентрации хлорида натрия. Интересно, что при концентрации NaCl 30 г/л у данных штаммов зарегистрирована наивысшая удельная скорость роста по сравнению с ростом на средах с другими концентрациями хлорида натрия. В

то же время, величины максимальной A_{600} сходны при культивировании на среде без добавления соли и при повышенных концентрациях NaCl (табл. 3).

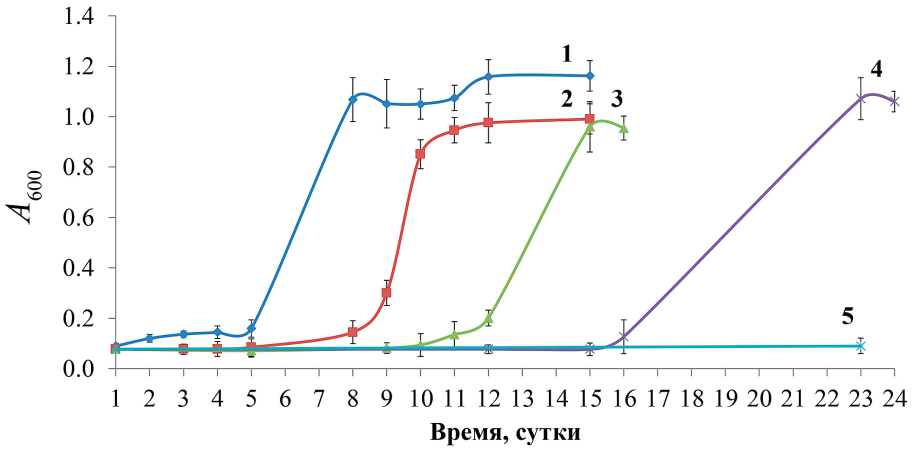

Рис. 3. Рост штамма *Dietzia* sp. NDT10 на МСР с БК при различных концентрациях NaCl (г/л): 1 – 0; 2 – 30; 3 – 50; 4 – 70; 5 – 100

2.4. Амплификация, секвенирование и анализ гена benA. Проведена амплификация гена *benA*, кодирующего α-субъединицу бензоат 1,2 диоксигеназы – ключевого фермента деструкции бензойной кислоты [33]. С использованием праймеров [24] гены *benA* были выявлены у пяти из шести штаммов-деструкторов БК рода *Dietzia* (рис. 4).

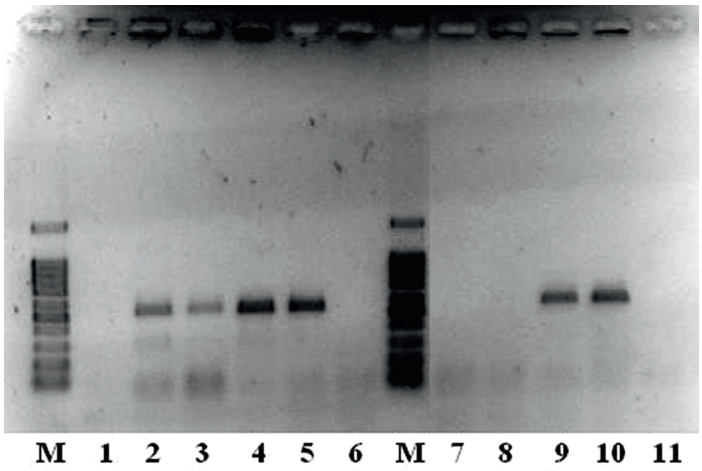

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *benA*: М – маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder; штаммы: 1 – YKS72R1, 2 – BFL18, 3 – NDT10, 4 – PMK9(8), 5 – YM18, 6 – BNL4, 7 – YM9, 8 – CXP24, 9 – CXP37, 10 – *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (положительный контроль), 11 – отрицательный контроль

У штамма CXP24, показывающего активный рост на МСР с БК в качестве ростового субстрата (табл. 3), ген *benA* не был обнаружен, что можно объяснить наличием в геноме штамма CXP24 отличных от присутствующих в других штаммах генов, ответственных за разложение БК. Также гены не были выявлены у штаммов, не растущих на МСР с БК (рис. 4).

Анализ 28 геномов бактерий рода *Dietzia*, представленных в базе данных IMG (Integrated Microbial Genomes and Microbiomes), показал, что в 14 геномах присутствует ген *benA* [23]. Эти данные указывают на то, что не во всех геномах бактерий рода *Dietzia* присутствует данный ген, что совпадает с результатами, представленными в настоящей работе (рис. 4).

Проведены секвенирование и анализ амплифицированных *benA*-генов штаммов-деструкторов. Сравнение *benA*-генов штаммов BFL18 и PMK9(8) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank [22] показало, что наибольшее сходство (на уровне 89.38–91.38%) сравниваемые последовательности имеют с геном α-субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы типового штамма вида *Dietzia psychralcaliphila* [28]. Интересен факт, что с данным типовым штаммом изоляты BFL18 и PMK9(8) наиболее сходны и по гену 16S рРНК (табл. 1, рис. 1). На филогенетическом дереве транслированных аминокислотных последовательностей (ТАП) штаммы BFL18 и PMK9(8) формируют кластер с *D. psychralcaliphila* ILA-1^T, со штаммами *Dietzia* sp. MeA6-2017 и *Dietzia* sp. 2505, изолированными из воды пресноводного озера (США, Вайоминг) и ризосферной почвы (США, Небраска) соответственно, а также типовым штаммом вида *Dietzia aerolata* [34] (рис. 5).

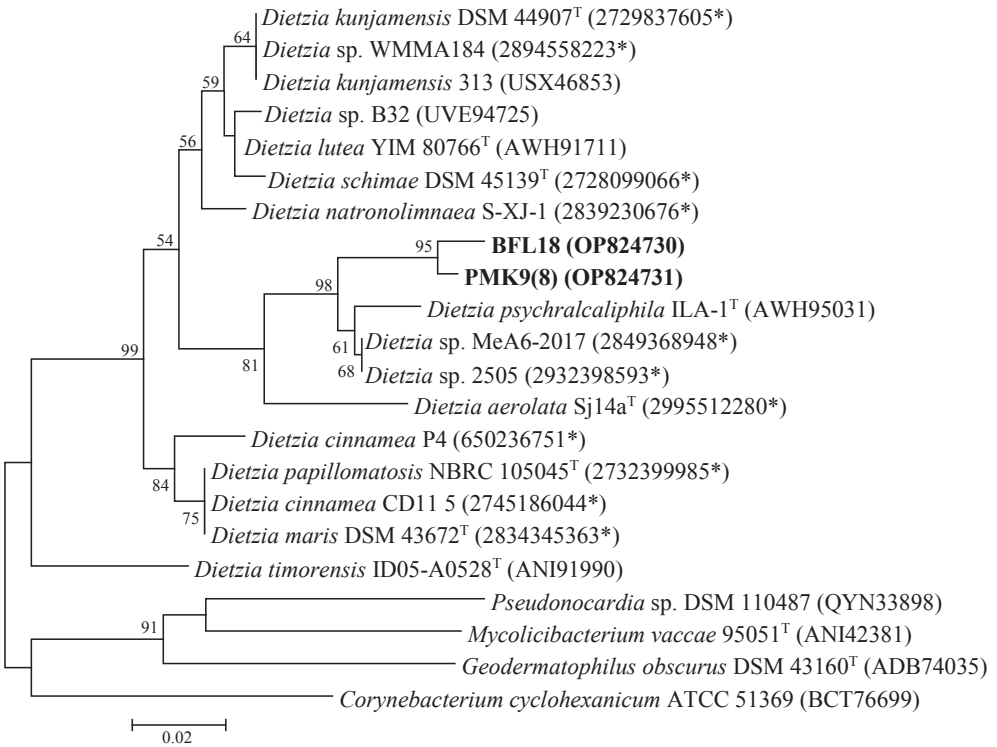

Рис. 5. Положение *benA*-генов исследуемых штаммов рода *Dietzia* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей *benA*-генов с использованием метода “neighbor-joining”. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода “p-distance”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Масштаб соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот. В скобках указаны номера в базах данных GenBank, IMG. * – отмечены номера в базе данных IMG

Отдельный кластер на дереве формируют ТАП *benA*-генов типовых штаммов видов *Dietzia kunjamensis*, *Dietzia lutea*, *Dietzia schimae* [35, 36, 37]. Также в данный кластер входят ТАП ряда штаммов рода *Dietzia*, изолированных из воды, кораллов и нефтезагрязненной почвы (рис. 5). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей *benA*-генов изолятов BFL18 и PMK9(8) и штаммов, входящих в этот кластер, составлял 84.79–89.19%.

На филогенетическом дереве (рис. 5) представлен еще один кластер ТАП *benA*-генов представителей рода *Dietzia* – типовых штаммов видов *D. papillomatosis* и *D. maris*, а также двух штаммов вида *D. cinnamea*, изолированных из клинических образцов и загрязненных почв. Нуклеотидные последовательности *benA*-генов штаммов данного кластера и изолятов BFL18 и PMK9(8) имели сходство на уровне 84.41–87.99%.

Более низкий уровень сходства (79.42–82.21%) по генам *benA* штаммы BFL18 и PMK9(8) имели с типовым штаммом вида *D. timorensis*, выделенным из почвы в Индонезии [38]. На филогенетическом дереве ТАП *benA*-гена штамма *D. timorensis* ID05-A0528^{T} образует отдельную ветвь в кластере представителей рода *Dietzia* (рис. 5).

Нуклеотидные последовательности гена *benA* штаммов BFL18 и PMK9(8) имели сходство на уровне 79.32–83.91% с гомологичными последовательностями представителей других родов класса *Actinomycetes*, ТАП генов *benA* которых на филогенетическом дереве выделяются в отдельную группу (рис. 5).

Амплифицированные гены *benA* деструкторов БК *Dietzia* spp. NDT10, YM18 и CXP37 также были секвенированы, однако последующий анализ показал, что на электрофореграммах присутствует наложение нуклеотидов, что может быть связано с наличием более чем одной копии гена в геномах исследуемых штаммов.

Таким образом, в рамках настоящей работы исследовано таксономическое разнообразие бактерий рода *Dietzia,* выделенных из разных экотопов, расположенных в районах промышленных солеразработок (Пермский край, Республика Коми). Выявлены бактерии рода *Dietzia* (штаммы BFL18, PMK9(8), YM18, NDT10, CXP24, CXP37), которые способны к росту на МСР с БК при повышенной солености среды. Проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ключевого гена (*benA*), участвующего на начальном этапе разложения БК, штаммов-деструкторов BFL18, PMK9(8), YM18, NDT10, CXP37 с гомологичными генами из баз данных GenBank и IMG. Показано, что наибольшее сходство (79.32–91.38%) *benA*-гены исследуемых штаммов имели с таковыми как представителей родов *Dietzia*, так и с другими бактериями класса *Actinomycetes* (родов *Mycolicibacterium*, *Geodermatophilus*, *Pseudonocardia*, *Corynebacterium*, *Raineyella*). Наличие таких генов свидетельствует о возможной деструкции БК клетками в процессе их роста на МСР с БК. Охарактеризованные в этой работе активные деструкторы БК рода *Dietzia* могут быть использованы при создании новых биотехнологий, востребованных при восстановлении засоленных почв, загрязненных токсичными органическими соединениями.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124021900006-5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Gharibzahedi S.M.T., Razavi S.H., Mousavi S.M.* Characterization of bacteria of the genus *Dietzia*: An updated review // Ann. Microbiol. 2014. V. 64, No 1. P. 1–11. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0603-3.
2. *Olowo-Okere A., Ibrahim Y.K.E., Lo C.I., Olayinka B.O., Yimagou E.K., Yacouba A., Mohammed Y., Nabti L.Z., Ragueh A.A., Lupande D., Raoult D., Rolain J.-M., Diene S.M.* Correction to: *Bhargavaea massiliensis* sp. nov. and *Dietzia massiliensis* sp. nov., novel bacteria species isolated from human urine samples in Nigeria // Curr. Microbiol. 2022. V. 79, No 5. Art. 157. https://doi.org/10.1007/s00284-022-02838-0.
3. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. URL: https://lpsn.dsmz.de.
4. *Gurav R., Lyu H., Ma J., Tang J., Liu Q., Zhang H.* Degradation of *n*-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2017. V. 24, No 12. P. 11392–11403. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8446-2.
5. *Venil C.K., Malathi M., Devi P.R.* Characterization of *Dietzia maris* AURCCBT01 from oil-contaminated soil for biodegradation of crude oil // 3 Biotech. 2021. V. 11, No 6. Art. 291. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02807-7.
6. *Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., Skalski T.* Evaluation of the effectiveness of the biopreparation in combination with the polymer γ-PGA for the biodegradation of petroleum contaminants in soil // Materials. 2022. V. 15, No 2. Art. 400. https://doi.org/10.3390/ma15020400.
7. *Moreno M.D.L., Sanchez-Porro C., Piubeli F., Frias L., Garcia M.T., Mellado E.* Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans* // PLoS One. 2011. V. 6, No 6. Art. e21049. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021049.
8. *Li M., Yi P., Liu Q., Pan Y., Qian G.* Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtili* // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2013. V. 85. P. 577–582. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.008.
9. *Olmo A.D., Calzada J., Nuñez M.* Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017. V. 57, No 14. P. 3084–3103. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087964.
10. *Maeda M., Roberts M.S., Ohta Y., Fuji F., Travisano M., Kudo T.* Isolation and characterization of a new aromatic compound-degrading alkalitrophic bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1998. V. 44, No 1. P. 101–106. https://doi.org /10.2323/jgam.44.101.
11. *Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г., Шанина С.Н.* Бактериальное сообщество рассолов, извлекаемых при подземном растворении калийно-магниевых солей Якшинского месторождения (Республика Коми) // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2022. Т. 164, кн. 3. С. 457–474. https://doi.org /10.26907/2542-064X.2022.3.457-474.
12. *Алеев В.С., Нечаева Ю.И., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.* Углеводородокисляющие бактерии из шламохранилища промышленной зоны г. Березники (Пермский край) //

Актуальные аспекты современной микробиологии: сборник тезисов XIII молодежной школы-конференции с международным участием. М., 2022. С. 14–17.

13. *Бачурин Б.А., Одинцова Т.А.* Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень. 2009. № 7. С. 374–380.
14. *Шанина С.Н., Галамай А.Р., Игнатович О.О., Бурдельная Н.С., Валяева О.В.* Органическое вещество соляной толщи южной части Якшинского месторождения калийно-магниевых солей // Геохимия. 2018. № 7. С. 693–708. https://doi.org/10.1134/S0016752518070117.
15. *Pfennig N., Biebl H. Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium // Arch. Microbiol. 1976. V. 110, No 1. P. 3–12. https://doi.org/10.1007/BF00416962.
16. *Raymond R.L.* Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Dev. Ind. Microbiol. 1961. V. 2, No 1. P. 23–32. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900633.
17. *Нетрусов А.И.* Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
18. *Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // Methods Mol. Cell. Biol. 1994. V. 5, No 1. P. 25–40.
19. *Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing // Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.) Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. N.Y.: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
20. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. URL: http://www.megasoftware.net.
21. EzBioCloud Database. URL: http://www.ezbiocloud.net.
22. The National Center for Biotechnology Information. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.
23. Integrated Microbial Genomes and Microbiomes. URL: https://img.jgi.doe.gov.
24. *Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Andreoni V.* Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2008. V. 62, No 1. P. 57–64. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.002.
25. *Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.* Деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49, № 3. С. 267–278. https://doi.org/10.7868/S0555109913030070.
26. *Кашнер Д.* Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 365 с.
27. *Yassin A.F., Hupfer H., Schaal K.P. Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56, No 3. P. 641–645. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63863-0.
28. *Yumoto I., Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y., Matsuyama H. Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52, No 1. P. 85–90. https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-85.
29. *Brito E.M., Guyoneaud R., Goñi-Urriza M., Ranchou-Peyruse A., Verbaere A., Crapez M.A.C., Wasserman J.C., Duran R.* Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil // Res. Microbiol. 2006. V. 157, No 8. P. 752–762. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.03.005.
30. *Al-Awadhi H., Sulaiman R.H.D., Mahmoud H.M., Radwan S.S.* Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 77, No 1. P. 183–186. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1127-1.

31. *Von der Weid I., Marques J.M., Cunha C.D., Lippi R.K., Dos Santos S.C.C., Rosado A.S., Lins U., Seldin L.* Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil // Syst. Appl. Microbiol. 2007. V. 30, No 4. P. 331–339. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.11.001.

32. *Bødtker G., Hvidsten I.V., Barth T., Torsvik T.* Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96, No 4. P. 459–469. https://doi.org/10.1007/s10482-009-9359-y.

33. *Parales R.E., Resnick S.M.* Aromatic ring hydroxylating dioxygenases // Ramos J.L., Levesque R.C. (Eds.) Pseudomonas. Boston, MA: Springer, 2006. P. 287–340. https://doi.org/10.1007/0-387-28881-3_9.

34. *Fang H., Xu J.-B., Nie Y., Wu X.-L.* Pan-genomic analysis reveals that the evolution of *Dietzia* species depends on their living habitats // Environ. Microbiol. 2021. V. 23, No 2. P. 861–877. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15176.

35. *Mayilraj S., Suresh K., Kroppenstedt R.M., Saini H.S. Dietzia kunjamensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56, No 7. P. 1667–1671. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64212-0.

36. *Li J., Chen C., Zhao G.-Z., Klenk H.-P., Pukall R., Zhang Y.-Q., Tang S.-K., Li W.-J.* Description of *Dietzia lutea* sp nov., isolated from a desert soil in Egypt // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32, No 2. P. 118–123. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.11.007.

37. *Li J., Zhao G.-Z., Zhang Y.-Q., Klenk H.-P., Pukall R., Qin S., Xu L.-H., Li W.-J. Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58, No 11. P. 2549–2554. https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000919-0.

38. *Yamamura H., Lisdiyanti P., Ridwan R., Ratnakomala S., Sarawati R., Lestari Y., Triana E., Kartina G., Widyastuti Y., Ando K. Dietzia timorensis* sp. nov., isolated from soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60, No 2. P. 451–454. https://doi.org/10.1099/ijs.0.012229-0.

Поступила в редакцию 24.07.2023
Принята к публикации 23.08.2023

Пьянкова Анна Александровна, соискатель, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН
ул. Голева, д. 13, г. Пермь, 614081, Россия
E-mail: *annpjankva@mail.ru*

Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии техногенных экосистем

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН
ул. Голева, д. 13, г. Пермь, 614081, Россия
E-mail: *peg_el@mail.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI

(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2024, vol. 166, no. 1, pp. 5–22

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.1.5-22

Halotolerant Benzoic Acid-Degrading Bacteria of the Genus *Dietzia*

*A.A. Pyankova *, E.G. Plotnikova ***

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

E-mail: **annpjankva@mail.ru, **peg_el@mail.ru*

Received July 24, 2023; Accepted August 23, 2023

Abstract

Six benzoic acid-degrading bacteria of the genus *Dietzia* were isolated from the saline ecotopes of the Verkhnekamskoe and Yakshinskoe salt deposits (Perm region, Komi Republic, Russia). Benzoic acid (BA) may accumulate in ecosystems through technogenic processes, as well as during the microbiological decomposition of complex organic compounds containing an aromatic ring. The strains studied here were found to be closely related to *D. psychralcaliphila*, *D. kunjamensis* subsp. *kunjamensis*, *D. cercidiphylli*, and *D. maris*. It was shown that they are halotolerant and able to thrive on BA as their sole carbon and energy source in the absence of salt or in the presence of 50–70 g/L NaCl. They also contain *benA* genes encoding the α-subunit of benzoate 1,2-dioxygenase, the key enzyme of BA degradation. The highest level of similarity (79.32–91.38%) was observed between the nucleotide sequences of the *benA* genes of the strains considered and the homologous sequences of *Actinomycetes* representatives from genera such as *Dietzia*, *Mycolicibacterium*, *Geodermatophilus*, *Pseudonocardia*, *Corynebacterium*, and *Raineyella*. The described active BA degraders belonging to the genus *Dietzia* have the potential to aid in the development of bioremediation techniques for environmental objects contaminated with mono(poly)aromatic pollutants and subject to salting.

Keywords: potassium-magnesium salt deposit, halotolerant bacteria, *Dietzia*, benzoic acid, 16S rRNA genes, *benA*

Acknowledgements. This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of state assignment no. 124021900006-5.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Figure Captions

Fig. 1. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic positions of the studied isolates in the genus *Dietzia* based on a comparative analysis of the 16S rRNA gene sequences. Evolutionary distances calculated using the Jukes–Cantor method. Scale bar: one nucleotide substitution per 100 nucleotides. Numbers indicate the statistical support for the branch nodes ascertained using the bootstrap analysis of 1000 replicates (bootstrap values are only shown for nodes that had > 50% support). GenBank numbers are given in parentheses. The 16S rRNA sequence of the *Micrococcus luteus* type strain was used as an outer group.

Fig. 2. Electropherogram of the BOX-PCR amplification products of *Dietzia* strains tested: M – DNA size marker, 100+ bp DNA Ladder; strains: 1 – YKS72R1, 2 – BFL18, 3 – PMK9(8), 4 – YM18, 5 – BNL4, 6 – NDT10, 7 – YM9, 8 – CXP24, 9 – CXP37, 10 – *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, 11 – negative control.

Fig. 3. *Dietzia* sp. NDT10 growth on the RMM with BA at different NaCl concentrations (g/L): 1 – without NaCl, 2 – 30 g/L, 3 – 50 g/L, 4 – 70 g/L, 5 – 100 g/L.

Fig. 4. Electropherogram of the BOX-PCR amplification products of the *benA* gene: M – DNA size marker, 100+ bp DNA Ladder; strains: 1 – YKS72R1, 2 – BFL18, 3 – NDT10, 4 – PMK9(8), 5 – YM18, 6 – BNL4, 7 – YM9, 8 – CXP24, 9 – CXP37, 10 – *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (positive control), 11 – negative control.

Fig. 5. The *benA* genes of the studied *Dietzia* strains on the phylogenetic tree inferred from the comparative analysis of the translated amino acid sequences of the *benA* genes using the neighbor-joining method. Evolutionary distances calculated using the p-distance method. Numbers indicate the statistical support for the branch nodes ascertained using the bootstrap analysis of 1000 replicates (bootstrap values are only shown for nodes that had > 50% support). Scale bar: two amino acid substitutions per 100 amino acids. GenBank and IMG numbers are given in parentheses. IMG numbers are marked with asterisks.

References

1. Gharibzahedi S.M.T., Razavi S.H., Mousavi S.M. Characterization of bacteria of the genus *Dietzia*: An updated review. *Ann. Microbiol*., 2014, vol. 64, no. 1, pp. 1–11. https://doi.org/10.1007/s13213-013-0603-3.
2. Olowo-Okere A., Ibrahim Y.K.E., Lo C.I., Olayinka B.O., Yimagou E.K., Yacouba A., Mohammed Y., Nabti L.Z., Ragueh A.A., Lupande D., Raoult D., Rolain J.-M., Diene S.M. Correction to: *Bhargavaea massiliensis* sp. nov. and *Dietzia massiliensis* sp. nov., novel bacteria species isolated from human urine samples in Nigeria. *Curr. Microbiol*., 2022, vol. 79, no. 5, art. 157. https://doi.org/10.1007/s00284-022-02838-0.
3. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. URL: https://lpsn.dsmz.de.
4. Gurav R., Lyu H., Ma J., Tang J., Liu Q., Zhang H. Degradation of *n*-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*., 2017, vol. 24, no. 12, pp. 11392–11403. https://doi.org/10.1007/s11356-017-8446-2.
5. Venil C.K., Malathi M., Devi P.R. Characterization of *Dietzia maris* AURCCBT01 from oil-contaminated soil for biodegradation of crude oil. *3 Biotech*, 2021, vol. 11, no. 6, art. 291. https://doi.org/10.1007/s13205-021-02807-7.
6. Wojtowicz K., Steliga T., Kapusta P., Brzeszcz J., Skalski T. Evaluation of the effectiveness of the biopreparation in combination with the polymer γ-PGA for the biodegradation of petroleum contaminants in soil. *Materials*, 2022, vol. 15, no. 2, art. 400. https://doi.org/10.3390/ma15020400.
7. Moreno M.D.L., Sanchez-Porro C., Piubeli F., Frias L., Garcia M.T., Mellado E. Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans*. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 6, art. e21049. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021049.
8. Li M., Yi P., Liu Q., Pan Y., Qian G. Biodegradation of benzoate by protoplast fusant via intergeneric protoplast fusion between *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtili*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2013, vol. 85, pp. 577–582. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.04.008.
9. Olmo A.D., Calzada J., Nuñez M. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., 2017, vol. 57, no. 14, pp. 3084–3103. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087964.
10. Maeda M., Roberts M.S., Ohta Y., Fuji F., Travisano M., Kudo T. Isolation and characterization of a new aromatic compound-degrading alkalitrophic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol*., 1998, vol. 44, no. 1, pp. 101–106. https://doi.org/10.2323/jgam.44.101.
11. Pyankova A.A., Plotnikova E.G., Shanina S.N. Bacterial community of the brines extracted during the underground dissolution of potassium-magnesium salts of the Yakshinskoe deposit (Komi Republic, Russia). *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya: Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 3, pp. 457–474. https://doi.org/10.26907/2542-064X.2022.3.457-474. (In Russian)
12. Aleev V.S., Nechaeva Yu.I., Pyankova A.A., Plotnikova E.G. Hydrocarbon-oxidizing bacteria from the sludge storage in Berezniki's industrial zone (Perm region). *Aktual'nye aspekty sovremennoi mikrobiologii: sbornik tezisov XIII molodezhnoi shkoly-konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Emerging Trends in Modern Microbiology: Proc. XIII Youth Sch.-Conf. with Int. Participation]. Moscow, 2022, pp. 14–17. (In Russian)

13. Bachurin B.A., Odintsova T.A. Mining wastes as sources of organic pollution. *Gorn. Inf.-Anal. Byull.*, 2009, no. 7, pp. 374–380. (In Russian)
14. Shanina S.N., Galamay A.R., Ignatovich O.O., Burdelnaya N.S., Valyaeva O.V. Organic matter of the salt sequence in the southern part of the Yakshinskoe potassium-magnesium salt deposit. *Geochem. Int.*, 2018, vol. 56, no. 7, pp. 719–734. https://doi.org/10.1134/S0016702918070108.
15. Pfennig N., Biebl H. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol*., 1976, vol. 110, no. 1, pp. 3–12. https://doi.org/10.1007/BF00416962.
16. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Dev. Ind. Microbiol*., 1961, vol. 2, no. 1, pp. 23–32. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900633.
17. Netrusov A.I. *Praktikum po mikrobiologii* [A Practical Course on Microbiology]. Moscow, Akademiya, 2005. 608 p. (In Russian)
18. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.*, 1994, vol. 5, no. 1, pp. 25–40.
19. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York, John Wiley and Sons, 1991, pp. 115–175.
20. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. URL: http://www.megasoftware.net.
21. EzBioCloud Database. URL: http://www.ezbiocloud.net.
22. The National Center for Biotechnology Information. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.
23. Integrated Microbial Genomes and Microbiomes. URL: https://img.jgi.doe.gov.
24. Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Vincenza A. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2008, vol. 62, no. 1, pp. 57–64. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.002.
25. Egorova D.O., Korsakova E.S., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Degradation of aromatic hydrocarbons by the *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 isolated from waste products of a salt-mining plant. *Appl. Biochem. Microbiol*., 2013, vol. 49, no. 3, pp. 244–255. https://doi.org/10.1134/S0003683813030071.
26. Kushner D.J. *Zhizn' mikrobov v ekstremal'nykh usloviyakh* [Microbial Life in Extreme Environments]. Moscow, Mir, 1981. 365 p. (In Russian)
27. Yassin A.F., Hupfer H., Schaal K.P. *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 2006, vol. 56, no. 3, pp. 641–645. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63863-0.
28. Yumoto I., Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y., Matsuyama H. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 2002, vol. 52, no. 1, pp. 85–90. https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-85.
29. Brito E.M., Guyoneaud R., Goñi-Urriza M., Ranchou-Peyruse A., Andreoni V., Crapez M.A.C., Wasserman J.C., Duran R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol*., 2006, vol. 157, no. 8, pp. 752–762. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.03.005.
30. Al-Awadhi H., Sulaiman R.H.D., Mahmoud H.M., Radwan S.S. Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 2007, vol. 77, no. 1, pp. 183–186. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1127-1.
31. Von der Weid I., Marques J.M., Cunha C.D., Lippi R.K., Dos Santos S.C.C., Rosado A.S., Lins U., Seldin L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. *Syst. Appl. Microbiol*., 2007, vol. 30, no. 4, pp. 331–339. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.11.001.
32. Bødtker G., Hvidsten I.V., Barth T., Torsvik T. Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, vol. 96, no. 4, pp. 459–469. https://doi.org/10.1007/s10482-009-9359-y.

33. Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. In: Ramos J.L., Levesque R.C. (Eds.) *Pseudomonas*. Boston, MA, Springer, 2006. pp. 287–340. https://doi.org/10.1007/0-387-28881-3_9.

34. Fang H., Xu J.-B., Nie Y., Wu X.-L. Pan-genomic analysis reveals that the evolution of *Dietzia* species depends on their living habitats. *Environ. Microbiol*., 2021, vol. 23, no. 2, pp. 861–877. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15176.

35. Mayilraj S., Suresh K., Kroppenstedt R.M., Saini H.S. *Dietzia kunjamensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 2006, vol. 56, no. 7, pp. 1667–1671. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64212-0.

36. Li J., Chen C., Zhao G.-Z., Klenk H.-P., Pukall R., Zhang Y.-Q., Tang S.-K., Li W.-J. Description of *Dietzia lutea* sp nov., isolated from a desert soil in Egypt. *Syst. Appl. Microbiol*., 2009, vol. 32, no. 2, pp. 118–123. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.11.007.

37. Li J., Zhao G.-Z., Zhang Y.-Q., Klenk H.-P., Pukall R., Qin S., Xu L.-H., Li W.-J. *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 2008, vol. 58, no. 11. pp. 2549–2554. https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000919-0.

38. Yamamura H., Lisdiyanti P., Ridwan R., Ratnakomala S., Sarawati R., Lestari Y., Triana E., Kartina G., Widyastuti Y., Ando K. *Dietzia timorensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 2010, vol. 60, no. 2, pp. 451–454. https://doi.org/10.1099/ijs.0.012229-0.

Для цитирования: *Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.* Галотолерантные бактерии-деструкторы бензойной кислоты рода *Dietzia* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 1. С. 5–22. https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.1.5-22.

For citation: Pyankova A.A., Plotnikova E.G. Halotolerant benzoic acid-degrading bacteria of the genus *Dietzia*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 1, pp. 5–22. https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.1.5-22. (In Russian)