

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР УРАЛЬСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ УРАЛЬСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Кириянова Татьяна Денисовна

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ХЛОР- И ГИДРОКСИ-ЗАМЕЩЕННЫХ
БИФЕНИЛОВ И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, доцент,
Егорова Дарья Олеговна

Пермь – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Общая характеристика полихлорированных бифенилов	15
1.2 Методы удаления ПХБ, в том числе используемые для очистки загрязнённых территорий	24
1.2.1 Физико-химические методы	24
1.2.2 Биологические методы	26
1.2.3 Комбинированные методы	27
1.3 Гидроксированные ПХБ – вторичные поллютанты	30
1.4 Аэробные бактерии – перспективные биодеструкторы ПХБ и гидроксированных ПХБ	34
1.4.1 Бактериальные ассоциации и штаммы, осуществляющие трансформацию ПХБ	34
1.4.2. Штаммы аэробных бактерий, осуществляющие трансформацию гидроксированных хлорбифенилов	42
1.4.3 Метаболические пути трансформации ПХБ, НО-ПХБ и их основных метаболитов	43
1.4.4 Роль фермента бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA) в биодеструкции хлор- и гидроксифенилов, и его функциональная специфика	50
1.4.5 Генетические основы аэробной бактериальной трансформации ПХБ и НО-ПХБ	52
1.5 Новые подходы в исследовании биодеструкции ПХБ: кинетика, метаболизм и математическое моделирование	57
1.6 Моделирование белковых структур	59
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	68
2.1 Среды, реактивы, субстраты	68
2.1.1 Среды и условия культивирования	68

2.1.2 Коммерческие соединения	68
2.1.3 Соединения, синтезированные для целей настоящего исследования	69
2.2 Селекция бактериальных ассоциаций	71
2.3 Выделение и описание индивидуальных штаммов	72
2.4 Коллекционный штамм-деструктор стойких органических загрязнителей	72
2.5 Молекулярно-генетические методы	73
2.5.1 Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ)	73
2.5.2 Генетическое типирование бактерий-деструкторов	74
2.5.3 Анализ последовательности гена 16S рРНК	74
2.5.4 Анализ генов <i>benA</i> и <i>bphA1</i>	74
2.5.5 Условия электрофореза амплифицированных фрагментов ДНК и плазмидных ДНК	75
2.5.6 Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ	76
2.6 Моделирование белковой структуры	77
2.6.1 Построение модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>BphA1</i>)	77
2.6.2 Определение качества белковой модели	77
2.6.3 Поиск и анализ области активного центра фермента	78
2.7 Эксперименты по деструкции хлор- и гидроксизамещенных бифенилов и их смесей	78
2.8 Расчет кинетических параметров роста штамма и утилизации субстратов	80
2.9 Аналитические методы	81
2.9.1 Газовая хроматография с масс-селективным детектором (ГХ-МС)	81
2.9.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	81

2.9.3 Спектрофотометрия	81
2.10 Статистические методы	82
Глава 3. АССОЦИАЦИИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА (ХЛОР)АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ, И ИХ БИОДЕГРАДАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	83
3.1. Характеристика бактериальных смешанных культур, полученных с применением Совола в качестве селективного фактора	83
3.2. Ассоциации, полученные при культивировании в минеральной среде с внесением бифенила как источника углерода	90
Глава 4. ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ АССОЦИАЦИЙ	96
4.1 Индивидуальные штаммы, использующие бифенил как источник углерода	96
4.2 Идентификация штаммов, выделенных из смешанной культуры PN2-S	97
4.3 Идентификация штаммов, выделенных из бактериальной ассоциации PN2-B	100
Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ ХЛОР- И ГИДРОКСИ- ЗАМЕЩЕННЫЕ БИФЕНИЛЫ	105
5.1 Бактериальная трансформация моно-замещённых бифенилов	105
5.2. Бактериальная трансформация ди-замещённых бифенилов	112
5.2.1 Бактериальная деструкция 2,4'-дихлорбифенила	112
5.2.2 Бактериальная деструкция 3,4-дихлорбифенила	115
5.2.3 Биодеструкция смеси монохлормоногидроксибифенилов	117
5.3. Разложение три-замещённых бифенилов штаммом <i>Rhodococcus opacus</i> CH628	120

5.4 Разложение тетра-замещённого бифенила и полученной в результате его химической модификации смеси гидрокси-производных	124
5.5 Разложение коммерческих смесей ПХБ и полученных на их основе смесей гидрокси-хлорбифенилов	126
5.5.1 Биодеградация Трихлорбифенила и Совола	126
5.5.2 Биодеградация смеси МЗ, полученной в результате химической модификации смеси ПХБ марки Трихлорбифенил	129
5.5.3 Биодеградация смесей G1, G2 и G3, полученных в результате химической модификации смеси ПХБ марки Совол	131
Глава 6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ХЛОР- И ГИДРОКСИ-БИФЕНИЛОВ	135
6.1. Внехромосомные элементы	135
6.2. Анализ генов, кодирующих бифенил- и бензоат-диоксигеназы, у индивидуальных штаммов	136
6.3. Анализ генома штамма <i>Rhodococcus opacus</i> CH628	139
6.4. Моделирование белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штамма <i>R. opacus</i> CH628	142
6.4.1 Анализ нуклеотидной последовательности <i>bphA1</i> _{CH628}	142
6.4.2 Анализ первичной структуры VphA1 _{CH628}	144
6.4.3 Моделирование вторичной и третичной структуры VphA1	145
6.4.4 Анализ активного центра фермента	156
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	159
ВЫВОДЫ	161
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	164

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема очистки окружающей среды от токсичных и устойчивых соединений, образовавшихся в результате промышленной деятельности человека, приобретает все большую актуальность. Полихлорированные бифенилы (ПХБ) принадлежат к числу наиболее распространенных и экологически значимых загрязнителей биосферы (Reddy *et al.*, 2019; Devi *et al.*, 2020). Согласно Стокгольмской конвенции «О стойких органических загрязнителях» (2001 г), полихлорированные бифенилы запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены (<http://chm.pops.int>). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г, о чем свидетельствует Федеральный закон от 27.06.2011 № 164-ФЗ «О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях». За период коммерческого производства было выпущено более 1,5 млн. т. ПХБ, из которых более 300 тыс. т. попало в объекты окружающей среды (Горбунова и соавт., 2024). На территории России было синтезировано более 180 тыс. т. ПХБ, в составе оборудования в настоящий момент используется 27–30 тыс. т, остальное находится в местах складирования и объектах окружающей среды (https://www.unido-russia.ru/archive/num17/art17_7/ дата обращения 27.06.2025; https://ipen.org/sites/default/files/documents/ru_final_ecospes_pcbs_report_2019.pdf, дата обращения 27.06.2025).

Основной путь трансформации ПХБ в окружающей среде связан с микробной деструкцией (Agulló *et al.*, 2019; Negret-Bolagay *et al.*, 2021). Исследование механизмов микробной трансформации этих соединений имеет важное значение для разработки методов биоремедиации почв и донных отложений, загрязненных ПХБ. Оценка биохимических и генетических особенностей микроорганизмов, способных разлагать ПХБ, является ключевым шагом для создания эффективных биопрепаратов для очистки окружающей среды. В последние десятилетия активно разрабатываются

новые технологии, основанные на применении микроорганизмов для детоксикации загрязненных территорий (Francova *et al.*, 2004; Mizukami-Murata *et al.*, 2016; Negret-Bolagay *et al.*, 2021; Valizadeh *et al.*, 2021; Šrédlová, Cajthaml, 2022).

Проведенные исследования показывают, что ПХБ, попадая в окружающую среду, могут подвергаться гидроксилированию, как под воздействием абиотических процессов, так и под влиянием биотических факторов, что приводит к образованию гидроксипроизводных ПХБ (НО-ПХБ) (Pieper, Seeger, 2008; Tehrani, Van Aken, 2014; Luo *et al.*, 2016; Goto *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). В отличие от исходных соединений, НО-ПХБ имеют низкую летучесть и могут находиться в окружающей среде на много дольше (Sun *et al.*, 2016). С одной стороны - они обладают большей токсичностью чем ПХБ, с другой - более доступны для микробиологической деградации за счет их большей гидрофильности (Tehrani, Van Aken, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). В настоящее время гидроксилированные хлорбифенилы признаны вторичными поллютантами. Для полной минерализации ПХБ и НО-ПХБ требуются бактериальные штаммы с высоким потенциалом разрушения этих соединений.

Особую роль в процессах микробной деградации ПХБ и НО-ПХБ играет фермент бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA) (Elangovan *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Этот фермент участвует в первом и ключевом этапе окисления ПХБ, катализируя их превращение в менее токсичные производные (Su *et al.*, 2019). Моделирование структуры BphA имеет важное значение для понимания механизмов действия фермента и его взаимодействия с различными субстратами (Baig, Manickam, 2010; Cao *et al.*, 2011). Структурные исследования BphA позволяют более точно предсказать его активность и направленность действия на разные типы ПХБ, что открывает возможности для модификации фермента и создания штаммов микроорганизмов с высоким биоремедиационным потенциалом (Zhao *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

Цель исследования – характеристика сообществ аэробных бактерий, сформировавшихся под селективным воздействием бифенила и полихлорированных бифенилов (ПХБ), и оценка функционально-генетического потенциала штаммов-деструкторов хлор- и гидроксизамещенных бифенилов.

Основные задачи исследования:

1. Оценить изменения в структуре бактериальных сообществ техногенных почв (г. Пермь и г. Чапаевск), возникающие в результате длительного воздействия бифенила и коммерческой смеси ПХБ.

2. Исследовать биодegradативный потенциал бактериальных сообществ, полученных в результате селекции, в отношении бифенила и его хлорированных производных.

3. Определить способность активных штаммов-деструкторов бифенила разлагать индивидуальные хлор- и гидроксизамещенные бифенилы, а также их коммерческие и экспериментальные смеси.

4. Провести полногеномный анализ штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029) с целью идентификации генов/ферментов, обуславливающих деградацию бифенила, хлор- и гидроксизамещенных бифенилов, и разработать теоретическую модель пространственной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деградации бифенила.

Научная новизна

Получены новые сведения о сукцессионных процессах, протекающих в аэробных бактериальных сообществах, выделенных из антропогенно загрязненных почв г. Перми и г. Чапаевска, при воздействии коммерческой смеси ПХБ марки Совол и незамещенного бифенила. Установлено, что в составе бактериальных сообществ, сформированных под действием Совола, присутствуют представители классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria* и *Chitinophagia*. Смена селективного фактора на бифенил привела к снижению биоразнообразия в исследуемых бактериальных

ассоциациях. Штаммы-деструкторы бифенила, выделенные из стабильных бифенил-деградирующих ассоциаций, принадлежат к классам *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Actinomycetia*. Следует отметить, что способность к разложению бифенила для представителей родов *Bosea* (класс *Alphaproteobacteria*) и *Pseudoxanthomonas* (класс *Gammaproteobacteria*) описана впервые.

Анализ биодegradативной активности исследованных штаммов показал, что эффективность деструкции (моно-тетра)-замещенных хлор/гидроксибифенилов, а также их коммерческих и экспериментальных смесей, составляла от 7 до 100 %. Трансформация субстратов осуществлялась по классическому метаболическому пути окисления бифенила, через образование гидроксильированных производных и хлор-/гидроксибензойных кислот. Установлено, что генетические детерминанты (ген *bphA1*), обуславливающие первичную атаку на молекулу замещенного бифенила у штаммов, выделенных из ассоциаций PN2-S и PN2-B, формируют отдельную ветвь на филогенетическом дереве, а уровень сходства с генами *bphA1* описанных в литературе штаммов, выделенных из территориально близких эконисш, составил 82,32–99,76 %.

Впервые проведен полногеномный анализ штамма *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029) – проявляющего высокую деградативную активность к хлорированным и гидроксильированным бифенилам, а также к их коммерческим и экспериментальным смесям. Выявлены гены/ферменты, участвующие в окислении бифенила и его производных. Разработаны и проанализированы три модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*BphA1*) штамма *R. opacus* CH628. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего структурного и биохимического изучения бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *R. opacus* CH628.

Теоретическое и практическое значение работы

Проведённое исследование расширяет современные научные представления о микробной деструкции хлор- и гидрокси-замещенных

бифенилов и вносит вклад в развитие экологически ориентированных биотехнологий. Проведён комплексный анализ функционально-генетических особенностей новых штаммов-деструкторов, выделенных в результате селективного культивирования из длительно загрязнённых почв. Экспериментально обоснована деградативная активность исследованных штаммов по отношению к хлорированным и гидроксированным бифенилам, что позволило определить наиболее перспективные штаммы для практического применения в задачах биоремедиации. Штаммы *Achromobacter* sp. PNB6, *Brevibacterium* sp. PNB5, *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5, *Rhodococcus opacus* CH628, *Stenotrophomonas* sp. PNS6 депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов под номерами В-3791, Ас-3018, Ас-3022, В-3792, Ас-3029 и В-3793 соответственно.

Существенным вкладом в развитие представлений о молекулярно-генетической основе бактериальной трансформации замещённых бифенилов является полногеномное секвенирование штамма *R. opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), обладающего выраженной способностью к деструкции хлорбифенилов, коммерческих смесей ПХБ марок Трихлорбифенил и Совол, их химически гидроксированных производных. В результате проведённой работы получена, аннотирована и загружена в международную базу данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) полная нуклеотидная последовательность генома штамма CH628 (номер JBLZMV000000000), что открывает новые перспективы для молекулярно-генетических исследований и биоинженерных разработок.

Дополнительную научную значимость представляет создание в рамках исследования трёхмерных моделей ключевого фермента биодеструкции замещённых бифенилов – α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), что позволяет углублённо анализировать структурно-функциональные характеристики BphA1 и

закладывает основу для последующих *in silico*-экспериментов по модификации ферментативной активности.

Полученные результаты используются в лекционном курсе «Экотехнологии в природопользовании» Пермского государственного национального исследовательского университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Селективное давление коммерческой смеси ПХБ марки Совол и незамещенного бифенила приводит к сукцессионным изменениям в бактериальных сообществах, выделенных из техногенных почв г. Перми и г. Чапаевска. Штаммы-деструкторы бифенила родов *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Starkeya* и *Stenotrophomonas* выделены из Совол-селекционированного сообщества, представители родов *Achromobacter*, *Bosea*, *Brevibacterium* и *Microbacterium* – из бифенил-селекционированного сообщества, тогда как штаммы родов *Pseudoxanthomonas* и *Pseudomonas* выявлены в составе обоих бактериальных сообществ. Биотрансформация бифенила обусловлена наличием у выделенных штаммов гена *bphA1*.

2. Наиболее перспективной для использования в экобиотехнологиях является ассоциация PN2-B, состоящая из штаммов, принадлежащих родам *Achromobacter*, *Bosea*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, так как обладает высокой удельной скоростью роста на бифениле ($\mu = 0,52 \text{ сут}^{-1}$), эффективно разлагает моно- и дихлорированные бифенилы (86,2–100 % в течение 2 сут), а также коммерческие смеси ПХБ торговых марок Совол и Трихлорбифенил (50,9 % и 38,4 % соответственно в течение 3 суток).

3. Штаммы-деструкторы бифенила родов *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* и *Rhodococcus* эффективно разлагают моно(хлор/гидрокси)- и дихлорбифенилы (> 90 %). Наиболее перспективным является штамм *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), осуществляющий разложение индивидуальных (моно-тетра)-замещенных

хлор/гидроксибифенилов, а также их коммерческих и экспериментальных смесей (эффективность деструкции 97,8–100 % в течение 2–14 сут).

4. Штамм *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029) содержит гены/ферменты, обуславливающие трансформацию хлор- и гидрокси-замещенных бифенилов по классическому окислительному пути разложения бифенила. Созданные 3D-модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деградации бифенила, позволили провести анализ активного центра и структуры молекулы фермента.

Апробация работы

Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия», Пермь, 2019; VII Международной научно-практической конференции «Global science and innovations 2019: Central Asia», Нур-Султан, Казахстан, 2019; 24-й и 28-й Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века», Пущино, 2020, 2025; IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков «OpenBio», Новосибирск, 2022; IX Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Пущино, 2023.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, включая 9 экспериментальных статей и 6 публикаций в сборниках материалов Международных и Всероссийских конференций. Экспериментальные статьи: 7 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования Web of Science, Scopus, Белый список (Уровни 1–3), 1 статья в журнале списка ВАК, 1 статья в журнале РИНЦ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу, 48 рисунков и 2 схемы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав

экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 317 литературных источников, в том числе 15 отечественных и 302 зарубежных.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН в рамках тем «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (ГР № АААА-А19-119112290009-1), «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем» (ГР № АААА-А19-119112290010-7), «Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды» (ГР 124020500028-4). Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05016мк.

Работа выполнена на базе Лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» с использованием оборудования ЦКП «Спектроскопия и анализ органических соединений» (ЦКП «САОС»), ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН, а также оборудования молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета.

Личный вклад автора

Экспериментальные исследования выполнены лично автором либо при его непосредственном участии. Проведен анализ научной литературы по теме исследования, осуществлено описание и обсуждение полученных результатов. Диссертант принимал активное участие в подготовке статей к публикации. Моделирование структуры белков было начато автором по его собственной инициативе и научному интересу, что позволило расширить область исследования и внести существенный вклад в общие результаты работы.

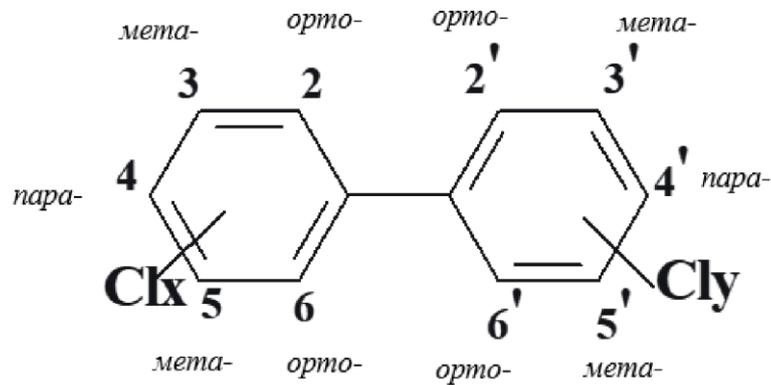
Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность и признательность своему научному руководителю д.б.н., доценту Егоровой Д.О.; заведующей лабораторией микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» д.б.н., доценту Плотниковой Е.Г., старшему научному сотруднику лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» к.б.н., Назарову А. В., а также инженеру лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» Пьянковой А.А. за консультации в ходе выполнения данной работы. Отдельные благодарности сотрудникам Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (Екатеринбург, Россия) за оказанную помощь в создании хлорбифенилов и их химически-модифицированных производных и обработке материалов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика полихлорированных бифенилов

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) — это синтетические органические соединения, полученные из бифенилов путем замещения атомов водорода атомами хлора. Каждый гомолог ПХБ содержит точное количество изомеров: моноклор (3), дихлор (12), трихлор (24), тетрахлор (42), пентахлор (46), гексахлор (42), гептахлор (24), октаклор (12), нонахлор (3) и декахлорбифенил (1). Конгенеры ПХБ различаются количеством и расположением атомов хлора на фенильных кольцах, всего существует 209 конгенов ПХБ (Рисунок 1).



$$x + y = m, m = \text{от } 1 \text{ до } 10$$

Рисунок 1 – Химическая формула молекулы полихлорбифенилов: x , y – количество заместителей в каждом кольце

Благодаря своей химической стабильности, изоляционным свойствам и негорючести, ПХБ использовались в различных коммерческих и химических отраслях. Основными направлениями использования являлись системы теплообмена, резиновые и пластиковые изделия, гидравлические машины, красители, пигменты и бумага для безуглеродных копий (Zhu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). Оценочный общий объем мирового производства ПХБ составляет 1,5 миллиона тонн, не менее 10 % из которых попало в окружающую среду (Wolska *et al.*, 2012). За период производства было выпущено множество коммерческих продуктов, содержащих ПХБ, под такими торговыми

названиями, как Ароклор (США), Хлорфен (Германия), Канехлор (Япония) и Фенклор (Италия) (Hu *et al.*, 2011). В конце 20 века остро встал вопрос о пагубном воздействии ПХБ на окружающую среду, вследствие их высокой токсичности, устойчивости к различным воздействиям и биоаккумуляции. В результате их производство было запрещено.

В последние десятилетия большое внимание уделялось изучению токсичности конгенов ПХБ, показатель токсичности которых был аналогичен полихлорированным дибензофуранам (ПХДФ) и полихлорированным дибензо-*p*-диоксинам (ПХДД). Среди них 12 конгенов ПХБ, содержащие четыре или более атомов хлора, один из которых находится в *орто*-положении, обладают диоксиноподобной токсичностью (DL) и получили название «DL–ПХБ» (Seegal *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015). В тоже время, некоторые ПХБ, включая ПХБ 77, ПХБ 126 и ПХБ 169 (номер конгенера по ИЮПАК), обладают исключительно высокой DL-токсичностью при отсутствии хлорных замещений в *орто*-положении (Carro *et al.*, 2018). Токсичность конгенов DL–ПХБ практически сопоставима с таковым показателем 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксина (ТХДД), самого токсичного из группы ТХДД. Токсический коэффициент эквивалентности (ТКЭ) для 2,3,7,8-ТХДД описывается как 1,0, а ТКЭ других диоксинов и конгенов ПХБ рассчитывается с учетом данного значения. Значения ТКЭ обновляются с учетом самых последних данных, доступных из токсикологических исследований (Berg *et al.*, 2006). В настоящий момент значения ТКЭ для DL–ПХБ находятся в диапазоне 0,00003–0,1, согласно документов, принятых Всемирной организацией здравоохранения (Reddy *et al.*, 2019).

Благодаря своей высокой химической стабильности и широкому спектру применения, ПХБ сохраняются как в биотических, так и в абиотических средах (Zeng *et al.*, 2013). Особые физико-химические свойства сделали ПХБ незаменимыми соединениями для многих направлений промышленного производства. Выдающиеся диэлектрические характеристики – одно из самых значительных свойств ПХБ (Randoll *et al.*, 2014). Низкая электрическая

проводимость и высокая теплоемкость сделали их идеальными для использования в качестве охладителей в электрическом оборудовании.

Легкость транспортировки ПХБ на большие расстояния в атмосфере на пылевых частицах вследствие высокой сорбционной способности приводит к их повсеместному распространению во всех компонентах глобальной экосистемы, включая регионы, где они никогда не использовались (Reddy *et al.*, 2019).

Основная доля ПХБ в окружающей среде накапливается из-за утечек из электрических конденсаторов и трансформаторов, содержащих в качестве диэлектриков коммерческие смеси ПХБ, однако сжигание отходов также является потенциальным источником поступления ПХБ в природу (Tang *et al.*, 2015). ПХБ устойчивы к воздействию кислот и щелочей в значительной степени из-за их гидрофобных свойств, а высокая растворимость ПХБ в жирах позволяет им связываться с липидными сегментами в тканях животных, благодаря чему происходит их поэтапное накопление по мере продвижения по пищевой цепи.

Учитывая их вредные воздействия на всю экосистему, ПХБ были отнесены к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ) и включены в Стокгольмскую конвенцию (<http://chm.pops.int>).

Источники и распространение ПХБ в окружающей среде

Широкое использование ПХБ в различных коммерческих и промышленных процессах и продуктах, а также их неправильная утилизация послужило основными источниками загрязнения окружающей среды данными поллютантами. При разгерметизации или разрушении электрического оборудования, такого как конденсаторы и трансформаторы, а также других отходов, содержащих ПХБ, происходит проникновение ПХБ в воздух и почву (Lavandier *et al.*, 2013). Муниципальное сжигание отходов дополнительно увеличивает уровень и площадь загрязнения, так как применяемые при этом технологии не обеспечивают уровень температур и объема кислорода,

необходимый для разрушения молекулы ПХБ. Помимо этого, ПХБ попадают в окружающую среду через испарение красок, покрытий и пластмасс, прямых утечек в канализацию и ручьи, выбросов на незащищенные свалки, сброса в океан. Впервые в образцах окружающей среды ПХБ были обнаружены в 1966 году при количественном определении ДДТ и его соединений (Huang *et al.*, 2011). С тех пор ПХБ вошли в категорию распространенных загрязнителей глобальной экосистемы. Они обнаруживаются в воздухе, почве, осадках, воде, молоке, рыбе, растениях, человеческой жировой ткани и образцах крови (Zhang *et al.*, 2021; Falahudin *et al.*, 2023; Frossard *et al.*, 2023; Simpson *et al.*, 2024; Ulanova *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024). Удивительно, но остатки ПХБ были замечены даже в регионах без какой-либо промышленной активности, включая снежные отложения в Антарктиде (Eckhardt *et al.*, 2007).

На примере городов Северной Америки показано, что средняя концентрация ПХБ в воздухе городов в 20 раз выше, чем в сельских районах (Herrick *et al.*, 2016). В морской воде в районах с высокой промышленной активностью концентрация ПХБ в 100 раз выше, чем в соответствующих удаленных от берега зонах (Windham *et al.*, 2010).

Степень хлорирования молекулы пропорционально влияет на адсорбцию ПХБ на твердых частицах. В воде ПХБ могут адсорбироваться на поверхность осадков и других органических веществ, что приводит к их накоплению в осадках в значительных количествах. Поллютанты остаются скрытыми в осадках на длительное время и постепенно высвобождаются в воду, которая затем испаряется в атмосферу/воздух. Переход ПХБ из воды в воздух происходит в основном в сухие сезоны (Zhao *et al.*, 2016). ПХБ, присутствующие в воздухе, могут концентрироваться в почве во время дождя и снегопада. Они прилипают к твердым веществам, таким как пыль/сажа, которые легко оседают на поверхности почвы. ПХБ также могут переноситься насекомыми, в результате сорбции на поверхности скелета. Два основных источника проникновения ПХБ в почву – это места захоронения отходов и атмосферный транспорт. Подробное представление о транспортировке ПХБ в

окружающей среде и путях аккумуляции показано на рисунке 2 (<https://myslide.ru>).

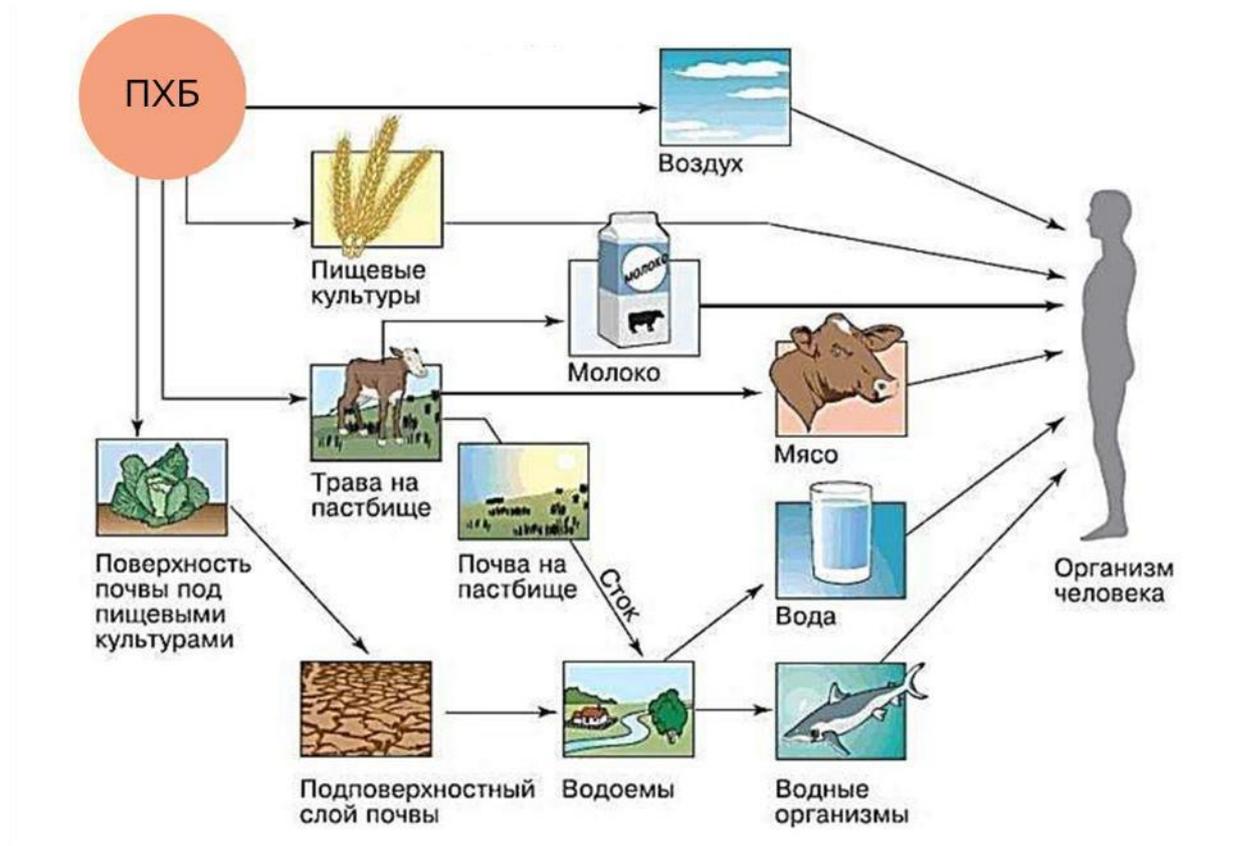


Рисунок 2 – Пути перемещения ПХБ в окружающей среде, приводящие к аккумуляции их в организме человека (<https://myslide.ru>)

Неблагоприятное воздействие ПХБ на человека и биоту

Известно, что ПХБ вызывают широкий спектр токсических реакций у человека, растений и животных. Они могут проникать в организм человека через контакт с кожей, при вдыхании паров, загрязненных ПХБ, и при употреблении пищи, загрязненной остатками ПХБ (Рисунок 2) (Carpenter, 2006; Braouezec *et al.*, 2016; Dean *et al.*, 2024; Ling *et al.*, 2024; Mahire *et al.*, 2023). Поступление данных продуктов разложения ПХБ в организм млекопитающих приводит к изменению клеточных процессов в легких, нарушению выработки гормонов щитовидной железы, торможению активности ферментов в надпочечниках, они мешают работе эстрогеновых рецепторов и влияют на репродуктивную систему (Wu *et al.*, 2018).

Употребление продуктов питания, загрязненных ПХБ, особенно рыбы, мяса и продуктов птицеводства, по-видимому, является основным источником воздействия, хотя концентрация ПХБ в продуктах питания снизилась с конца 70-х годов (Ivanescu, 2015).

Национальная токсикологическая программа и Международное агентство по изучению рака пришли к выводу, что ПХБ являются канцерогенными для человека. Токсикологические исследования ПХБ у людей показали увеличение случаев меланомы, рака желчного пузыря, головного мозга, печени, желудочно-кишечного тракта (Schulz *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024). У людей, подвергшихся высокому уровню воздействия ПХБ через контакт с кожей или при употреблении с пищей, возникают раздражения кожи, такие как тяжелая угревая сыпь и высыпания, инфекции носа, легких и глаз (De Castro *et al.*, 2006).

Кроме того, низкохлорированные ПХБ могут имитировать естественные гормоны организма, особенно эстроген. В результате их проникновения в организм было отмечено нарушение моторики и нервной системы, укорочение менструального цикла, снижение количества сперматозоидов, а у детей – кратковременная потеря памяти и снижение IQ (Leijts *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2019). Высокохлорированные ПХБ проявляют DL-токсичность и изменяют метаболизм половых стероидов в организме, а также влияют на уровни эстрогена и тестостерона (Reddy *et al.*, 2019).

Исследования на лабораторных животных показали, что ПХБ в основном всасываются из пищеварительного тракта и в меньшей степени через кожу. Установлено, что у животных ПХБ оказывают негативное воздействие на желудок, легкие и поджелудочную железу (Korwel *et al.*, 2017). Введение ПХБ в течение 7 сут в организм крыс привело к значительному снижению уровня гормонов щитовидной железы в крови и относительному увеличению массы печени, минимальная концентрация, вызывающая негативные последствия, составила 2,5 мг/кг массы тела в день. В эксперименте с хроническим воздействием (2 года), минимальные

концентрации ПХБ, поступление которых вызвало развитие раковых опухолей и увеличение размера печени варьировали от 1,4 до 5,4 мг/кг массы тела в день в зависимости от смеси ПХБ. Кроме того, ПХБ с большим количеством атомов хлора способствовали образованию опухолей легких и печени у мышей (Korwel *et al.*, 2017).

Накопление ПХБ в почве опасно для всех видов организмов, включая растения. Высокие концентрации ПХБ влияют на биосинтез, ультраструктуру клеток растений, стабильность мембран и ДНК. Адсорбция ПХБ на органических веществах почвы снижает биодоступность данных соединений для растений и микроорганизмов. Отмечено, что под воздействием ПХБ у растений происходит снижение активности фотосинтеза, ухудшение поглощения воды/питательных веществ и проявляются видимые симптомы угнетения роста, потемнения корневых кончиков и в ряде случаев гибель (Aken *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014).

Биоаккумуляция ПХБ

Первоначально ПХБ накапливаются посредством осаждения из воздуха и воды на наземных растениях, водных автотрофах и беспозвоночных, занимающих самые низкие трофические уровни. Далее происходит продвижение ПХБ по пищевым цепям (Frossard *et al.*, 2023). Концентрация ПХБ у видов, питающихся донными отложениями выше, чем содержание ПХБ в осадках. Повышение концентрации ПХБ прослеживается в цепи зоопланктон – моллюски – рыбы – млекопитающие (дельфины, тюлени и киты) (Leigh *et al.*, 2006; Javorska *et al.*, 2011). На суше биомагнификация прогрессирует за счет накопления ПХБ в червях и насекомых из почвы/растений, которые затем достигают млекопитающих и птиц. Концентрация ПХБ в жировых тканях человека как минимум в 100 раз выше, чем в употребляемой пище (Reddy *et al.*, 2019).

В результате исследований установлено, что вдыхание ПХБ может вносить существенный вклад в общее содержание этих веществ в организме

животных и человека, особенно в тех популяциях, где концентрация ПХБ в воздухе высока, а потребление рыбы низкое (Emily, 2010; Braouezec *et al.*, 2016; Daen *et al.*, 2024).

Скорость биоаккумуляции в водных организмах зависит от вида, его среды обитания и конгенера ПХБ (Szczybelski *et al.*, 2016).

Растения поглощают ПХБ как из почвы, так и из воздуха. Большинство многочисленных исследований механизмов поглощения и трансформации ПХБ растениями сосредоточено на поглощении ПХБ корнями растений (Liu, Schnoor, 2008; Kacalkova, Tlustos, 2011). Показано, что содержание липидов в корне сильно влияет на поглощение ПХБ. Первоначально ПХБ накапливаются на поверхности корней, а затем проникают внутрь через свободные от кутикулы неопробковевшие клеточные стенки молодых корневых волосков. Далее происходит перемещение ПХБ к транспортным тканям ксилемы в корнях по свободным межклеточным пространствам. Клеточная стенка клеток коркового слоя корня пористая, благодаря чему ПХБ могут легко перемещаться из раствора в цитоплазму (Zhang *et al.*, 2017).

Разрушение ПХБ под действием природных компонентов в окружающей среде

Устойчивость ПХБ в окружающей среде зависит от количества атомов хлора и их положения на кольцах бифенила. Два фенильных кольца ПХБ могут находиться в одной плоскости (копланарные ПХБ) или в разных перпендикулярных плоскостях (некопланарные ПХБ). Разрушение ПХБ происходит в результате деятельности микроорганизмов и под воздействием солнечного света, причем солнечный свет играет важную роль в разрушении ПХБ, присутствующих в воде, воздухе и на поверхности почвы. Как правило, устойчивость ПХБ в окружающей среде увеличивается с повышением количества атомов хлора (Таблица 1) (Qin *et al.*, 2018). Светоразложение происходит намного медленнее у копланарных конгенов ПХБ по сравнению с некопланарными. В атмосфере ПХБ преимущественно реагируют с водой и

озоном в присутствии солнечного света. Период полураспада ПХБ, содержащих от 1 до 5 атомов хлора, варьируется от 3,5 до 83 дней. ПХБ, присутствующие в воде, разрушаются в основном под воздействием солнечного света (фотолиз). В мелководных водоемах время полураспада варьируется от 17 до 210 дней для ПХБ, содержащих от 1 до 4 атомов хлора, в сухие сезоны (Niu *et al.*, 2006). В почве и осадках большая часть деградации ПХБ происходит под воздействием микроорганизмов.

Таблица 1 – Периоды полураспада диоксино-подобных конгенов ПХБ

№ ПХБ по ИЮПАК	Химическое название ПХБ	Период полураспада (год)			
		Воздух	Вода	Почва	Донные отложения
ПХБ 28	2,4,4'-Трихлорбифенил	0,008	0,165	2,966	2,976
ПХБ 52	2,5,2',5'-Тетрахлорбифенил	0,171	3,422	9,99	9,993
ПХБ 77	3,4,3',4'-Тетрахлорбифенил	0,171	3,422	9,993	9,993
ПХБ 81	3,4,5,4'-Тетрахлорбифенил	0,171	3,422	9,993	9,993
ПХБ 101	2,4,5,2',5'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	9,993	9,993
ПХБ 105	2,3,4,3',4'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	9,993	9,993
ПХБ 114	2,3,4,5,4'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	9,993	9,993
ПХБ 118	2,4,5,3',4'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	6,845	6,845
ПХБ 123	3,4,5,2',4'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	9,993	9,993
ПХБ 126	3,4,5,3',4'-Пентахлорбифенил	0,342	6,845	9,993	9,993
ПХБ 153	2,4,5,2',4',5'-Гексахлорбифенил	0,684	13,689	18,823	18,823
ПХБ 169	3,4,5,3',4',5'-Гексахлорбифенил	0,684	13,689	18,823	18,823
ПХБ 180	2,3,4,5,2',4',5'-Гептахлорбифенил	1,369	27,379	37,645	37,988

1.2 Методы удаления ПХБ, в том числе используемые для очистки загрязнённых территорий

В последние десятилетия было разработано несколько химических, физических и биологических технологий санации для воды, почвы и осадков, загрязнённых ПХБ. В этом разделе рассматриваются традиционные методы санации, включая термическую утилизацию, фиторемедиацию и микробиологическую деструкцию, а также новые методы, появившиеся в результате недавних исследований (Горбунова и др., 2018; Lisa *et al.*, 2010).

1.2.1 Физико-химические методы

Традиционно термическая утилизация является широко используемым методом уничтожения ПХБ, при котором ПХБ реагируют с кислородом с образованием CO_2 , воды и HCl . Однако ПХБ могут выступать источником для образования токсичных полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов (ПХДД) и полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ) при термической обработке, такой как пожар или сжигание (Weidemann *et al.*, 2015). Современные мусоросжигательные установки, способные выдерживать высокие температуры и обеспечивать удаление диоксинов, устранили проблему опасных выбросов (Han *et al.*, 2018). Дальнейшие исследования показали, что присутствие диоксида серы минимизирует образование ПХДД/Ф в процессе сжигания, а сочетание высоких температур ($> 700\text{ }^\circ\text{C}$), доступного кислорода, топлива с высокой теплотой сгорания и длительного времени пребывания предотвращает образование ПХДД/Ф и обуславливает до 99 % разрушения ПХБ (Yaghmaeian *et al.*, 2015).

Фотолиз является одним из методов разрушения ПХБ. Для повышения эффективности процесса фотолиза разработаны катализаторы на основе TiO_2 в сочетании с различными наночастицами, однако данный метод не позволяет удалять ПХБ из непрозрачных сред (Jyothi *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2018).

Следующий метод – это разрушение ПХБ с помощью реакции Фентона, являющейся процессом интенсивного окисления (Advanced Oxidation

Processes - AOP). В этом случае реакция протекает в водном растворе в присутствии или отсутствии света. Данный метод может быть применен для санации почвы и грунтовых вод, загрязнённых ПХБ (Fang *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2018; Wang, Wang, 2018).

Активированный уголь и ультразвуковое излучение являются относительно современными методами, применяемыми для удаления ПХБ на различных загрязненных участках. Исследования показали, что применение активированного угля позволяет извлечь за счет сорбционных процессов до 80 % трихлорбифенилов и тетрахлорбифенилов. Применение ультразвукового излучения при 40 °С с использованием катализатора гидразин гидрохлорида/палладия обеспечивает эффективность деструкции ПХБ >90 % (Lu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013).

SCWO (Supercritical water oxidation) представляет собой метод, который осуществляется в воде при температуре и атмосферном давлении выше критической точки воды (373 °С и 22,064 МПа). В суперкритических условиях вода теряет свои водородные связи и начинает переходить от полярного растворителя к неполярному, что увеличивает растворимость ПХБ в сверхкритической воде. Таким образом, ПХБ разлагаются, образуя CO₂, воду и минеральные кислоты в качестве конечных продуктов (Marulanda, Bolanos, 2010). При типичных рабочих условиях температуры от 550 °С до 650 °С и давления 250 бар метод SCWO обеспечивает более 99 % деградации ПХБ (Fang, Xu, 2014). Следует отметить, что из-за низкой диэлектрической проницаемости суперкритической воды образуются осадки, накопление которых может привести к загрязнению, засорению и эрозии.

Не смотря на то, что описанные физико-химические методы характеризуются высокой эффективностью деструкции ПХБ, они являются энергетически и экономически высокзатратными, а также имеют серьезные ограничения по применению в естественных условиях.

1.2.2 Биологические методы

Микробиологическая ремедиация является одним из наиболее эффективных и экологичных методов, при котором микроорганизмы (бактерии, грибы) играют важную роль в разложении, преобразовании и устранении ПХБ (Negret-Volagay *et al.*, 2021). Биодegradация ПХБ происходит посредством двух различных механизмов: аэробное окисление и анаэробное восстановительное дехлорирование (Elangovan *et al.*, 2019). Положение атомов хлора и их количество могут влиять на степень деструкции конгенов ПХБ. Более эффективно, в большинстве случаев, подвергаются биодegradации ПХБ с атомами хлора на *para*-позициях. Аэробная биодegradация включает окислительное разрушение ПХБ через серию промежуточных продуктов разложения, в то время как анаэробное восстановительное дехлорирование ПХБ включает вытеснение атомов хлора в отсутствие кислорода (Kim *et al.*, 2010).

Некоторые микроорганизмы, такие как представители родов *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Burkholderia*, могут осуществлять полную минерализацию бифенила и некоторых ПХБ (Егорова и соавт., 2013; Leigh *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2007; Murinová *et al.*, 2014; Kir'yanova *et al.*, 2023). Однако ПХБ с высоким содержанием хлора демонстрируют большую устойчивость к дegradации, и только несколько штаммов, таких как *Burkholderia xenovorans* LB400 и *Alcaligenes eutrophus* H850, содержащие бифенил 3,4-диоксигеназу, способны разлагать двойные кольцевые *ortho*-замещённые конгены. Внесение данных штаммов в почву, загрязнённую коммерческими смесями марки Aroclor обеспечивало снижение уровня загрязнённости на 43–85 % (патенты США №4843007; №4843009; №4876201; №5009999). Хотя штамм LB400 является активным деструктором, его эффективность низка по сравнению с *Pandoraea pnotemusa* B356 по отношению к двойным *para*-замещённым соединениям (Murugan, Vasudevan, 2018). Показано, что бактерия *Ensifer adhaerens*, изолированная из почвы, способна разлагать ПХБ в загрязнённой воде в сочетании с процессом

биосорбции (Xu *et al.*, 2016). Применение в качестве агента биоремедиации ассоциаций аэробных бактерий обеспечивает снижение концентрации ПХБ в почве более чем на 80 % (Horvátová *et al.*, 2018; Steliga *et al.*, 2020).

Фиторемедиация является еще одним экологичным методом, для санации почвы, воды и осадков, загрязненных ПХБ и другими хлорированными органическими соединениями, с минимальным воздействием на окружающую среду. Процесс можно разделить на два этапа: биодegradация загрязнителей микроорганизмами в почве или грунтовых водах и их поглощение растениями через корневую систему с последующей трансформацией с помощью растительных ферментов или прямым испарением в атмосферу (Terzaghi *et al.*, 2019; Vergani *et al.*, 2017). Высоким потенциалом деструкции ПХБ характеризуются *Medicago sativa* L. (люцерна посевная), *Lathyrus sylvestris* L. (чина лесная), *Cucurbitaceae* Juss (тыквенные), *Lespedeza cuneata* Michx (клевер китайский кустарниковый), *Phalaris arundinacea* L. (канареечник тростниковидный), *Salix alaxensis* Andersson Coville (ива войлочная), *Sparganium* L. (ежеголовка) и *Picea glauca* Moench Voss (ель сизая) (Slater *et al.*, 2011; Terzaghi *et al.*, 2020). Показано, что применение *Medicago sativa* обеспечило снижение концентрации ПХБ в почве на 31,4 % и 78,4 % после первого и второго года полевых испытаний соответственно (Wyrwicka *et al.*, 2014). *Panicum virgatum* L. (просо прутьевидное) и *Sparganium* обеспечивают деградацию смесей конгенов ПХБ с высоким и низким содержанием хлора (Gregorio *et al.*, 2013).

1.2.3 Комбинированные методы

Использование комбинированных технологий ремедиации стало популярным в последние годы, так как обеспечивает получение результата более эффективно и экономично, чем применение технологий, основанных на одном методе. Комбинированные технологии включают параллельное или последовательное использование нескольких методов. В литературе описаны технологии, включающие химические и физические методы, например

применение гранулированного активированного угля и микроволновой энергии, термического десорбирования и каталитического гидрирования (Liu, Yu, 2006; Aresta *et al.*, 2008). Другие исследования рассматривают использование полимерных гранул с последующей биodeградацией ПХБ, извлеченных с помощью двухфазного разделительного биореактора «твердое тело-жидкость» (Rehmann, Daugulis, 2008). Изучались методы сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода с полимер-стабилизированными наночастицами палладия, железом, покрытым палладием, и аэробными бактериями (Jiang *et al.*, 2018). Перспективным также является электрокаталитическое дехлорирование с палладий-загруженными углеродными нанотрубками в качестве катодов (Chen *et al.*, 2010). Другие подходы включают биоактиваторы и биоремедиацию (Viisimaa *et al.*, 2013).

На сегодняшний день разработано несколько подходов, объединяющих бактерии с физико-химическими методами для повышения эффективности биоремедиации ПХБ. Одним из таких направлений является биоактивация — предварительная обработка субстрата (например, с использованием озона, УФ-излучения или химических реагентов), которая облегчает доступность ПХБ для микробных ферментов. Например, комбинация озонирования и последующего биологического разложения *Achromobacter xylosoxidans* обеспечила 94% утилизации смеси из 9 конгенов ПХБ (Dudasova *et al.*, 2017). Сочетание фотокаталитических систем на основе TiO_2 (в том числе $\text{TiO}_2/\text{g-C}_3\text{N}_4$ и $\text{ZnO}/\text{g-C}_3\text{N}_4$) с бактериями позволило не только ускорить начальный этап деструкции, но и существенно снизить общую токсичность среды, облегчая дальнейшее бактериальное разложение (Jyothi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2018).

Использование бионосителей, таких как активированный уголь, способствует не только адсорбции ПХБ, но и служит платформой для бактериальной биоплёнки, повышая стабильность и выживаемость микробного сообщества в загрязнённой среде (Das *et al.*, 2017).

Так же хорошо себя показало и сочетание предварительной химической обработки и дальнейшей микробиологической деструкции. На первой, химической стадии, промышленная смесь ПХБ (Совол) подвергалась гидроксидехлорированию, в результате которого часть хлорированных соединений была преобразована в гидроксихлорбифенилы. Далее проведено восстановительное дехлорирование, позволившее получить смесь фенилфенолов, пригодных для синтеза прочных электроизоляционных полимеров. На второй, микробиологической стадии, остаточные высокохлорированные компоненты смеси (в частности, содержащие до шести атомов хлора в молекуле) подвергались аэробной деструкции с использованием штамма *Rhodococcus ruber* P25. За 72 часа бактериальной деструкции содержание ПХБ снизилось более чем на 78 % (со 100 % до 21,5 %), включая полную деструкцию всех три- и тетрахлорбифенилов и значительное разрушение пента- и гексахлорбифенилов. При этом в культуральной среде не выявлено накопления токсичных метаболитов (Егорова и соавт., 2011).

Таким образом, основные научные исследования, связанные с ПХБ за последнее время, позволили сделать несколько неожиданных открытий. Прежде всего, концентрации ПХБ в окружающей среде больше не уменьшаются, а в некоторых географических регионах, наоборот, растут (McLachlan *et al.*, 2018). Многолетние исследования токсичности ПХБ подтверждают, что традиционное понимание экологических рисков, связанных с ПХБ, требует пересмотра (Ampleman *et al.*, 2015).

На сегодняшний день разработано множество технологий ремедиации, которые различаются по стоимости, времени очистки, продуктам разложения и экологическим воздействиям. Эффективность каждой технологии зависит от конкретного места, так как она связана с возрастом загрязнения, типом почвы/осадков и геоморфологических условий, а также других экологических аспектов (Halfadji, Touabet, 2018). Важной задачей является поиск перспективных методов ремедиации для эффективного разрушения ПХБ *in-*

situ и *ex-situ*, для оценки их экологических сложностей и рисков, связанных с внедрением соответствующей технологии.

1.3 Гидроксिलированные ПХБ – вторичные поллютанты

Гидроксिलированные полихлорбифенилы (НО-ПХБ) являются вторичными загрязнителями, которые образуются путем окислительной трансформации ПХБ как в биологических, так и в абиотических процессах (Рисунок 3) (Tehrani, Van Aken, 2014). Всего насчитывают 839 производных ПХБ, содержащих одну гидроксильную группу. НО-ПХБ, возникающие в результате метаболических процессов, способны попадать в окружающую среду, а затем проникать в пищевые цепи. Это может происходить через такие механизмы, как выделение отходов, хищнические взаимоотношения и циклические процессы в природе, связанные с ростом и обновлением растительности (Tehrani, Van Aken, 2014). Кроме того, как показали Saktrakulkla *et al.* (2022), донные отложения, особенно в старых промышленных зонах, являются не просто накопителями, но и активными площадками *in situ* преобразования ПХБ в гидроксिलированные производные.

На рисунке 3 Б представлен путь абиотического окисления ПХБ до моногидроксिलированного конгенера (Tehrani, Van Aken, 2014). Подобные реакции могут протекать в результате фотохимических взаимодействий в водной и воздушной среде. В частности, в присутствии гидроксильных радикалов ($\bullet\text{OH}$), возникающих под действием солнечного излучения или в процессе очистки сточных вод, летучие ПХБ могут подвергаться окислению с образованием НО-ПХБ. Этот процесс особенно вероятен в поверхностных водах и донных осадках рядом с такими источниками загрязнения, как промышленные сбросы и очистные сооружения. Например, Ueno *et al.* (2007) зафиксировали повышенное содержание НО-ПХБ в водах рядом с городскими очистными сооружениями по сравнению с водами, удалёнными от берега. Saktrakulkla *et al.* (2022) показали, что концентрации НО-ПХБ в осадках, собранных рядом с такими объектами, достигали 18 мкг/г сухого веса (СВ) в

гавани Нью-Бедфорд, при общем уровне ПХБ до 3800 мкг/г СВ, а доля НО-ПХБ составляла до 4,8 % от суммы ПХБ. При этом содержание НО-ПХБ в самих исходных смесях Aroclor было менее 0,0025 % от ПХБ, что однозначно указывает на *экологическое, вторичное происхождение* этих соединений. Такие данные подтверждают, что в донных осадках может происходить накопление НО-ПХБ, образующихся *in situ* за счёт окисления уже присутствующих ПХБ под действием окружающей среды, в том числе через взаимодействие с гидроксильными радикалами.

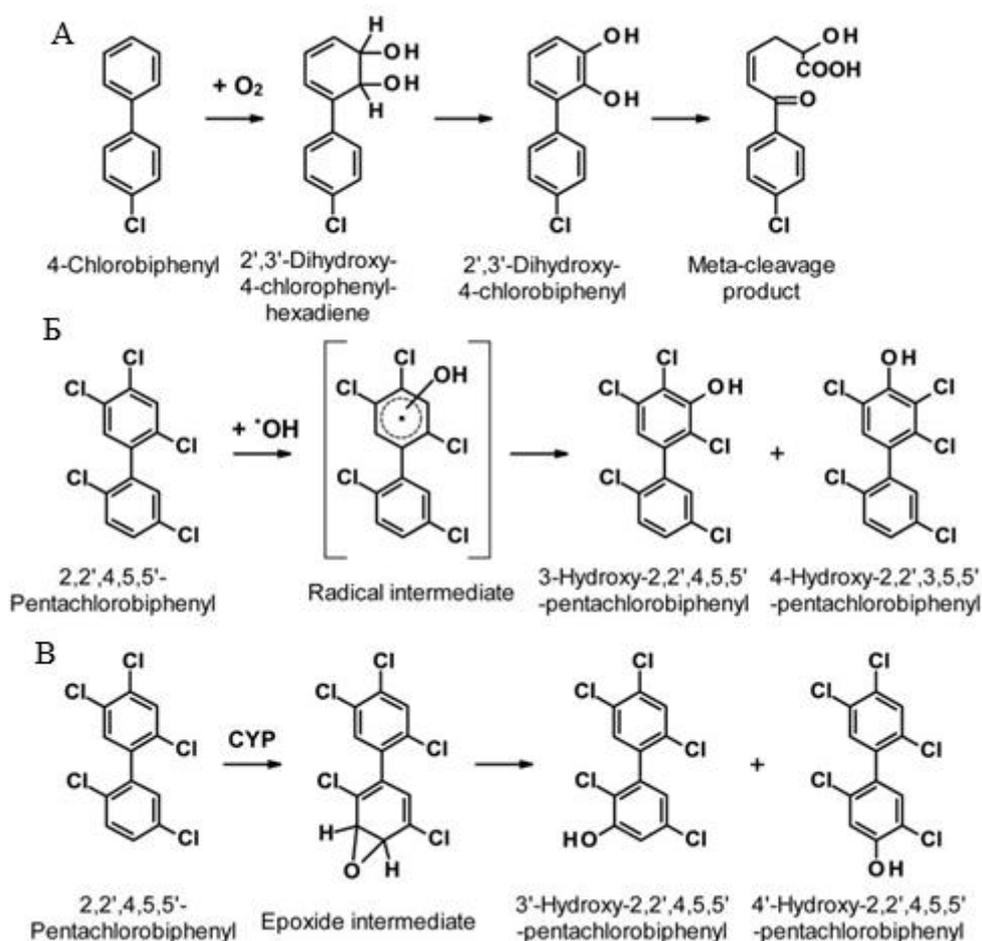


Рисунок 3 – Механизмы образования гидроксированных полихлорированных бифенилов (НО-ПХБ). Путь А: аэробная бактериальная трансформация 4-хлорбифенила (ХБ) через верхний бифенильный путь. Путь Б: окисление в окружающей среде 2,2',4,5,5'-пентахлорбифенила реакцией с гидроксильными радикалами. Путь В: гидроксирование 2,2',4,5,5'-пентахлорбифенила у млекопитающих, опосредованное цитохром Р450 - монооксигеназой. Структура под скобками, показанная на пути Б,

представляет собой резонансные формы гипотетического промежуточного радикала (Tehrani, Van Aken, 2014)

Наиболее подробно описано образование гидрокси-производных ПХБ под действием ферментов микроорганизмов (Francova *et al.*, 2004; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). При этом в окислении могут принимать участие ферменты классов монооксигеназ и диоксигеназ. В первом случае в качестве продукта реакции будут образовываться моногидроксилированные конгенеры ПХБ, во втором – дигидроксилированные конгенеры ПХБ. Дальнейшая трансформация диНО-ПХБ протекает по классическому «верхнему» пути бактериальной деструкции бифенила (Рисунок 3 А), который будет рассмотрен более подробно в Главе 1.4.3 (Fukuda, 2014; Goto *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Моногидроксилированные ПХБ менее доступны для ферментативных систем микроорганизмов, что приводит к их поступлению в окружающую среду в неизменном виде.

У млекопитающих и птиц процесс гидроксилирования ПХБ проходит в печени либо путем прямого введения гидроксильной группы (-ОН), либо путем образования промежуточного соединения, которое спонтанно перестраивается в ОН-продукт (Рисунок 3 В) (Tehrani, Van Aken, 2014). Образовавшиеся НО-ПХБ могут подвергаться дальнейшим реакциям, но некоторые изомеры способны накапливаться в крови. В исследовании (Kunisue, Tanabe, 2009) выявлено, что в крови млекопитающих и птиц присутствуют 4'ОН-ПХБ 79, 2'ОН-ПХБ 114, 3ОН-ПХБ 118, 4'ОН-ПХБ 97, 4'ОН-ПХБ 101, 4'ОН-ПХБ 104, 4ОН-ПХБ 107, 4'ОН-ПХБ 108, 4'ОН-ПХБ 120, 4'ОН-ПХБ 127, 3'ОН-ПХБ 138, 4'ОН-ПХБ 130, 4ОН-ПХБ 134, 4ОН-ПХБ 146, 4'ОН-ПХБ 159, 4ОН-ПХБ 162, 4ОН-ПХБ 163, 3'ОН-ПХБ 180, 3'ОН-ПХБ 182, 3'ОН-ПХБ 183, 3'ОН-ПХБ 184, 4'ОН-ПХБ 172, 4ОН-ПХБ 177, 4ОН-ПХБ 178, 4ОН-ПХБ 187, 4ОН-ПХБ 193, 3'ОН-ПХБ 203, 4'ОН-ПХБ 198, 4'ОН-ПХБ 199, 4'ОН-ПХБ 200, 4'ОН-ПХБ 201 и 4ОН-ПХБ 202 в концентрациях 120–4000 пг/г веса. В крови большого баклана концентрация НО-ПХБ превышала концентрацию ПХБ в 1,7–2,1 раза (Shiki *et al.*, 2009). В плазме белого медведя выявлено более

18 конгенов НО-ПХБ (Letcher et al., 2005). Таким образом, метаболизм ПХБ у млекопитающих и птиц может стать значительным источником НО-ПХБ в окружающей среде.

Растения превращают ПХБ благодаря последовательности реакций, которые имеют сходство с метаболизмом млекопитающих. Как и в других эукариотических клетках, исходная биотрансформация ПХБ в растениях катализируется системой цитохрома P-450 или другими окислительными ферментами, такими как пероксидазы, что приводит к образованию множества моно- и дигидроксилированных метаболитов (Рисунок 3 В) (Masková et al., 2007; Margesin, Schinner, 2001). Гидроксилированию в растениях преимущественно подвергаются низко- и средне- хлорированные конгенеры. Их спектр, по-видимому, ограничивается соединениями с менее чем пятью атомами хлора. В результате поступления 3,3',4,4'-тетрахлоробифенила из гидропонной системы в саженцы тополя (*Populus deltoides* × *nigra*, DN34) в тканях тополя были обнаружены 6-гидрокси-3,3',4,4'-тетрахлоробифенил (6НО-тетрахлоробифенил), 5-гидрокси-3,3',4,4'-тетрахлоробифенил (5НО-тетрахлоробифенил) и 4'-гидрокси-3,3',4,5'-тетрахлоробифенил (4'НО-тетрахлоробифенил). Основным продуктом, 6НО-тетрахлоробифенил, был обнаружен в корнях, нижней коре, нижней древесине, средней коре и средней древесине всего растения тополя, при этом концентрация 6НО-тетрахлоробифенила в корнях была примерно в 10 раз выше, чем концентрация 5НО-тетрахлоробифенила. Однако основным метаболитом у млекопитающих, 4'НО-тетрахлоробифенил, не был обнаружен ни в одном из образцов. Результаты предполагают, что гидроксилированный метаболический путь 3,3',4,4'-тетрахлоробифенил в тополе проходит через эпоксидный интермедиат (Zhai et al., 2010). НО-ПХБ, образовавшиеся в тканях растений, скорее всего, будут высвобождаться в окружающую среду естественным путём (Tehrani, Van Aken, 2014).

Таким образом, продолжающееся накопление гидроксилированных ПХБ в окружающей среде вызывает серьёзную обеспокоенность с точки зрения экологической и санитарной безопасности. Эти соединения обладают способностью нарушать гормональную регуляцию, связываясь с рецепторами эстрогенов, андрогенов и гормонов щитовидной железы, что может привести к репродуктивным, нейротоксическим и метаболическим нарушениям у диких животных и человека. В отличие от родительских ПХБ, НО-ПХБ характеризуются повышенной растворимостью в воде и способностью к транспортировке в биологических системах, что делает их особенно опасными для водных и прибрежных экосистем. При отсутствии мер по контролю их распространения НО-ПХБ могут стать устойчивыми компонентами загрязнения, способными проникать в пищевые цепи и вызывать долговременные последствия для здоровья и биоразнообразия.

1.4 Аэробные бактерии – перспективные биодеструкторы ПХБ и гидроксилированных ПХБ

1.4.1 Бактериальные ассоциации и штаммы, осуществляющие трансформацию ПХБ

На сегодняшний день накоплен большой объем информации о разнообразии бактерий, способных осуществлять полную или частичную деструкцию хлорароматических соединений, в том числе и ПХБ. Описанные в литературе штаммы-деструкторы ПХБ принадлежат к различным таксономическим и экологическим группам. Способность к утилизации или частичной трансформации данных соединений обнаружена у представителей родов *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Dehalococcoides*, *Desulfitobacterium*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas*, *Terrabacter* (Chaudhry, Chapalamadugu, 1991; Arensdorf, Focht, 1994;

Dyksterhouse *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996; Pellizari *et al.*, 1996; Unterman, 1996; Gilbert, Crowley, 1997; Hernandez *et al.*, 1997; Mondello *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1997; Daane *et al.*, 2001; Fedi *et al.*, 2001).

В таблице 2 представлены данные о наиболее известных штаммах и бактериальных ассоциациях, осуществляющих деструкцию различных конгенов ПХБ и их смесей (Горбунова и соавт., 2024; Wopp *et al.*, 1986; Kim, Picardal, 2000; Kim, Picardal, 2001; Adebuseye *et al.*, 2008; Pori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009; Plotnikova *et al.*, 2012; Murínová *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014; Jayanna, Gayathri, 2015; Mizukami-Murata *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2016; Teng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Bhattacharya *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2018; Egorova *et al.*, 2018; Horváthová *et al.*, 2019; Pathiraja *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020; Bako *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021; Gorbunova *et al.*, 2022; Sandhu *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

Как следует из таблицы 2, наиболее перспективными для применения в экобиотехнологиях, направленных на разложение низкохлорированных бифенилов, являются штаммы родов *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Sphingomonas*, осуществляющие 100 %-ную деструкцию соответствующих субстратов (Unterman 1996; Wiegel, Wu, 2000; Daane *et al.*, 2001; Hiraoka, Kimbara, 2002; Stope *et al.*, 2002). Для разложения средне- и высокохлорированных конгенов ПХБ наиболее перспективными следует рассматривать штаммы *Sinorhizobium meliloti* NM и *Comamonas testosteroni* QL, которые осуществляют более 90% деградации данных ПХБ. Лидирующими штаммами в разложении коммерческих смесей ПХБ являются *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 и *Rhodococcus ruber* P25, выделенные из почв, загрязнённых полихлорированными соединениями в различных климатических регионах России.

Таблица 2 – Биодеструкция конгенов ПХБ и их смесей под действием аэробных штаммов в минеральной среде

№№ п./п.	Бактериальные штаммы	Источник выделения	Конгены ПХБ и их смеси	Концентрация	Биодеструкция, %
1	<i>Achromobacter xylosoxydans</i> IR08	ПХБ-загрязненная почва, Нигерия	2-ХБ 3-ХБ 4-ХБ	0,27 ммоль/л	100
2	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	ПХБ-загрязнённая почва, США	4-ХБ	50 мг/л	98
3	<i>Pseudomonas</i> sp. CB-3	Почва химического завода, Китай	4-ХБ	50 мг/л	100
4	<i>Rhodococcus ruber</i> P25	Почвы, загрязненные галогенорганическими соединениями, Россия	4-ХБ	94,25 мг/л	100
5	<i>Ralstonia</i> sp. SA-3	ПХБ-загрязненная почва, Нигерия	2-ХБ 3-ХБ 4-ХБ	100 ppm (1×10^{-4} М)	99,0 98,0 88,0
6	<i>Ralstonia</i> sp. SA-4	ПХБ-загрязненная почва, Нигерия	2-ХБ 3-ХБ 4-ХБ	100 ppm (1×10^{-4} М)	99,0 97,0 97,0
7	<i>Burkholderia</i> sp. SK-3	ПХБ-загрязнённый ил, США	2-ХБ 3-ХБ 4-ХБ	0,48 мМ 0,36 мМ 0,48 мМ	100 83 100
8	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> KT112-7	Техногенно-минеральные образования, Россия	2-ХБ 4-ХБ 2,4'-диХБ	94,25 мг/л 94,25 мг/л 22,30 мг/л	100
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TMU56	ПХБ-загрязненные почвы, Иран	2,4-диХБ	200 ppm (2×10^{-4} М)	89

Продолжение таблицы 2

№№ п./п.	Бактериальные штаммы	Источник выделения	Конгенеры ПХБ и их смеси	Концентрация	Биодеструкция, %
10	<i>Pseudomonas</i> sp.GSa <i>Pseudomonas</i> sp.GSb	Почвы, Индия	2,4-диХБ	1 г/л	90
11	<i>Alcaligenes</i> sp. SK-4	ПХБ-загрязнённый ил, США	2,2'-диХБ 2,4'-диХБ	0,27 ммоль/л	100 100
12	<i>Sphingomonas</i> sp. N-9	Почва, искусственно загрязненная 4-гидрокси-3-хлорбифенилом	2,4'-диХБ 2,5,2'-триХБ 3,4,2'-триХБ	5 мг/л	61,6 14,1 100
13	<i>Bacillus</i> sp. LS1	ПХБ-загрязненная почва, Китай	2,5,2'-триХБ 2,5,2',5'-тетраХБ 3,4,3',4'-тетраХБ	20 мг/л	62,8 59,6 39,8
14	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> МАРВ-6	ПХБ-загрязненная почва, Индия	3,4,3',4'-тетраХБ	50 мг/л	59,89
15	<i>Brucella anthropi</i> МВАР-9	ПХБ-загрязненная почва, Индия	3,4,3',4'-тетраХБ	50 мг/л	30,49
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> МВАР-2	ПХБ-загрязненная почва, Индия	3,4,3',4'-тетраХБ	50 мг/л	27,19
17	<i>Priestia megaterium</i> МАРВ-27	ПХБ-загрязненная почва, Индия	3,4,3',4'-тетраХБ	50 мг/л	4,43
18	<i>Castellaniella</i> sp. SPC4	ПХБ-загрязненная почва, Китай	3,4,3',4'-тетраХБ	50 мг/л 150 мг/л	74,5 20,2
19	<i>Mesorhizobium</i> sp. ZY1	Корневые клубеньки Вики китайской (<i>Astragalus sinicus</i> L.)	3,4,3',4'-тетраХБ	15 мг/л	62,7

Продолжение таблицы 2

№№ п./п.	Бактериальные штаммы	Источник выделения	Конгенеры ПХБ и их смеси	Концентрация	Биодеструкция, %
20	<i>Sinorhizobium meliloti</i> NM	Коллекция сельскохозяйственных культур, Китай	3,4,3',4'-тетраХБ	0,25 мг/л 0,5 мг/л 1,0 мг/л 2,5 мг/л 5,0 мг/л 10,0 мг/л 15,0 мг/л	91,93 74,50 66,92 48,18 29,55 21,49 12,33
21	<i>Methylorubrum sp.</i> ZY-1	Консорциум бактерий, выделенный из почв предприятия по демонтажу электронных отходов, Китай	2,4,5,3',4'-пентаХБ	0,5–3,0 мг/л	79,93–46,47
22	<i>Bacillus foraminis</i> AAJ6	ПХБ-загрязненные почвы, Индия	2,3,2',3'-тетраХБ 2,3,4,5,2',4',5'-гептаХБ	100 мг/кг *	82 45
23	<i>Comamonas testosteroni</i> QL	Отложения реки, Китай	2,3,4,5,6,2',3',4',5',6'-декаХБ	400 мкг/л 700 мкг/л	94,5 62,3
24	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	ПХБ-загрязнённые почвы, Чехия	смесь Delor 103**	100 мг/л	55
25	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ПХБ-загрязнённые почвы, Чехия	смесь Delor 103	100 мг/л	27
26	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ПХБ-загрязнённые почвы, Чехия	смесь Delor 103	100 мг/л	33
27	<i>Pseudomonas veronii</i>	ПХБ-загрязнённые почвы, Чехия	смесь Delor 103	100 мг/л	40
28	<i>Rhodococcus ruber</i>	ПХБ-содержащий ил очистных сооружений, Восточная Словакия	смесь Delor 103	100 мг/л	71
29	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ПХБ-содержащий ил очистных сооружений, Восточная Словакия	смесь Delor 103	100 мг/л	31

Продолжение таблицы 2

№№ п./п.	Бактериальные штаммы	Источник выделения	Конгенеры ПХБ и их смеси	Концентрация	Биодеструкция, %
30	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ПХБ-содержащий ил очистных сооружений, Восточная Словакия	смесь Delor 103	100 мг/л	61
31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	ПХБ-содержащий ил очистных сооружений, Восточная Словакия	смесь Delor 103	100 мг/л	68
32	<i>Achromobacter</i> sp. HR2	ПХБ-загрязненные почвы, Китай	смесь Aroclor 1242	1 мг/л 2 мг/л 5 мг/л 10 мг/л	89,1 82,5 79,2 73,2
33	<i>Enterobacter</i> sp. CGL-1	Ткани корней, стеблей и листьев Ивы извилимтой (<i>S. matsudana</i> f. <i>pendula</i> Schneid)	смесь Aroclor 1242	20 мг/мл	43,2
34	<i>Pseudomonas</i> sp. HR1	ПХБ-загрязненные почвы, Китай	смесь Aroclor 1242	1 мг/л 5 мг/л 10 мг/л	81,8 70,9 50
35	<i>Rhodococcus biphenylivorans</i> TG9	ПХБ-загрязненный речной ил, Китай	смесь Aroclor 1242	50 мг/л	24,3
36	<i>Paraburkholderia xenovorans</i> LB400 (<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400)	ПХБ-загрязнённая почва, США	смесь Aroclor 1248***	25 нг/мл	76
37	Бактериальная ассоциация: <i>Achromobacter</i> sp. NP03 <i>Ochrobactrum</i> sp. NP04 <i>Lysinibacillus</i> sp. NP05	Искусственно загрязненная ПХБ почва и донные речные отложения	смесь Aroclor 1260****	50 мг/л	49,2

Окончание таблицы 2

№№ п./п.	Бактериальные штаммы	Источник выделения	Конгенеры ПХБ и их смеси	Концентрация	Биодеструкция, %
38	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> КТ112-7	Техногенноминеральные образования, Россия	смесь Трихлорбифенил*****	1 г/л	100
			смесь Совол*****	1 г/л	96,1
39	<i>Rhodococcus ruber</i> P25	Почвы, загрязненные галогенорганическими соединениями, Россия	смесь Трихлорбифенил	1 г/л	100
			смесь Совол	1 г/л	95,8

Примечание. * указана начальная концентрация конгенов в 1 кг трансформаторного масла; ** коммерческий продукт Delor 103 представляет собой смесь моно- (0.3%), ди- (10.8%), три- (52.3%), тетра- (35.5%) и пентахлорбифенилов (1.1%) и является аналогом американской смеси Agoclor 1242; *** коммерческий продукт Agoclor 1248 представляет собой смесь ди- (1%), три- (21%), тетра- (49%), пента – (27%) и гексахлорбифенилов (2%); **** коммерческий продукт Agoclor 1260 представляет собой смесь пента- (12%), гекса- (42%), гепта- (38%), окта- (7%) и нонахлорбифенилов (1%); ***** коммерческий продукт Трихлорбифенил представляет собой смесь ди- (15%), три- (48%), тетра- (29%) и пентахлорбифенилов (4%); ***** коммерческий продукт Совол представляет собой смесь три- (1%), тетра- (22%), пента- (56%), гекса- (20%) и гептахлорбифенилов (1%) .

Накопленные данные показывают, что микроорганизмы-деструкторы ПХБ не специфичны для определенной экологической ниши. Они широко распространены в естественных и подвергающихся антропогенному воздействию почвах, речных и морских экосистемах, входят в состав микробных сообществ донных отложений и активного ила (Таблица 2) (Egorova *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020; Bako *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2021; Gorbunova *et al.*, 2022; Sandhu *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

Процессы естественной селекции бактерий с теми или иными свойствами протекают в почвах непрерывно. При этом направление отбора зависит от спектра и количества химических соединений, присутствующих в почве.

Присутствие в окружающей среде стойких органических загрязнителей активирует адаптационные процессы в биотопах и, в частности, инициирует изменения в составе микробиоценозов загрязненных почв. Длительное загрязнение данными соединениями может приводить как к разрушению микробных сообществ почвы (при особо высоких концентрациях ПХБ), так и к адаптации микробиома почвы в процессе селективного отбора бактериальных штаммов, способных разрушать хлорированные бифенилы, их аналоги, а также образующиеся метаболиты (Nogales *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2018).

В работе Sandhu *et al.* (2022) проведён высокопроизводительный метагеномный анализ почв, загрязненных ПХБ, ПАУ и металлами, в районе сталелитейного завода в Бхилаи (Индия). На основе секвенирования полногеномных ДНК с использованием технологии Oxford Nanopore было установлено доминирование бактерий филумов *Proteobacteria* (до 50 %) и *Actinobacteria* (до 22 %). Функциональная аннотация метагенома позволила выявить наличие ключевых генов, вовлечённых в деградацию ПАУ, ПХБ и диоксинов, включая метаболические пути разложения бензоата, катехола, протокатехоата и бензоил-СоА. В числе основных родов штаммов-деструкторов были идентифицированы *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mycobacterium*, *Rhodopseudomonas*, а также *Pseudomonas* и *Anaeromyxobacter*. Существенные различия в структуре сообществ и их метаболическом потенциале между

образцами осадочной (MGB-2) и сухой почвы (MGB-3) коррелировали с различиями в содержании макро- и микроэлементов (С, N, P, Mn, Fe и др.), что указывает на значительное влияние физико-химических факторов на формирование микробных консорциумов. Таким образом, результаты исследования подчёркивают значимость автохтонных микробных сообществ как ключевых агентов в процессах природной биоремедиации техногенно нарушенных экосистем (Sandhu *et al.*, 2022).

1.4.2. Штаммы аэробных бактерий, осуществляющие трансформацию гидроксилированных хлорбифенилов

Для ряда штаммов-деструкторов ПХБ описана способность разлагать гидроксилированные производные хлорбифенилов.

Штамм *Burkholderia xenovorans* LB400 трансформировал три гидроксилированные производные 2,5-дихлорбифенила (2,5-диХБ) – 2'ОН-, 3'ОН- и 4'ОН-2,5-диХБ, как ко-субстрат, при наличии бифенила как основного источника углерода. Напротив, гидроксилированные производные 2,4,6-трихлорбифенила (2,4,6-триХБ) (2'ОН-, 3'ОН- и 4'ОН-2,4,6-триХБ) не были существенно трансформированы *B. xenovorans* LB400, независимо от используемого источника углерода (Tehrani *et al.*, 2014).

Штамм *Sphingomonas* sp. N-9 за 3 суток разлагал 100 % 4НО-3-хлорбифенила и 4НО-3,5-дихлорбифенила, 46,2 % 4НО-3,2',4',6'-тетрахлорбифенила, 32,8 % 4НО-2-хлорбифенила, 23 % 4НО-4'-хлорбифенила и 11 % 4НО-3,5,2',4',6'-пентахлорбифенила (Mizukami-Murata *et al.*, 2016).

Для штамма *Comamonas testosteroni* В-356 описана способность окислять незамещенное кольцо в молекулах 2НО-3-хлорбифенила, 2НО-5-хлорбифенила и 2НО-3,5-дихлорбифенила (Francova *et al.*, 2004).

Основная доля в загрязнении окружающей среды ПХБ приходится на коммерческие смеси, содержащие более 40 конгенов. Трансформация данных смесей под действием ряда факторов приводит к тому, что в природных субстратах присутствуют не единичные конгены гидроксилированных хлорбифенилов, а их

смеси. Однако сведения о разложении смесей НО-ПХБ в литературе крайне ограничены. Так показано, что штамм *Pseudomonas* sp. P1B16 осуществляет разложение гидрокси-производных коммерческой смеси Delor 103 на 10–40 % (Suman *et al.*, 2024). Штаммы *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 и *Rhodococcus ruber* P25 проявляют деградтивную активность к смесям гидроксилированных хлорбифенилов, полученных на основе отдельных конгенов ПХБ, содержащих 2–4 атомов хлора, и на основе коммерческих смесей ПХБ марок Совол и Трихлорбифенил (аналог смеси Delor 103). За период 10–14 сут данные штаммы осуществляют разложение смесей НО-ПХБ на 95–100 % (Egorova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021; Kir'yanova *et al.*, 2023).

1.4.3 Метаболические пути трансформации ПХБ, НО-ПХБ и их основных метаболитов

Окисление ПХБ аэробными бактериями обусловлено активностью комплекса ферментов. На первой стадии происходит окисление молекулы ПХБ под действием ферментов, принадлежащих классам моно- или диоксигеназ.

Окисление монооксигеназами

В ряде работ описано, что окисление молекулы бифенила и хлорированных бифенилов у аэробных бактерий происходит под действием ферментов класса монооксигеназ, и в частности – цитохром P450-монооксигеназами (КФ 1.14.14.1) (Luo *et al.*, 2016; Goto *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2021). На примере штаммов *Pseudomonas* sp. SBUG 2067, *Mycobacterium* sp. PYR-1 и *Rhodococcus* sp. P14 показано, что в результате взаимодействия молекулы бифенила с ферментом цитохром P450-монооксигеназой, происходит замещение атома водорода на гидроксильную группу в одном из ароматических колец (Moody *et al.*, 2002; Mikolasch *et al.*, 2019). Дальнейшая трансформация моно-замещенных гидроксифенилов происходит под действием ферментов класса монооксигеназ, в результате чего образуются дигидроксифенилы. Наиболее описанным является фермент 2-гидроксифенил 3-монооксигеназа (Suske *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2001; Kanteev *et al.*, 2015; Perruchon *et al.*, 2017; Suman *et al.*, 2024). В результате

окисления 3 углеродного атома в кольце 2-гидроксибифенила образуется 2,3-дигидроксибифенил, который далее трансформирует ферментами класса диоксигеназ.

Механизм окисления ПХБ бактериальными цитохром P450-монооксигеназами описан на примере ряда конгенов. При окислении 2,3,4,5-тетрахлорбифенила у штамма *Bacillus subtilis* NCIB-3610 в качестве основного метаболита выявлен 4НО-2',3',4',5'-тетрахлорбифенил. Образование данного конгенера НО-ПХБ происходит в результате окисления незамещенного кольца по 4 углеродному атому цитохром P450-монооксигеназой (Рисунок 4 А) (Sun *et al.*, 2018).

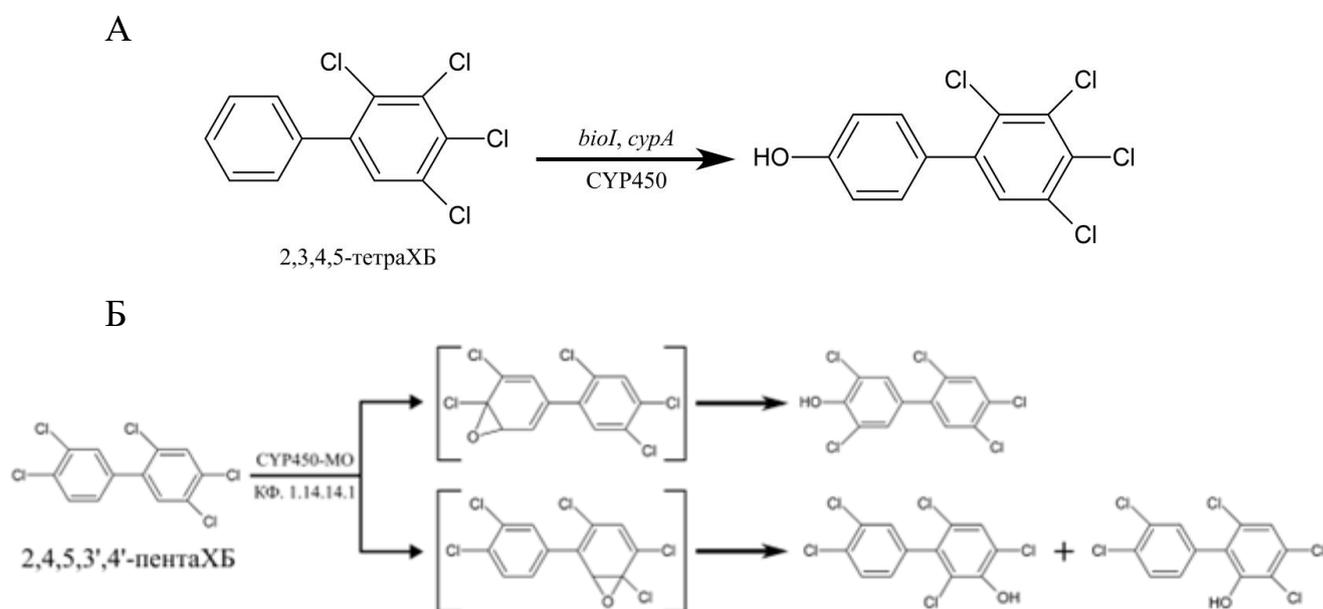


Рисунок 4 – Образование моногидроксилированных производных хлорированных бифенилов под действием монооксигеназ: А – окисление 2,3,4,5-тетрахлорбифенила; Б – окисление 2,4,5,3',4'-пентахлорбифенила (Горбунова и соавт., 2024; Sun *et al.*, 2018).

Сложнее ситуация при окислении конгенов, содержащих атомы хлора в качестве заместителей в обоих кольцах молекулы бифенила. На примере штамма *Bacillus megaterium* ВМЗ показано, что цитохром P450-монооксигеназа осуществляет внедрение гидроксильной группы преимущественно по 4 углеродному атому менее хлорированного кольца молекулы

3,4,2',4',5'-пентахлорбифенила, однако возможны случаи, когда окисление происходит по 3 или 6 углеродным атомам более хлорированного кольца (Рисунок 4 Б) (Горбунова и соавт., 2024; Goto *et al.*, 2018).

В работе (Gorbunova *et al.*, 2022) на основе анализа деструкции коммерческой смеси ПХБ марки Совол и полногеномного анализа предположено, что окисление 2,4,5,2',4',5-гексахлорбифенила и 2,3,4,5,2',4',5-гептахлорбифенила у штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 осуществляется в результате действия цитохром Р450-монооксигеназы.

Дальнейшая бактериальная трансформация моногидроксилированных полихлорбифенилов в настоящий момент изучена не достаточно.

Окисление диоксигеназами и «верхний» путь

Дехлорирование ПХБ зависит от количества и расположения заместителей в молекуле полихлорбифенила и от субстратной специфичности бифенил диоксигеназы. Отщепление иона хлора от молекулы ПХБ происходит в результате диоксигеназной атаки хлорзамещенных атомов углерода в молекуле ПХБ, осуществляемой бифенил диоксигеназой (Haddock *et al.*, 1995; Mondello *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 1999). Понимание структуры и механизма действия этого фермента открывает перспективы для создания эффективных штаммов микроорганизмов и их инженерных модификаций с улучшенными катаболическими свойствами, что может значительно ускорить очистку экосистем от ПХБ.

Первым метаболитом в результате двойного гидроксилирования соседних *орто-мета* атомов углерода одного из колец бифенила, является бифенил-2,3-дигидродиол. Данную реакцию катализирует мультикомпонентная бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA) (Рисунок 5) (Fortin *et al.*, 2006). Бифенил-2,3-дигидродиол окисляется бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназой (BphB) с образованием 2,3-дигидроксибифенила в присутствии НАД⁺, как акцептора электронов. На третьем этапе биодеструкции бифенила 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа осуществляет включение молекулярного кислорода по 1 и 2 углеродным атомам окисленного кольца и расщепление углерод-углеродной связи между ними. В

результате данной реакции образуется 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота (ГОФДК). Фермент, осуществляющий данную реакцию, принадлежит к типу экстрадиольных диоксигеназ (VphC). Конверсию ГОФДК до пентадиеновой и бензойной кислот катализирует 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (VphD), осуществляя разрыв углерод-углеродной связи между 6 и 7 углеродными атомами молекулы. Данный фермент относится к классу α/β гидролаз.

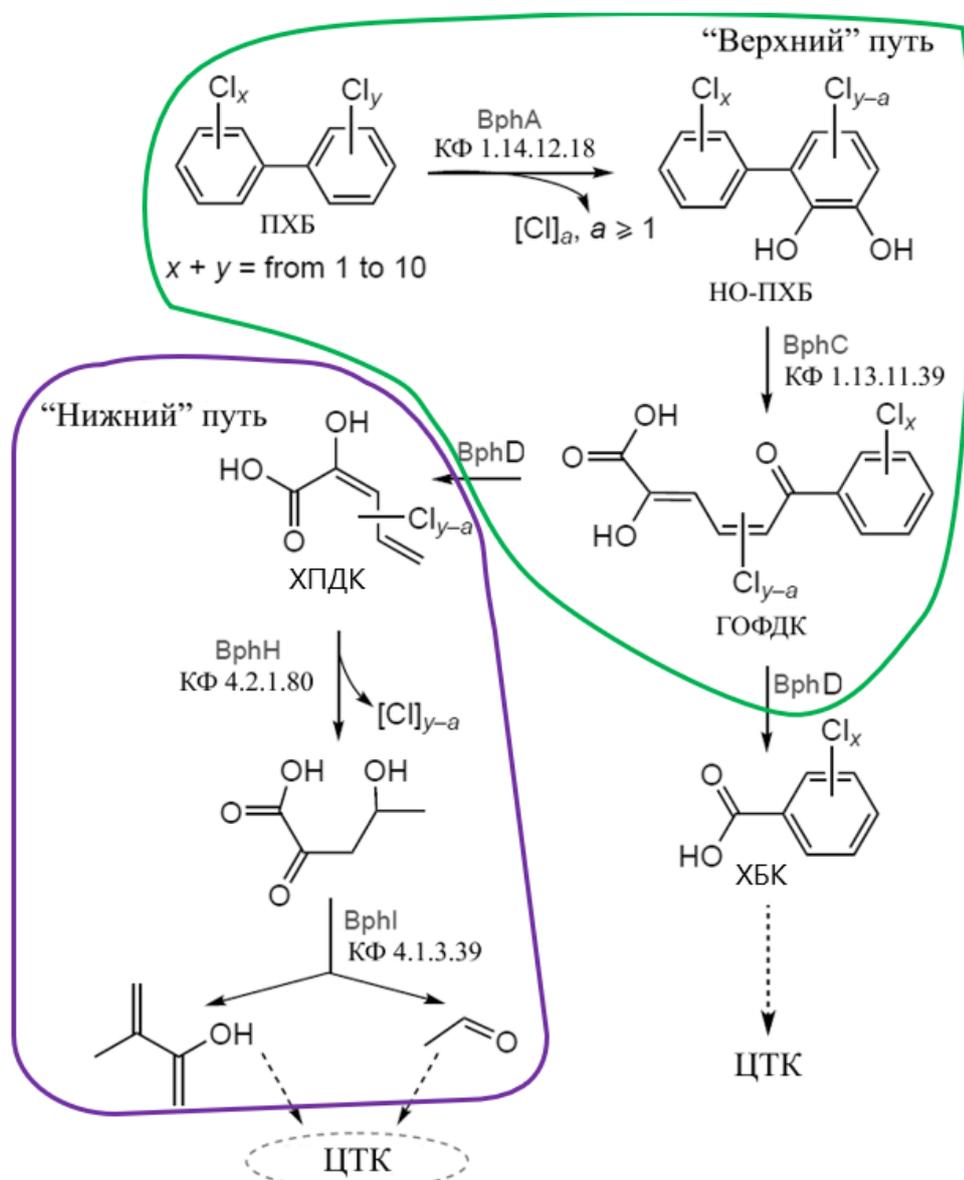


Рисунок 5 – Общая схема «верхнего» и «нижнего» пути аэробной бактериальной деградации полихлорбифенилов (Горбунова и соавт., 2024).

Ферментативная трансформация гидроксированных ПХБ также может протекать при участии бифенил 2,3-диоксигеназы на первом этапе окисления молекулы. Однако последующие этапы не ограничиваются только «верхним» метаболическим путем. На основании изучения ферментативных систем штаммов *B. xenovorans* LB400 и *Comamonas testosteroni* В-356 представлена схема возможных метаболитов при биодеструкции моногидрохлорбифенилов, содержащих заместителей в одном из колец молекулы (Рисунок 6) (Francova *et al.*, 2004).

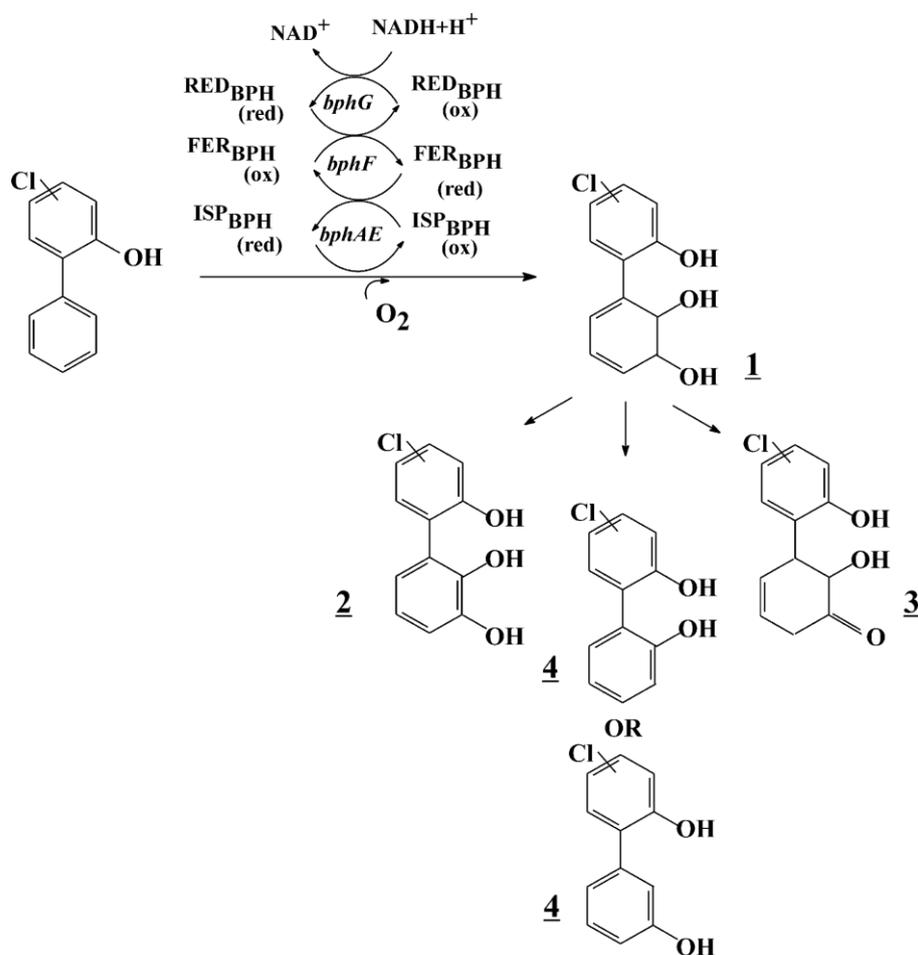


Рисунок 6 – Гидроксированные метаболиты, образованные в результате каталитического окисления 2-гидрокси-хлорбифенила: **1** – *цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидрокси-2'-гидрокси-хлоробифенил; **2** – 2-гидрокси-хлор-2',3'-дигидроксибифенил; **3** – 5-(хлоро-2-гидроксифенил)-6-гидрокси-3-циклогексен-1-кетон; **4** – 2,2'-дигидрокси-хлоробифенил или 2,3'-дигидрокси-хлоробифенил (Francova *et al.*, 2004)

При использовании 2-гидрокси-5-хлорбифенила в качестве субстрата, основным метаболитом был предположительно 5-(5-хлор-2-гидроксифенил)-6-гидрокси-3-циклогексен-1-он, образованный в результате трансформации *cis*-2,3-дигидро-2,3-дигидрокси-2'-гидрокси-5'-хлорбифенила. Также были обнаружены небольшие количества других метаболитов, таких как 2,2'-дигидрокси-5-хлорбифенил и 2,3'-дигидрокси-5-хлорбифенил, которые, вероятно, образовались в результате отщепления ОН-группы. Эти данные указывают на нестабильность дигидродиол-метаболита в реакционных условиях.

Биотрансформация основных метаболитов ПХБ и НО-ПХБ

Основными метаболитами аэробной бактериальной деструкции ПХБ и НО-ПХБ являются (хлор/гидрокси)-2-гидроксипента-2,4-диеновая кислота и (хлор/гидрокси)бензойная кислота (Рисунок 5).

Трансформация (хлор/гидрокси)-2-гидроксипента-2,4-диеновой кислоты происходит под действием ферментов «нижнего» бифенильного пути: 2-кето-4-пентеноат-гидратазы, альдегиддегидрогеназы и 4-гидрокси-2-оксвалератальдолазы. В результате образуется ацетил-коферментА, поступающий в основной обмен клетки (Рисунок 5).

Исследование метаболических путей хлорбензойных кислот у выделенных аэробных штаммов-деструкторов показало, что начальные стадии их трансформации обусловлены действием различных ферментных систем (Рисунок 7). Ключевым этапом разложения ХБК служит удаление атома хлора из молекулы, что способствует увеличению её биодоступности. Процесс дегалогенирования может происходить как до разрушения ароматического кольца, так и после него.

В случаях, когда разложение хлорбензойных кислот происходит под действием ферментов, кодируемых генами *benA*, *clcA* и *fcbaB*, отщепление атома хлора происходит на первом этапе, что приводит к образованию катехола или гидроксibenзойной кислоты (Рисунок 7). Дальнейшая трансформация образовавшихся соединений обусловлена функционированием ферментных

комплексов основного метаболизма клетки. На примере штаммов родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Hydrogenophaga* и *Pseudomonas* показано, что разложение катехола происходит в результате действия ферментов класса диоксигеназ с последующей трансформацией по *орто*-пути (Francisco JR *et al.*, 2001; van Duuren *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2017).

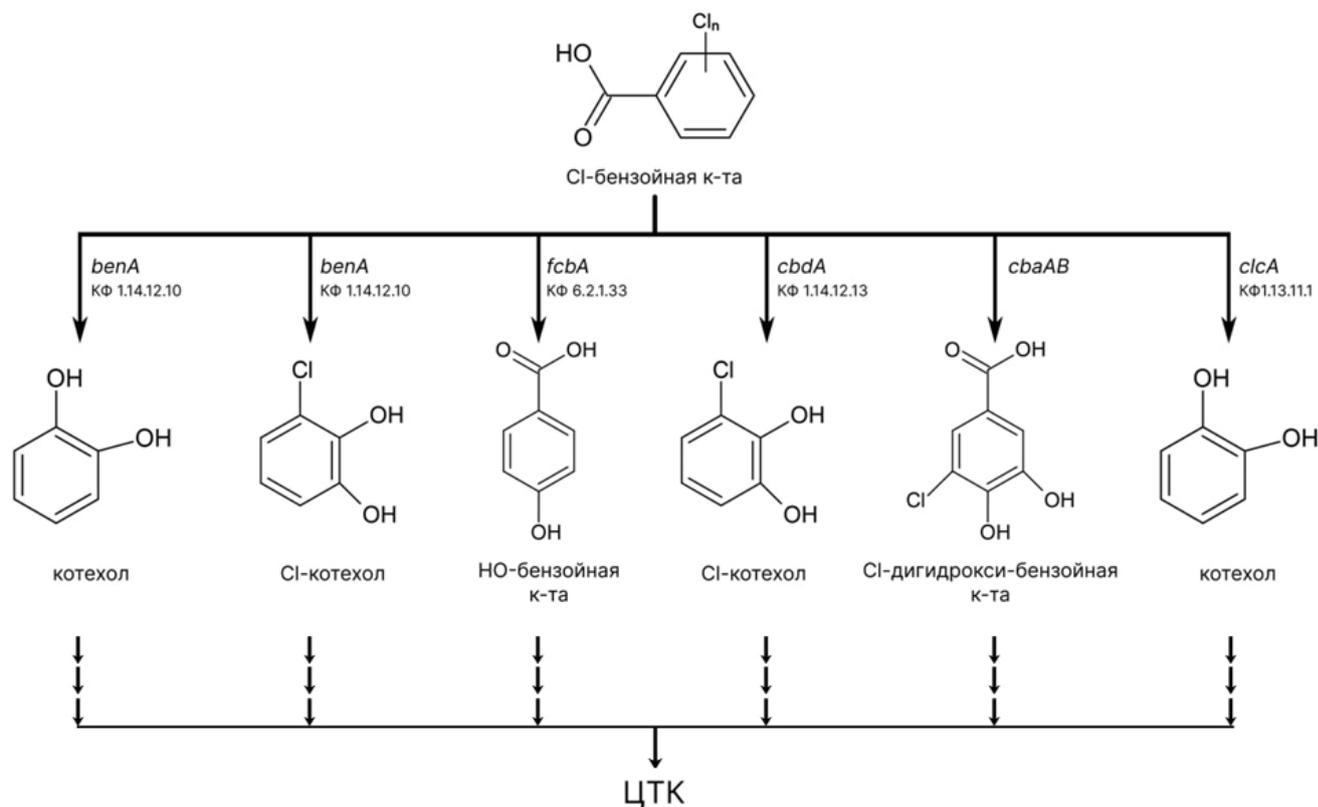


Рисунок 7 – Начальный этап бактериальной трансформации (хлор)бензойных кислот – основных продуктов биодеструкции хлор- и гидрокси-замещенных бифенилов

Если на начальном этапе трансформации хлор не отщепляется, первичными метаболитами хлорбензойных кислот у аэробных бактерий становятся хлоркатехолы или хлорированные гидроксibenзойные кислоты (Рисунок 7). В этом случае первый этап трансформации хлорбензойной кислоты катализируют ферменты, кодируемые генами *cbaAB*, *cbdA* и *benA* (Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008; Solyanikova *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017; Gorbunova *et al.*, 2021).

Интересно отметить, что при окислении хлорбензойной кислоты бензоат 1,2-диоксигеназой (ген *benA*) возможно образование как незамещенного катехола, так и хлорзамещенного. Последнее явление описано для штаммов родов

Cupriavidus, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Stenotrophomonas* (Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017). Бензоат 1,2-диоксигеназа (БДО; КФ 1.14.12.10) изучена у широкого спектра представителей грамположительных и грамотрицательных аэробных бактерий, разлагающих широкий спектр ароматических соединений (Field, Sierra-Alvarez, 2008; Zhan *et al.*, 2008; Solyanikova *et al.*, 2015; Kahlon, 2016). Бензоат 1,2-диоксигеназа представляет собой двухкомпонентную систему, включающую редуктазу и терминальную диоксигеназу, последняя состоит из α - и β -субъединиц (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Анализ генов *benA*, детерминирующих α -субъединицу БДО, показал, что они формируют отдельный кластер (подсемейство) на филогенетическом дереве бактериальных диоксигеназ, окисляющих ароматическое кольцо (Parales, Resnick, 2006). Каталитический центр локализуется на α -субъединице терминальной диоксигеназы. В ходе диоксигенирования бензоата образуется катехол. В процессе последующего метаболизма окисленная бензойная кислота разлагается до соединений цикла Кребса (Parales, Resnick, 2006; Field, Sierra-Alvarez, 2008).

1.4.4 Роль фермента бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA) в биодеструкции хлор- и гидроксифенилов, и его функциональная специфика

Фермент бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA) представляет собой ключевой катализатор начального этапа аэробной деградации ПХБ. Он обеспечивает внедрение двух атомов кислорода в одно из ароматических колец молекулы ПХБ, приводя к образованию цис-дигидродиолов, которые далее метаболизируются в рамках бифенильного пути. BphA состоит из терминальной оксигеназы, редуктазы и ферредоксина, и образует мультикомпонентный ферментный комплекс (Рисунок 8). Оксигеназный компонент комплекса включает α - (BphA1) и β -субъединицы (BphA2). Каталитически активной является α -субъединица, содержащая [2Fe-2S] кластер и моонуклеарное железо, ответственные за активацию кислорода и его внедрение в субстрат. β -субъединица стабилизирует структуру фермента. Электроны поступают от редуктазы (BphA4), содержащей FAD, через ферредоксин (BphA3) к оксигеназе (Master, Mohn, 2001).

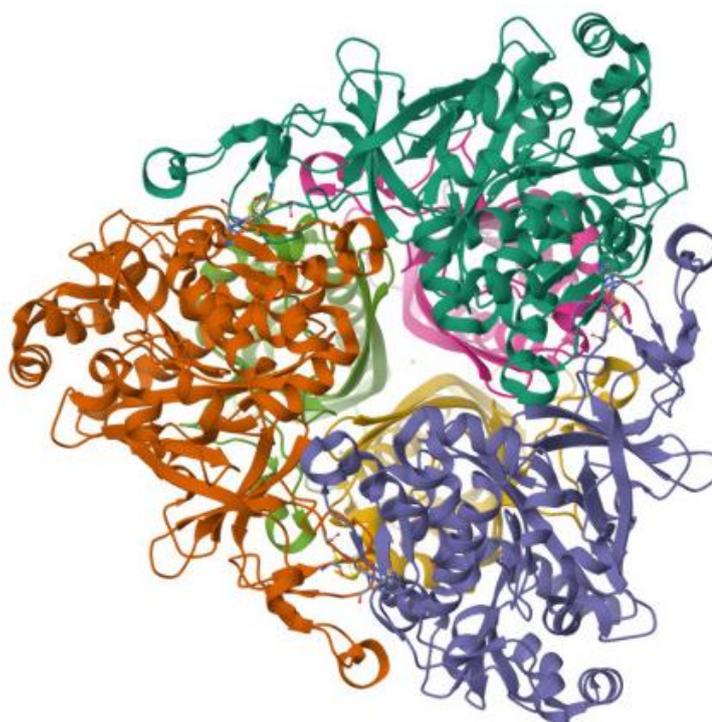


Рисунок 8 – Структура бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1A2) штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 (Furusawa *et al.*, 2004; <https://www.rcsb.org/structure/1ULI>)

Каталитическая активность и субстратная специфичность BphA1 зависят от аминокислотной последовательности, особенно в так называемой области III активного центра. Мутации в этой области позволяют модифицировать фермент для повышения его активности по отношению к высокохлорированным и структурно сложным ПХБ. В исследовании Dhindwal *et al.* (2016) была получена модификация фермента (вариант BphAE_II9), которая за счёт семи замен аминокислот, которая проявляла окислительную активность к расширенному спектру субстратов, включая тетрахлор- и пентахлорбифенилы (Dhindwal *et al.*, 2016).

Функциональная специфика BphA1 определяется не только структурой активного центра, но и регуляцией экспрессии гена *bphA1*. Показано, что индукция *bphA1* возможна в присутствии различных ароматических субстратов, включая бифенил, бензойную кислоту и некоторые ПХБ. Например, у штаммов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* экспрессия *bphA1* усиливается при воздействии как самих ПХБ, так и промежуточных продуктов их распада (Master, Mohn, 2001;

Barriault *et al.*, 2002). Более того, исследование полиморфизма гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы у бактерий-деструкторов выявило значительное разнообразие аллелей, что отражает адаптацию фермента к различным экологическим условиям и субстратам (Shumkova *et al.*, 2015). Эти различия объясняют вариативность в диапазоне эффективно разлагаемых конгенов ПХБ.

Интересные результаты были получены при исследовании *BphA*, выделенного из почв, загрязнённых ПХБ. В работе Suman *et al.* (2021) описан фермент, который демонстрировал не только высокую активность по отношению к ПХБ, но и повышенную аффинность к природным ароматическим соединениям, таким как флавоноиды. Это может свидетельствовать о возможном эволюционном происхождении бифенил диоксигеназ как ферментов природного метаболизма, адаптированных впоследствии к ксенобиотикам (Suman *et al.*, 2021).

Таким образом, фермент *BphA* представляет собой центральное звено в аэробной биодеструкции ПХБ. Его активность, регулируемость и структурное разнообразие делают его привлекательной мишенью как для мониторинга микробных процессов в загрязнённой среде, так и для создания генно-инженерных штаммов с повышенной деструктирующей активностью.

1.4.5 Генетические основы аэробной бактериальной трансформации ПХБ и НО-ПХБ

Способность к трансформации ПХБ обусловлена наличием специфических генетических систем у бактериального компонента микрофлоры почвы (Seeger, Pieper, 2010). Установлено, что у большинства известных штаммов, способных к аэробной деструкции ПХБ, в геноме присутствует *bph*-оперон, кодирующий комплекс ферментов, осуществляющих окисление молекулы бифенила/хлорбифенилов/гидрохлорбифенилов до стадии расщепления молекулы на бензойную, (хлор-/гидрокси-)бензойную кислоту и пентадиеновую кислоту (Рисунок 9) (Nogales *et al.*, 2001; Seeger, Pieper, 2010; Sharma *et al.*, 2018).

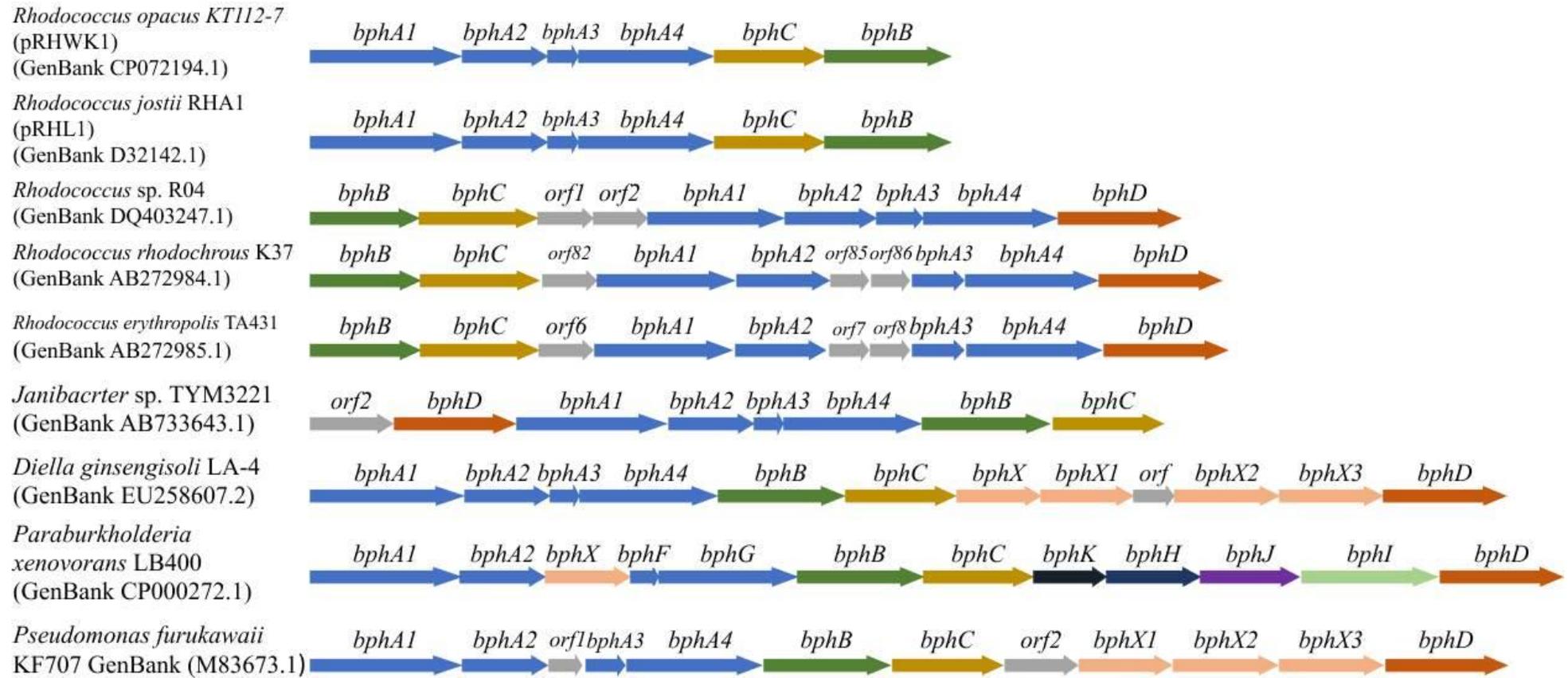


Рисунок 9 – Организация *bph*-оперона у штаммов-деструкторов ПХБ (Egorova *et al.*, 2024)

Наиболее подробно изучена структурная организация *bph*-генов, расположенных в хромосоме, у штаммов *B. xenovorans* LB400, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *P. putida* KF715 и *Pseudomonas* sp. KKS102 (Рисунок 9) (Fukuda *et al.*, 1994; Reineke, 1998; Nishi *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2006).

Гены, детерминирующие окисление бифенила и ПХБ (*bph*-гены), впервые были клонированы у штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707. Показано, что *bph*-гены штамма KF707 расположены в следующем порядке (*orf0*)*bphA1A2*(*orf3*)*bphA3A4BCX0X1X2X3D*. Аналогичный порядок *bph*-генов обнаружен у штамма *B. xenovorans* LB400. Кластер генов, *bphX0-bphX1-bphX2-bphX3* (*bphK-bphH-bphJ-bphI*), ответственных за конверсию гидроксипентадиеновой кислоты, образующейся в результате действия ГОФДК-гидролазы, (ген *bphD*), до соединений, входящих в цикл трикарбоновых кислот, расположен между *bphC* и *bphD* (Reineke, 1998; Watanabe *et al.*, 2000).

Известно, что гены биodeградации ПХБ (*bph*-гены) могут иметь как хромосомальную, так и плазмидную локализацию (Рисунок 10) (Reineke, 1998; Shimizu *et al.*, 2001; Shuttleworth *et al.*, 2000; Tan, 1999; Fortin *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2000; Francova *et al.*, 2004; Bhatt *et al.*, 2021).

Плазмидная локализация *bph*-генов описана для ряда штаммов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* (Fukuda *et al.*, 1998; Hauschild *et al.*, 1996; Reineke, 1998; Shimizu *et al.*, 2001). Характерной чертой плазмид биodeградации, или D-плазмид, является их большой размер (50 – 1100 тпн) (Springael *et al.*, 1993; Tan, 1999; Shimizu *et al.*, 2001).

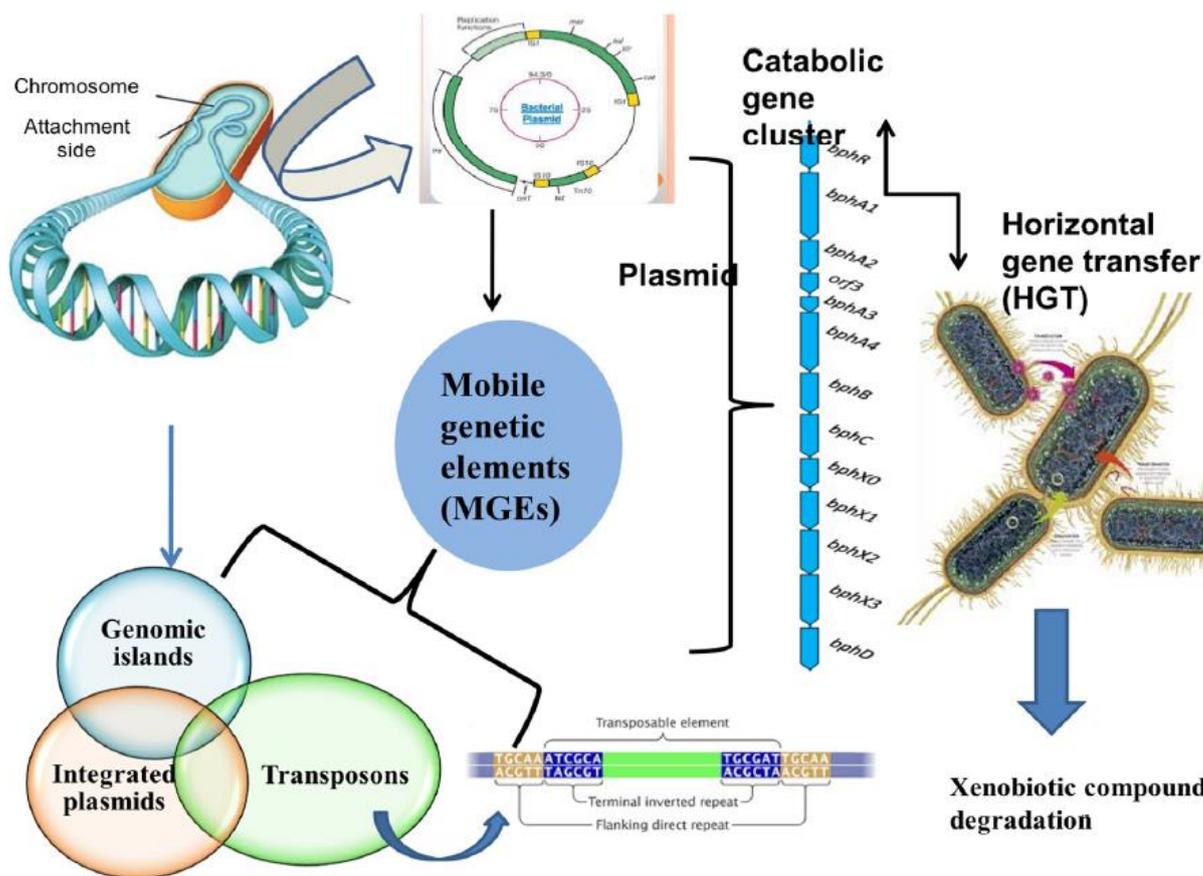


Рисунок 10 – Локализация *bph*-генов и их распространение среди бактерий-деструкторов (Bhatt *et al.*, 2021)

Наиболее подробно плазмидные *bph*-гены изучены у штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 (Fukuda *et al.*, 1998; Reineke, 1998). В штамме *Rhodococcus jostii* RHA1 обнаружены три линейные D-плазмиды pRHL1 (1100 т.п.н.), pRHL2 (450 т.п.н.) и pRHL3 (330 т.п.н.), несущие гены деструкции полихлорированных бифенилов. Основной *bph*-оперон локализован на плазмиде pRHL1 и включает последовательность генов *bphA1A2A3A4CB*, кодирующих мультикомпонентный ферментный комплекс бифенил 2,3-диоксигеназы и ферменты дальнейшего преобразования *цис*-дигидродиолов. Гены последующих стадий деструкции, включая ферменты нижнего пути (ферменты β -кетолитической деструкции), локализованы на pRHL2 в составе отдельного оперона *bphDEF*. Плазмида pRHL3 содержит дубликаты *bph*-подобных генов, включая аналоги *bphA1A2A3*, предположительно возникшие в результате горизонтального переноса. Также в хромосомной ДНК

штамма RHA1 обнаружены *bphC3C5C6*, кодирующие дополнительные катехол-диоксигеназы, обладающие частичной изофункциональностью. Таким образом, у штамма RHA1 деградационная система организована мультикопийно и модульно, что отличает её от более компактных и локализованных *bph*-оперонов у других бактерий (Fukuda *et al.*, 1998; Hauschild *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 2001).

Похожее расположение *bph*-генов выявлено в геноме штамма *Rhodococcus opacus* KT112-7 (Egorova *et al.*, 2024). Установлено, что гены бифенильного пути располагаются в трех оперонах на хромосоме (*bphEGFC*, *bphCDFAD*-монооксигеназа, *bphA1BA2*), оперон *bphA1A2A3A4CB* располагается на плазмиде pRHWK1, а гены *bphA1A2* располагаются на плазмиде pRHWK2. Анализ *bph*-генов показал, что в опероне *bphA1A2A3A4CB* (плазмида pRHWK1) гены располагаются в том же порядке и имеют тот же размер, что и в *bph*-опероне штамма *R. jostii* RHA1 (плазмида pRHL1), при этом отличаются от расположения генов *bph*-оперонов штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus*, *Janibacter*, *Diella*, *Cupriavidus* и *Paraburkholderia* (Рисунок 11). Интересно отметить, что ген *bphD* выявлен только на хромосоме, но не на плазмиде штамма KT112-7. Ранее подобное расположение *bphD* гена описано для штамма *R. jostii* RHA1 (Masai *et al.*, 1995). Следует отметить, что гены «нижнего» бифенильного пути штамма KT112-7, локализованные на хромосоме, расположены в той же последовательности, что и у штамма-деструктора *Acidovorax* sp. KKS102 и обособлены от остальных генов *bph*-пути (Kikuchi *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 2001, 2012; Pieper, 2005).

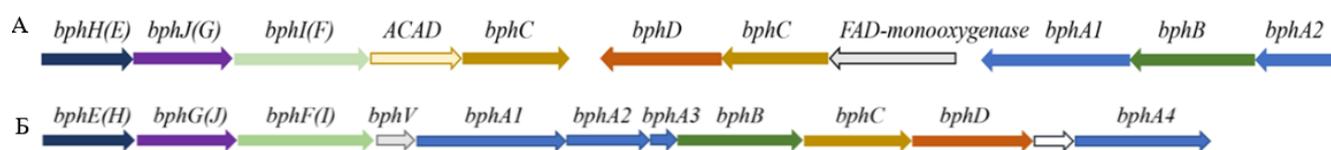


Рисунок 11 – Расположение генов «нижнего» и «верхнего» бифенильного пути у штаммов (А) *R. opacus* KT112-7 (хромосома GenBank CP072193.1) и (Б) *Acidovorax* sp. KKS102 (хромосома GenBank CP003872.1) (Egorova *et al.*, 2024)

Таким образом, аэробные бактерии представляют собой важнейших агентов в процессах природной и индуцированной биодеструкции полихлорированных бифенилов (ПХБ) и их гидроксिलированных производных. Многообразие штаммов, способных эффективно разлагать широкий спектр конгенов ПХБ, подтверждается как лабораторными данными, так и метагеномными исследованиями загрязнённых экосистем. Установлено, что ключевую роль в этих процессах играют ферментативные комплексы, в частности бифенил-2,3-диоксигеназа и цитохром P450-монооксигеназы, обладающие высокой субстратной специфичностью и каталитической активностью. Генетическая детерминация этих путей, включая наличие *bph*-оперонов в хромосомах и плазмидах, подчеркивает возможность горизонтального переноса дегрэдационных функций. Совокупность полученных данных открывает перспективы создания эффективных генно-инженерных штаммов и применения микробных сообществ в экобиотехнологиях, направленных на восстановление загрязнённых ПХБ территорий.

1.5 Новые подходы в исследовании биодеструкции ПХБ: кинетика, метаболизм и математическое моделирование

В последние годы в области биодеструкции полихлорированных бифенилов (ПХБ) наблюдается активное развитие интегративных подходов, объединяющих микробиологические методы с инструментами статистического и нейросетевого моделирования. Одним из примеров является исследование консорциума бактерий *Bacillus* sp. и *Stutzerimonas* sp., выделенных из ила очистных сооружений, показавших высокую эффективность дегрэдации ПХБ в лабораторных условиях. (Thathola, Halдар, 2025).

На основе метода отклика на поверхность (Response Surface Methodology, RSM) и искусственных нейронных сетей (Artificial Neural Networks, ANN) была проведена оптимизация условий среды для достижения максимальной степени разрушения ПХБ. Использование дизайна эксперимента Вох-Behnken позволило определить значимые переменные среды: pH, температура, объём инокулята,

количество оборотов и концентрация ПХБ. В качестве субстратов в исследовании использовали 2,4,4'-трихлорбифенил, 2,2',5,5'-тетрахлорбифенил, 2,2',4,5,5'-пентахлорбифенил, 2,2',3,4,4',5'-, 2,2',4,4',5,5'-гексахлорбифенил и 2,2',3,4,4',5,5'-гептахлорбифенил.

Наиболее значимым фактором оказалось взаимодействие между температурой и концентрацией ПХБ. Оптимальные выявленные показатели представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оптимальные значения факторов, обеспечивающие максимальную биodeградацию

Параметр	Оптимальное значение	Характер влияния
рН	7,0	Повышение до оптимума усиливает деградацию, затем — снижение эффективности
Температура (°С)	35	Рост до 35 °С усиливает активность, выше — угнетение ферментов
Объём инокулята (%)	4	До 4 % – рост активности, далее – конкуренция за субстрат
Количество оборотов (об/мин)	95	Оптимальное насыщение кислородом, выше – механический стресс
Концентрация ПХБ (мг/л)	20	При превышении возможен субстратный стресс

Результаты моделирования показали, что 2,4,4'-трихлорбифенил, 2,2',5,5'-тетрахлорбифенил и 2,2',4,5,5'-пентахлорбифенил следуют кинетике второго порядка; 2,2',3,4,4',5'-гексахлорбифенил, 2,2',4,4',5,5'-гексахлорбифенил и 2,2',3,4,4',5,5'-гептахлорбифенил – кинетике первого порядка.

Метаболический анализ с применением газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) позволил идентифицировать промежуточные продукты деградации и реконструировать пути метаболизма. Установлено, что конечными продуктами распада большинства ПХБ являются ацетил-КоА и пировиноградная кислота.

Хотя в данном исследовании не проводился геномный анализ штаммов, высокие скорости деградации и устойчивость к ПХБ предполагают наличие активных *bph*-оперонов, аналогичных описанным у *B. xenovorans* LB400 и *Pseudomonas* sp. KKS102 (Fortin *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 1994; Reineke, 1998). Это подтверждается способностью метаболизировать ПХБ до ацетил-КоА и пировиноградной кислоты — характерных метаболитов верхнего и нижнего путей деструкции.

С практической точки зрения, высокая воспроизводимость и стабильность системы позволяют рассматривать её как основу для создания полуиндустриальных биореакторов. Предсказательная мощность ANN может быть адаптирована для мониторинга очистных процессов в реальном времени.

Таким образом, исследование демонстрирует возможности современной микробиологической ремедиации, поддержанной математическим моделированием, как эффективного и экологически безопасного подхода к удалению ПХБ из загрязнённых сред. Полученные данные могут служить основой для создания масштабируемых решений в области очистки промышленных стоков и почв, загрязнённых стойкими органическими загрязнителями.

1.6 Моделирование белковых структур

Одной из главных задач на протяжении нескольких десятилетий остается прогнозирование трехмерной структуры белка на основе последовательности аминокислот. В последнее время появилась обратная задача – проектирование последовательности аминокислот, которая будет складываться в заданную трехмерную структуру – привлекает все больше внимания как потенциальный путь к рациональной инженерии белков с функциями, полезными в биотехнологии и

медицине. Методы прогнозирования и проектирования структур белков значительно продвинулись за последнее десятилетие. Увеличение вычислительных мощностей и быстрый рост баз данных последовательностей и структур белков способствовали разработке новых подходов, требующих больших объемов данных и значительных вычислительных ресурсов для прогнозирования структур (Kuhlman, Bradley, 2019).

Прогностическое понимание взаимосвязи между последовательностью аминокислот и структурой белка могло бы открыть новые перспективы как для прогнозирования функции на основе данных геномной последовательности, так и для рациональной инженерии новых функций белков через проектирование последовательностей аминокислот с определенными структурами. Были разработаны новые алгоритмы машинного обучения, которые анализируют паттерны коррелированных мутаций в семействах белков для прогнозирования структурно взаимодействующих остатков только на основе последовательности (Jones *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Прогнозирование структуры белка

Существует два основных подхода к прогнозированию структуры интересующего белка (цели): моделирование на основе шаблона, при котором используется ранее определенная структура родственного белка для моделирования неизвестной структуры цели, и моделирование без шаблона, которое не полагается на глобальное сходство со структурой в PDB и, следовательно, может применяться к белкам с новыми формами. Исторически методы, применяемые в этих двух подходах, были довольно различны: моделирование на основе шаблона сосредоточено на обнаружении и выравнивании с родственным белком известной структуры, в то время как моделирование без шаблона основывается на выборке конформаций большого масштаба и применении основанных на физике функций энергии. Однако в последнее время граница между этими подходами стала размываться, поскольку методы на основе шаблона начали включать уточнение моделей, направляемое энергией, а методы

без шаблона стали использовать машинное обучение и фрагментные методы выборки для эксплуатации информации в структурной базе данных (хотя методы на основе шаблона все еще сохраняют повышенную точность для целей с детектируемым сходством последовательностей с записями в PDB) (Kuhlman, Bradley, 2019).

Моделирование на основе шаблона

Этапы стандартного моделирования на основе шаблона включают выбор подходящего структурного шаблона; выравнивание последовательности цели с шаблонной структурой; и молекулярное моделирование для учета мутаций, вставок и делеций, присутствующих в выравнивании цели и шаблона. Тесно родственные шаблоны могут быть обнаружены с использованием методов поиска одной последовательности, таких как BLAST (Altschul *et al.*, 1997), для сканирования последовательностей PDB. Для обнаружения более отдаленно родственных шаблонов можно использовать профиль последовательности цели (Eddy, 1998; Remmert *et al.*, 2011), построенный на основе выравнивания множественных последовательностей, для сканирования базы данных профилей последовательностей для белков с известной структурой с помощью сравнения профилей (Sadreyev, Grishin, 2003; Söding, 2005) или можно сопоставить его с библиотекой структурных шаблонов для оценки совместимости последовательности и структуры (Bowie *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992). Методы выбора шаблонов возвращают начальное выравнивание цели и шаблона, которое может быть вручную скорректировано, часто в итеративном порядке после построения модели. Имея выравнивание с шаблоном, можно использовать существующие инструменты (Krivov *et al.*, 2009; Webb, Sali, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018) для быстрой постройки молекулярных моделей последовательности цели, выполняя оптимизацию боковых цепей только на мутационных позициях и перестраивая скелет вокруг вставок и делеций. Для последовательностей белков цели, которые имеют только удаленное родство с белками известной структуры, могут потребоваться более сложные подходы, которые полагаются на несколько

шаблонов и проводят агрессивную выборку конформаций скелета (Song *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Webb, Sali, 2017). В сочетании с доступными кристаллическими структурами подходы моделирования на основе шаблона могут предоставить структурную информацию примерно для двух третей известных семейств белков (Ovchinnikov *et al.*, 2017).

Моделирование без шаблона

Подходы моделирования без шаблона могут быть применены к белкам, не имеющим глобального структурного сходства с белком в PDB. Отсутствие структурного шаблона требует стратегии выборки конформаций для генерации кандидатных моделей, а также критерия ранжирования, с помощью которого можно выбрать нативные конформации. Процесс прогнозирования структуры без шаблона обычно начинается с построения выравнивания множественных последовательностей белка цели и родственных последовательностей. Последовательности цели и её гомологов затем используются для прогнозирования локальных структурных характеристик, таких как вторичная структура и углы скручивания скелета, и нелокальных характеристик, таких как контакты остатков или расстояния между остатками по всей полипептидной цепи. Эти прогнозируемые характеристики направляют процесс построения 3D-моделей структуры белка цели, которые затем уточняются, ранжируются и сравниваются друг с другом для выбора окончательных прогнозов.

Применение моделей бифенил 2,3-диоксигеназы для анализа эффективности деструкции конгенов ПХБ

В работе (Сао *et al.*, 2011) представлено исследование способности α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) из *Enterobacter* sp. LY402 к разложению ПХБ как экспериментально, так и с помощью молекулярного моделирования. Их результаты показали, что показатель свободной энергии связывания ПХБ хорошо соотносится с константами скорости разложения (k) для ПХБ с различным количеством заместителей. Другими словами, показатель свободной энергии связывания ПХБ уменьшается по мере увеличения k .

Wu и др. (Wu *et al.*, 2009) провели сравнение свободных энергий связывания загрязнителей и рецепторов и сделали интересный вывод: чем ниже свободная энергия связывания, тем выше аффинность. Данное открытие подчеркивает, что свободная энергия связывания может служить ценным инструментом для оценки потенциала бактерий в разложении загрязнителей, а также для более глубокого анализа процессов биodeградации ПХБ.

Liu и др. (Liu *et al.*, 2012) изучили взаимосвязь между молекулярными характеристиками и скоростями деградации субстратов, которые разлагает *Enterobacter* sp. LY402. Они обнаружили, что скорость деградации субстрата увеличивалась с ростом его дипольного момента. Напротив, чем выше была энергия растяжения-скручивания, тем медленнее происходило разложение. Однако эффективность микробиологической деградации высокохлорированных ПХБ и специфически замещенных ПХБ ограничена (Pieper, 2005).

Интересное исследование касалось связи между свободной энергией связывания и такими характеристиками, как миграция, устойчивость, токсичность и биоаккумуляция ПХБ с использованием девяти спрогнозированных моделей BphA1. Результаты показали, что энергия связывания ПХБ с BphA1 значимо коррелирует с такими экологически важными параметрами, как коэффициент распределения октанол–воздух (K_{OA}), коэффициент биоконцентрации (BCF) и период полураспада ($t_{1/2}$). Это указывает на то, что эффективность связывания может служить индикатором для оценки потенциальной устойчивости и способности ПХБ к биоаккумуляции. Кроме того, было установлено, что электростатические характеристики молекул оказывают наибольшее влияние на энергию связывания, что подтверждает значимость молекулярной структуры для процессов деградации (Zhao *et al.*, 2018).

Кристаллические структуры девяти типов BphA (ID PDB: 1ULJ (Furusawa *et al.*, 2004), 1WQL (Dong *et al.*, 2005), 2YFJ (Mohammadi *et al.*, 2011), 2YFL (Kumar *et al.*, 2012), 2GBX (Ferraro *et al.*, 2007), 2XSH (Kumar *et al.*, 2011), 2E4P (Senda *et al.*, 2007), 3GZX (Christopher *et al.*, 2013) и 3GZY (Christopher *et al.*, 2013)) были использованы для расчета энергии свободного связывания по уравнению

Свободная энергия связи = $RT \times \ln 10^{-pKd}$, где $RT = 0,59 \text{ kcal/mol.}$,

что позволило оценить сродство между лигандом и рецептором. Низкие значения энергии свободного связывания указывают на высокое сродство или каталитическую активность (Wu *et al.*, 2009).

Результаты показали, что константы скорости разложения ПХБ снижались по мере увеличения энергии свободного связывания, что означало уменьшение сродства между лигандом и рецептором (Сао *et al.*, 2011). Поскольку разные типы VrhA могут иметь несколько активных участков, исследователи выбрали группу для каждого VrhA с наивысшей суммарной оценочной функцией (Рисунок 12).

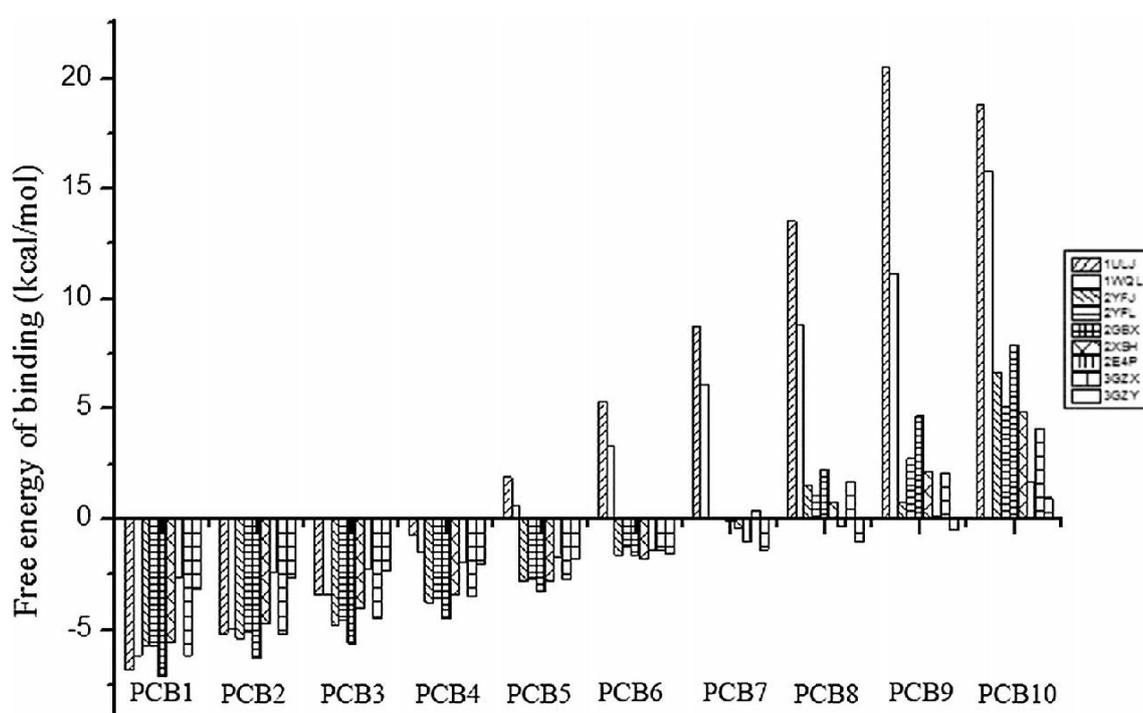


Рисунок 12 – Энергии свободного связывания конгенов ПХБ с различными моделями VrhA (Zhao *et al.*, 2018)

Энергии свободного связывания ПХБ демонстрировали хорошее соответствие константам скорости разложения (k) для различных хлорсодержащих заместителей. Например, как 1ULJ, так и 1WQL были способны разлагать изомеры от хлорбифенила до тетрахлорбифенила, при этом 1ULJ показал лучшие результаты для всех изомеров, кроме тетрахлорбифенила, который разлагался быстрее с помощью 1WQL. В случае 3GZX и 2YFL, оба могли разлагать изомеры

от хлорбифенила до гексахлорбифенила, но 3GZX демонстрировал более высокие скорости разложения. Более того, 2GBX, 2XSH и 2YFJ разлагали изомеры от хлорбифенила до пентахлорбифенила, при этом 2GBX был наиболее эффективным.

Несмотря на то, что все типы VphA могли разлагать низко хлорированные ПХБ (содержат от одного до четырех атомов хлора), скорости разложения различались. Для пентахлорбифенила и гексахлорбифенила скорости разложения распределялись следующим образом: 2GBX > 2XSH > 2YFJ > 2YFL > 3GZX > 3GZY > 2E4P. 3GZY проявил способность разлагать высокохлорированные ПХБ, но скорости разложения были не высоки. Наиболее эффективным для разложения октохлорбифенила оказался 3GZY.

Корреляционный анализ Пирсона продемонстрировал значимую корреляцию энергий свободного связывания с молекулярной массой, K_{OA} , VCF и $t_{1/2}$ ($P < 0,01$), но не с концентрацией, при которой наблюдается 50 % ингибирование процесса (IC_{50}) ($P < 0,05$). Это подтверждает, что энергия свободного связывания и молекулярные характеристики ПХБ тесно связаны.

Энергия свободного связывания между ПХБ и VphA постепенно увеличивалась по мере увеличения числа атомов хлора (Рисунок 12), то есть энергия свободного связывания возрастала с увеличением молекулярной массы.

Сравнительные анализы молекулярного поля (CoMFA) и молекулярного сходства (CoMSIA) показали, что свободная энергия связывания, K_{OA} , $t_{1/2}$ и значения VCF снижались при введении электроположительных групп в 3-м положении или электроотрицательных групп в 3'-м положении, что указывает на корреляцию свободной энергии связывания с характеристиками ПХБ. Низкие свободные энергии связывания улучшали разложение ПХБ и снижали значения K_{OA} , $t_{1/2}$ и VCF, что позволяет уменьшить устойчивость ПХБ в окружающей среде.

Таким образом, молекулярное моделирование и оптимизация структуры могут значительно повысить эффективность микробиологической деградации ПХБ, что является важным шагом на пути биоремедиации окружающей среды.

Заключение по главе 1.

Полихлорированные бифенилы (ПХБ) представляют собой одну из наиболее устойчивых групп органических загрязнителей, широко распространённых в окружающей среде. Благодаря своей химической стабильности, липофильности и способности к длительной циркуляции в биосфере, ПХБ входят в перечень приоритетных стойких органических загрязнителей, подлежащих глобальному контролю согласно положениям Стокгольмской конвенции. Эти соединения обладают выраженной токсичностью, могут накапливаться в живых организмах и оказывать многопрофильное негативное воздействие на здоровье человека и состояние экосистем.

В обзоре показано, что ПХБ обнаруживаются во всех компонентах экосистем – от воздуха и почвы до организмов, включая человека. Особую тревогу вызывает их способность трансформироваться в гидроксированные производные (НО-ПХБ), обладающие повышенной токсичностью и гормональной активностью. Эти метаболиты, образующиеся как в биотических, так и в абиотических условиях, способны вмешиваться в эндокринную регуляцию и вызывать долгосрочные последствия даже в низких концентрациях.

Наряду с химико-физическими методами деструкции ПХБ, всё большее внимание привлекают биотехнологические подходы, основанные на использовании микроорганизмов. Аэробные и анаэробные бактерии из различных родов демонстрируют способность к трансформации как исходных ПХБ, так и их гидроксированных метаболитов. Наиболее перспективными являются штаммы, способные эффективно разрушать как низко-, так и высокохлорированные конгенеры, а также коммерческие смеси ПХБ. В ряде случаев эффективность деструкции достигает 95–100 %, что открывает возможности для разработки экологически безопасных методов санации загрязнённых территорий.

Интенсивное развитие методов молекулярного моделирования, метагеномики и ферментной инженерии позволяет не только более точно идентифицировать механизмы действия ключевых ферментов биодеструкции (например, бифенил-2,3-диоксигеназы), но и предсказывать их активность в

зависимости от структуры субстрата. Прогнозирование белковых структур и параметры сродства лиганд–фермент становятся важными инструментами в разработке эффективных штаммов-деструкторов.

Таким образом, современный подход к проблеме ПХБ-загрязнения требует интеграции экологических, микробиологических и молекулярных данных. Выбор и оптимизация бактериальных штаммов-деструкторов, изучение метаболических путей трансформации ПХБ и НО-ПХБ, а также разработка комбинированных технологий очистки являются ключевыми направлениями для последующих исследований и практического применения в области биоремедиации.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Среды, реактивы, субстраты

2.1.1 Среды и условия культивирования

Культивирование микроорганизмов-деструкторов осуществляли на минеральной среде К1 (Зайцев, Карасевич, 1981), следующего состава (мг/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 4000, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 400, $(NH_4)_2SO_4$ – 500, $Ca(NO_3)_2$ – 10, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 150. pH среды 7,3. В работе использованы минеральные соли производств ЗАО «НПО Экрос» и ЗАО «НПК Криохром», Россия.

В качестве полноценной среды использовали среду Luria-Bertany (LB) следующего состава (г/л): триптон («Sigma-Aldrich», США, Германия) – 10, дрожжевой экстракт («Sigma-Aldrich», США, Германия) – 5, NaCl – 10, (Маниатис и др., 1984). Для получения плотной среды вносили 1,5 % агара (Difco).

При выращивании микроорганизмов на агаризованных средах субстрат (бифенил) добавляли на крышку перевернутой чашки Петри.

Бактериальные ассоциации и индивидуальные штаммы культивировали в минеральной среде К1 с бифенилом (1 г/л) как на агаризованных средах (в данном случае в парах бифенила), так и в жидкой среде К1 в условиях аэрирования на термостатируемой круговой качалке Environmental Shaker-Incubator ES 20/60 («BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C. Каждые 24 часа производили измерение оптической плотности культуры на спектрофотометре BioSpec-mini («Shimadzu», Япония), при длине волны 600 нм.

Культивирование штаммов на ПХБ и НО-ХБ проводили только в жидкой среде К1, субстраты предварительно растворяли в ацетоне. Схема культивирования описана в разделе 2.7. Концентрации ПХБ и НО-ХБ описаны в Главе 5.

2.1.2 Коммерческие соединения

В работе использовали аналитически чистые химические реактивы, бифенил (>98 %), 3-гидроксибифенил (>98 %), 4-гидроксибифенил (>98 %), 3-гидроксибензойную кислоту (>98 %), 4-гидроксибензойную кислоту (>98 %), 3,4-дигидроксибензойную кислоту (>98 %), катехол (>98 %), моноклорбензойные

кислоты, моноклорбифенилы и 2,4'-дихлорбифенил производства «Sigma-Aldrich» (Steinheim, Germany), незамещенный бифенил (>99 %) – «ACROS-organics» (New Jersey, USA), Трихлорбифенил (ОСТ 6-01-24-85) и Совол (ОСТ 06-01-24-75). В качестве растворителя в работе использован ацетон, квалификации ХЧ (химически чистые) ЗАО «НПО Экрос» (Россия).

2.1.3 Соединения, синтезированные для целей настоящего исследования.

Синтез произведен в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН д.х.н. Горбуновой Т.И.

Индивидуальные конгенеры 3,4-дихлорбифенил, 2,4,5-трихлорбифенил, 2,4,6-трихлорбифенил, 2,5,3',4'-тетрахлорбифенил синтезированы согласно (Mullin *et al.*, 1984). Реагенты и условия реакции описаны в (Горбунова, 2015; Gorbunova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021; Gorbunova *et al.*, 2022; Kir'yanova *et al.*, 2023).

Смеси химически-модифицированных ПХБ:

Смесь Р – получена на основе 3,4-дихлорбифенила, состоит из двух изомеров моногидроксимоноклорбифенилов (98,42 %), моноклорбифенилов (1,68 %) (Горбунова и соавт., 2019).

Смесь М1 – получена на основе 2,4,5-трихлорбифенила и состоит из 3-гидрокси-4,6-дихлорбифенила, 2-гидрокси-4,5-дихлорбифенила и 4-гидрокси-2,5-дихлорбифенила (Gorbunova *et al.*, 2021).

Смесь М2 – получена на основе 2,4,6-трихлорбифенила и состоит из 2-гидрокси-4,6-дихлорбифенила и 4-гидрокси-2,6-дихлорбифенила (Gorbunova *et al.*, 2021).

Смесь Т – получена на основе 2,5,3',4' -тетрахлорбифенила, состоит из гидрокситрихлорбифенилов (64,44 %), дигидроксидихлорбифенилов (32,51 %) и гидроксидихлорбифенилов (3,05 %) (Kir'yanova *et al.*, 2023).

Смесь М3 – получена на основе коммерческой смеси ПХБ марки Трихлорбифенил, содержит 25 соединений. Состав представлен в таблице 4 (Gorbunova *et al.*, 2021).

Таблица 4 – Содержание (%) компонентов в смеси МЗ

Продукт реакции	Формула продукта	Концентрация, %
Дихлорбифенилы	(C ₁₂ H ₈ Cl ₂)	12,8
Трихлорбифенилы	(C ₁₂ H ₇ Cl ₃)	7,7
Гидроксидихлорбифенилы	(C ₁₂ H ₇ Cl ₂ OH)	48,6
Гидрокситрихлорбифенилы	(C ₁₂ H ₆ Cl ₃ OH)	30,9

Смеси G1, G2, G3 – получены на основе коммерческой смеси ПХБ марки Совол, содержат более 70 соединений. Состав представлен в таблице 5 (Egorova *et al.*, 2020).

Таблица 5 – Содержание (%) компонентов в составе смесей G1, G2 и G3

Продукт реакции, формула продукта	Смеси		
	G1	G2	G3
Моногидрокситрихлорбифенилы C ₁₂ H ₆ Cl ₃ OH	17	5	7
Моногидрокситетрахлорбифенилы C ₁₂ H ₅ Cl ₄ OH	46	57	60
Моногидроксипентахлорбифенилы C ₁₂ H ₄ Cl ₅ OH	1	12	11
Моногидрокситетрахлорбифенилы C ₁₂ H ₃ Cl ₆ OH	-	1	-
Дигидрокситрихлорбифенилы C ₁₂ H ₅ Cl ₃ (OH) ₂	14	1	2
Дигидрокситетрахлорбифенилы C ₁₂ H ₄ Cl ₄ (OH) ₂	15	9	7
Тригидрокситрихлорбифенилы C ₁₂ H ₄ Cl ₃ (OH) ₃	3	-	-
Всего НО-ПХБ	96	85	87

2.2 Селекция бактериальных ассоциаций

Бактериальные ассоциации получали в результате накопительного культивирования из образцов почв, отобранных с территории ОАО «Средне-волжский завод химикатов» (ОАО «СВЗХ») (г. Чапаевск, Самарская обл., Россия,) и ОАО «Завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей» («Завод смазок и СОЖ») (г. Пермь, Пермский край, Россия). В качестве селективного фактора использовали Совол и бифенил (Схема 1).

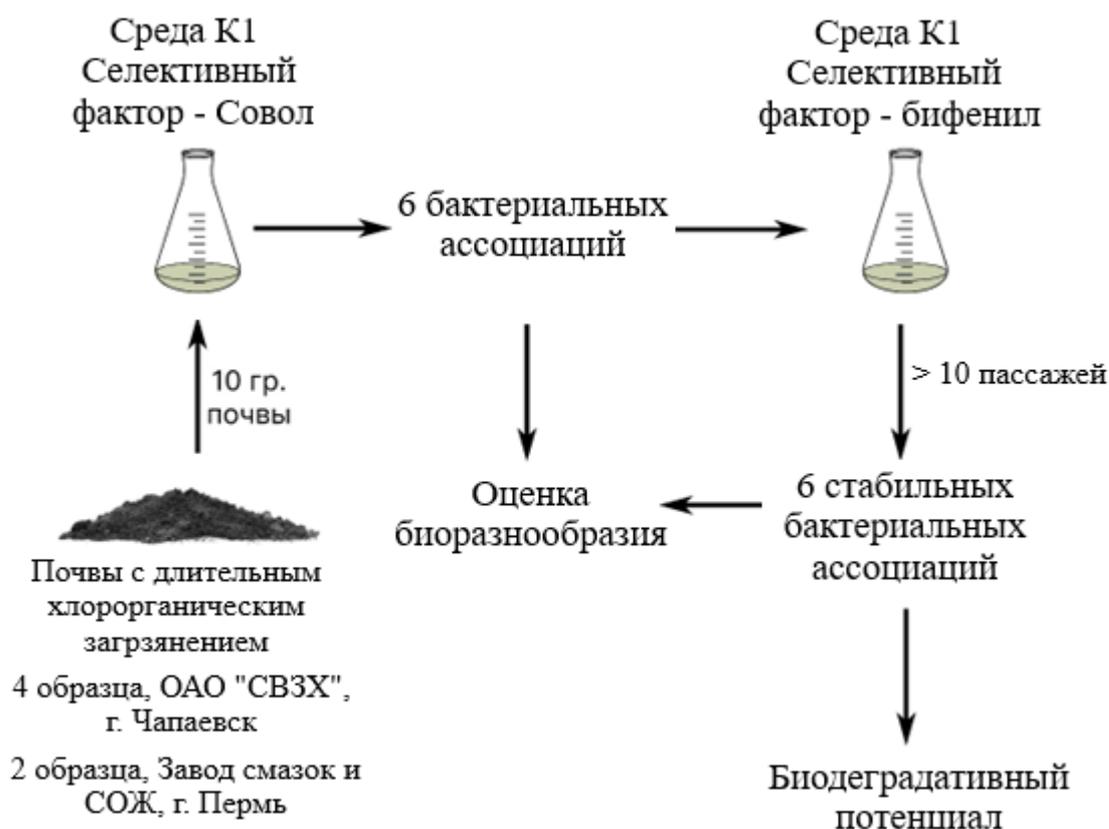


Схема 1 – Селекция и анализ бактериальных ассоциаций

10 г почвенного образца (6 образцов) помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл среды К1 и 0,1 г/л коммерческой смеси ПХБ марки Совол. Колбы выдерживали в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при +28°C 30 дней.

10 мл бактериальной культуры, полученной при накопительном культивировании с Соволом, помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 90 мл среды К1 и 100 мг бифенила. Культивирование проводили на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60,

«BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C в течение 14 дней. Последующие пересевы производили через каждые 7 дней, объем переносимой культуры 10 мл, среда К1 (90 мл), бифенил в концентрации 1 г/л. Бактериальное сообщество считали стабильным, если при 10 последовательных пересевах его состав не изменялся.

После культивирования с внесением Совола, а также при каждом пересеве при культивировании в минеральной среде с бифенилом в качестве источника углерода, осуществляли высев бактериальных ассоциаций на плотную среду LB с применением классического метода серийных разведений, и осуществляли подсчет количества колониобразующих единиц и описание морфотипов аэробных бактериальных культур, представленных в ассоциациях.

2.3 Выделение и описание индивидуальных штаммов

Из бактериальной ассоциации, полученной при накопительном культивировании с Соволом в качестве селективного фактора (ассоциация PN2-S), и стабильной ассоциации (состав и структура ассоциации не изменяется в течение 10 пассажей), полученной при селекции на бифениле (ассоциация PN2-B), путем культивирования на агаризованной среде К1 в парах бифенила, были выделены индивидуальные штаммы бактерий-деструкторов. Чистоту культур контролировали по однородности колоний при высеве на агаризованную среду LB.

Морфологическое описание колоний и клеток проводили согласно (Нетрусов и др., 2005). В один морфотип объединяли колонии, идентичные по всем описываемым критериям.

2.4 Коллекционный штамм-деструктор стойких органических загрязнителей

В работе использован штамм *Rhodococcus opacus* CH628, выделенный ранее из почвы, длительно загрязненной хлорорганическими соединениями (Егорова и соавт., 2017; Egorova *et al.*, 2017). Штамм *R. opacus* CH628 проявляет деградационную активность в отношении дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) и гексахлорциклогексана (ГХЦГ) (Егорова и соавт., 2017; Egorova *et al.*, 2017).

Депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ Ас-3029.

2.5 Молекулярно-генетические методы

2.5.1 Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ)

Для анализа состава бактериальных ассоциаций использовали метод ДГГЭ. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, составляющего около 566 п.н. по нумерации *E. coli*, проводили с применением праймеров: 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') на 5'-конце, и 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Tirola *et al.*, 2005) в 50 мкл смеси, содержащей 0,25 мМ дНТФ, 0,3 мкМ праймера (каждого), 1,5 мМ MgCl₂, 1х *Green* буфер для *Dream Taq*-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) и 2 ед. акт. *Dream Taq*-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) в термоциклере My Cyclor («Bio-Rad», США). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле в 0,5х TBE-буфере в напряжении электрического поля 5,0 V/см в течение 40 минут. ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0,5 мгк/мл) в проходящем УФ-свете и документирована системой Gel Doc XR («Bio-Rad», США).

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез фрагментов гена 16S рРНК был выполнен в 6 % (в/об) полиакриламидном геле, содержащем линейный денатурирующий химический градиент от 30 до 60 %, где 100 % составляет 7М мочевины и 40 % формамид. Разделение проводили в течение 16 часов при 45 V и 60°C на Dcode™ Universal Mutation System («Bio-Rad», США). Гели красили 15 мин в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл), далее промывали в деионизированной воде на протяжении 10 мин, визуализировали в проходящем УФ-свете и документировали системой Gel Doc XR («Bio-Rad», США).

Анализ ДГГЭ-профилей осуществляли путем детекции полос в геле, используя алгоритм поиска полос пакета программ Quantity One версия 4.6 («Bio-Rad», США). Для расчета степеней сходства ДГГЭ-профилей использовали коэффициент Дайса, построение дендрограммы осуществляли с помощью метода

UPGMA из пакета программ Quantity One версия 4.6 («Bio-Rad», США). При операциях учитывали положение полосы в геле.

Полученные ДГГЭ-профили были проанализированы с помощью индекса Шеннона-Уивера и коэффициента выравнивания. При этом предполагалось, что количество полос в геле (операциональных таксономических единиц (ОТЕ)) соответствует количеству таксономических групп бактерий в накопительной культуре, а интенсивность свечения показывает численность таксона.

2.5.2 Генетическое типирование бактерий-деструкторов

ДНК чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом (Short protocols in microbiology, 1995). Генетическое сходство/различие выделенных штаммов определяли методом ВОХ-ПЦР по стандартной методике (Versalovic *et al.*, 1994).

2.5.3 Анализ последовательности гена 16S рРНК

Аmplification генов 16S рРНК на матрице ДНК бактерий осуществляли на приборе C1000 Touch («Bio-Rad Laboratories», США) с универсальными праймерами (Egorova *et al.*, 2013). Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли на приборе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США), с применением реактивов Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 («Applied Biosystems», США). Полученные нуклеотидные последовательности проанализированы с использованием программы CLUSTAL X 1.83. Поиск гомологичных последовательностей произведен по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>).

2.5.4 Анализ генов *benA* и *bphA1*

Ген *benA* амплифицировали с помощью бактериальных праймеров: прямого *benA-F* [5'-GCCACGAGAGCCAGATTCCC-3'] и обратного *benA-R* [5'-GGTGGCGGCGTAGTTCCAGTG-3'] (Baggi *et al.*, 2008). Праймеры подобраны к консервативному участку гена *benA* штамма *Acinetobacter baylyi* ADP1, амплифицируемая область — с нуклеотида 175 до нуклеотида 712 (размер

фрагмента — 521 пн) (Zhan *et al.*, 2008). Амплификацию гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил диоксигеназы, проводили с использованием праймеров: F: [5'-AAGGCCGGCGACTTCATGAC-3']; R: [5'-TGCTCCGCTGCGAACTTCC-3'] (Baldwin *et al.*, 2003).

ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей x1 буфер для *Taq*-полимеразы с $MgCl_2$ («Синтол», Россия), 0,25 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы («Синтол», Россия) и 2 мкл ДНК-матрицы. В качестве ДНК-матрицы использовали тотальную ДНК чистых культур и бактериальных ассоциаций. Амплификацию осуществляли на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США) при следующих условиях: начальный денатурирующий шаг при 95 °С в течение 5 мин, далее 30 циклов: 40 с при 94 °С, 50 с при 60 °С с понижением при каждом шаге на 0,4 °С, 1 мин при 72 °С, завершающий шаг — 7 мин при 72 °С.

2.5.5 Условия электрофореза амплифицированных фрагментов ДНК и плазмидных ДНК

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1 % агарозном геле в 1x Трис-боратном буфере («Thermo scientific», Литва) при напряжении 10V/см и визуализировали в проходящем УФ-свете с использованием системы Gel Doc XRtm («Bio-Rad Laboratories», США) после окрашивания в растворе бромистого этидия.

Анализ штаммов на наличие плазмидной ДНК выполняли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II («Bio-Rad Laboratories», США). Штаммы выращивали в 10 мл среды LB до $ОП_{600}=1,0$. Клетки осаждали центрифугированием (9660 g, 3 мин) и отмывали дважды в ТЭ-буфере (10мМ трис/HCl, pH 7,6; 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Агарозные блоки готовили согласно рекомендациям производителя («Bio-Rad Laboratories», США). Блоки обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) при 37 °С в течение 5-16 ч, протеиназой К (1 мг/мл) – при 50 °С в течение 12-18 ч, нуклеазой S1 (5 ед на агарозный блок) – при 37 °С, 3,5 ч. Электрофорез образцов осуществляли в 1 %-ном агарозном геле (Pulsed Field Certified Agarose, «Bio-Rad Laboratories», США) в 0,5 ТБЭ-буфере (108

г трис, 55 г борная кислота, 40 мл 0,5М ЭДТА, до 1 л H₂O) при 14 °С, 6 В/см, в течение 24 ч. Использовали два режима пульсации: а) время пульсации от 60 с до 120 с; б) время пульсации от 60 с до 90 с. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л, 10 мин) и фотографировали в ультрафиолете с использованием системы геле-документации («Bio-Rad Laboratories», США). Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США).

2.5.6 Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ

Для выделения ДНК культуру штамма CH628 в середине экспоненциальной фазы роста центрифугировали на центрифуге 3K30 («Sartorius», Germany) при 11000g. Полученный осадок отмывали от бифенила в минеральной среде K1 и повторно центрифугировали. ДНК выделяли из биомассы штамма согласно SDS–СТАВ методу (Wilson, 1995).

Полногеномное секвенирование штамма *R. oracus* CH628 проведено на приборе Illumina HiSeq 1500 (США) на базе ЗАО "Геноаналитика" (Москва, Россия). Анализ генома штамма осуществляли с применением программ/сервисов SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades>), PATRIC 3.6.6. (<https://patricbrc.org>), RAST (<https://rast.nmpdr.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Полный геном штамма CH628 внесен в базу данных NCBI под номером JBLZMV000000000 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JBLZMV000000000>). Поиск функциональных генов, участвующих в метаболизме бифенила, осуществляли с использованием автоматического аннотирования полного генома штамма CH628 в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Дедуктивные аминокислотные последовательности ферментов биodeградации получали на основании нуклеотидных последовательностей выявленных генов с использованием MEGA X (<https://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей произведен по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ метаболических путей на основании

выявленных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием базы данных KEGG (<http://www.genome.jp>) и сервиса RAST.

2.6 Моделирование белковой структуры

2.6.1 Построение модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*BphA1*)

Аминокислотная последовательность *BphA1* штамма *R. oryzae* CH628 получена на основании нуклеотидной последовательности гена *bphA1* (GenBank MW070532), выявленного при анализе полногеномной последовательности штамма с помощью RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Нуклеотидная последовательность гена *bphA1* была преобразована в аминокислотную последовательность при помощи программы MEGA версии 10.0. Для построения белковой структуры были использованы программы MODELLER версии 10.4 (<https://salilab.org/modeller>), AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta>).

Поиск шаблонов осуществляли с помощью NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ограничивая зону поиска базами данных Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) и UniProt (<https://www.uniprot.org/>), применяя для выравнивания SWISSMODEL. Для анализа отбирали белковые последовательности с максимальной идентичностью.

2.6.2 Определение качества белковой модели

Для визуализации полученных моделей и предварительного анализа использовали программу PyMOL версии 2.5.4 (<https://pymol.org/>). С помощью PyMOL оценивали общее качество моделей и проверяли ключевые структурные элементы.

Для оценки качества структурных моделей применяли программы ERRAT (Colovos, Yeates, 1993), VERIFY 3D (Lüthy *et al.*, 1992), PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>), WHATCHECK (<https://swift.cmbi.umcn.nl/gv/whatcheck/index.html>), ENDscript (<https://endscript.ibcp.fr/ESPrpt/ENDscript/>).

2.6.3 Поиск и анализ области активного центра фермента

Для анализа активного центра фермента использовалась программа Computed Atlas of Surface Topography of proteins (CASTp) (Tian *et al.*, 2018). CASTp позволяет идентифицировать и характеризовать функционально значимые поверхности и полости белков, включая активные центры. С помощью CASTp были определены размеры и геометрия активного центра VphA1, а также ключевые аминокислоты, участвующие в каталитическом процессе.

2.7 Эксперименты по деструкции хлор- и гидроксид-замещенных бифенилов и их смесей

Основные этапы эксперимента представлены на схеме 2.

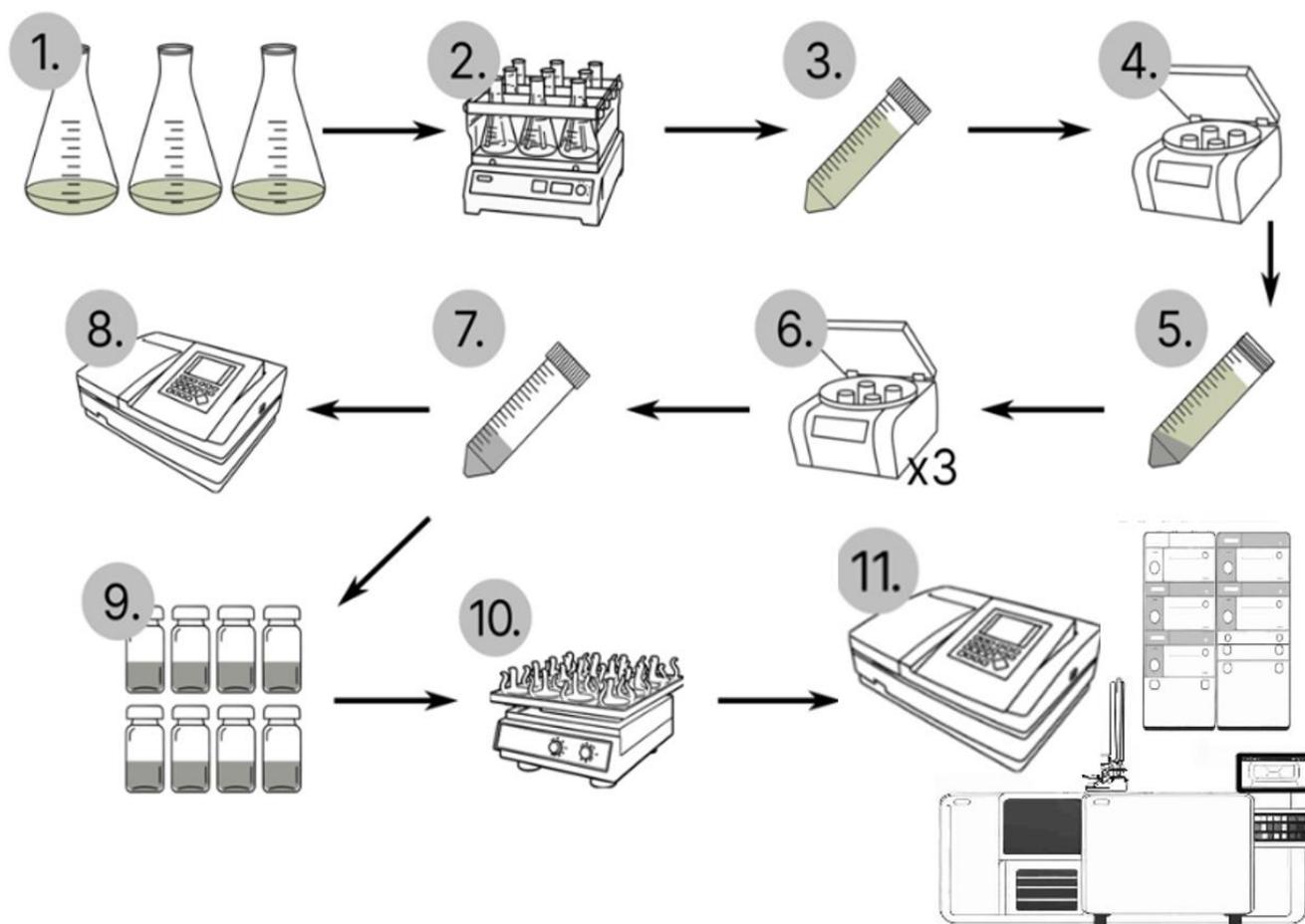


Схема 2 – Этапы эксперимента по анализу деградационной активности штаммов и ассоциаций

Исследование биодеградационной активности бактериальных штаммов и их ассоциаций осуществляли в экспериментах, включающих следующие этапы:

1. Культивирование индивидуального бактериального штамма/бактериальной ассоциации осуществляли в трёх конических колбах объёмом 250 мл, содержащей 80 мл среды К1, 1 мл культуры штамма/ассоциации, бифенил (1 г/л).

2. Культуру выращивали до середины логарифмической фазы при +28 °С с аэрацией на круговом шейкере (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия), режим – 120 об/мин.

3. Бактериальную культуру помещали в центрифужные пробирки.

4. Центрифугирование осуществляли на центрифуге К3 («Sartorius», Германия) в режиме – 10000 об/мин, время – 10 минут, температура – 20 °С.

5. Удаляли супернатант, промывали культуру стерильной средой К1.

6. Проводили повторное центрифугирование, в том же режиме. Этапы 3 – 6 повторяли трижды.

7, 8. Бактериальную культуру ресуспендировали в минеральной среде К1 до ОП = 2,0 о.е. (спектрофотометр BioSpec-mini, «Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм (Егорова *и соавт.*, 2013).

9. Бактериальную культуру (990 мкл) помещали в стерильные флаконы с тефлоновыми крышками и вносили субстрат в виде ацетонового раствора (конечная концентрация указана в Главе 5).

10. Флаконы инкубировали на шейкере (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) 200 об/мин при 28 °С. Для анализа метаболитов пробы отбирали в зависимости от схемы эксперимента на 0, 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сутки.

11. Отобранные пробы отделяли от бактериальной массы центрифугированием (центрифуга miniSpin, «Eppendorf», Германия) при 10000 об/мин. Надосадочную жидкость анализировали методами ВЭЖХ и ГХ-МС.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. В эксперименте не использовался контроль без биомассы, т.к. применяемая методика экстракции не допускает потери субстрата путём испарения или сорбции на поверхностях.

2.8 Расчет кинетических параметров роста штамма и утилизации субстратов

Удельную скорость роста бактериальных штаммов/ассоциаций рассчитывали по классической методике согласно формуле

$$\mu = (\text{Ln}C_x - \text{Ln}C_0) / (t_x - t_0)$$

где C_x – концентрация культуры в высшей точке роста, C_0 – концентрация культуры в начальный момент роста, t_0 и t_x – время в начале и конце логарифмической фазы роста культуры.

Эффективность деструкции хлор-, гидроксид-замещенных бифенилов и их смесей оценивали в процентах согласно формуле:

$$D (\%) = 100 - ((C_t \times 100) / C_0),$$

где D – эффективность деструкции (%); C_t – концентрация субстрата через определенный промежуток времени (2 или 24 ч); C_0 – концентрация субстрата в начальный момент времени.

Скорость деструкции 2,5,3',4'-тетрахлорбифенила и смеси Т рассчитывали по формуле

$$V = (C_0 - C_t) / ((t_i - t_0) \cdot C_{\text{клет}}),$$

где C_0 – концентрация 2,5,3',4'-тетрахлорбифенила/смеси Т в начальный момент времени, мг/л, C_t – концентрация смеси 2,5,3',4'-тетрахлорбифенила/смеси Т в конечный момент времени, мг/л, t_i – конечный момент времени, сут, t_0 – начальный момент времени, сут, $C_{\text{клет}}$ – концентрация клеток бактериальной ассоциации, г. Концентрацию клеток рассчитывали исходя из того, что 0,432 мг сухих клеток соответствует 1 мл бактериальной суспензии с $\text{ОП}_{600} = 1,0$ о.е.

Удельную скорость деструкции субстратов рассчитывали по формуле

$$V_{\text{уд}} = (\text{Ln}C_0 - \text{Ln}C_t) / t$$

где C_0 – концентрация субстрата в начальный момент времени, C_t – концентрация субстрата в конечный момент времени, t – время деструкции (сут).

Уравнения, описывающие динамику деструкции субстратов и кривые роста планктонной культуры, получали в результате анализа экспериментальных данных с использованием программного пакета Microsoft Excel.

2.9 Аналитические методы

2.9.1 Газовая хроматография с масс-селективным детектором (ГХ-МС)

Количественный и качественный анализ ПХБ и НО-ХБ в культуральной жидкости осуществляли с использованием газового хромато-масс-спектрометра «Agilent GC 7890A MSD 5975C inert XL EI/CI» («Agilent Technology», США) согласно (Plotnikova *et al.*, 2012; Egorova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021). Культуральную жидкость предварительно экстрагировали смесью конц. H_2SO_4 –12,5 %-ный ДДС- Na -гексан (1:10:25) в течение 60 мин при 30°C, скорость перемешивания 200 об/мин, и обезвожена с использованием Na_2SO_4 (Plotnikova *et al.*, 2012).

2.9.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Наличие в супернатанте хлор-, гидрокси- и хлоргидроксибензойных кислот определяли на хроматографе LC-20A («Shimadzu», Япония) с колонкой Discovery C18 (150 x 4,6 мм или 250 x 4,6 мм) («Supelco», «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором при 205 нм. Анализ проводили в системе ацетонитрил-0,1 %-ый H_3PO_4 (70:30). Идентификация - с помощью сравнения времени удержания на колонке исследуемых и стандартных соединений. Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений (Egorova *et al.*, 2010).

2.9.3 Спектрофотометрия

Образование продуктов мета-расщепления ароматического кольца хлор-(гидрокси-)бифенилов – 2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК) анализировали в надосадочной жидкости на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ от 390 нм до 440 нм.

Динамику дегалогенирования ПХБ контролировали измерением оптической плотности раствора хлорида серебра, образующегося через 5 минут после внесения в супернатант 5 %-ного азотнокислого серебра, на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ от 460 нм до 540 нм. Концентрацию ионов хлора рассчитывали по калибровочным графикам. Для построения

калибровочного графика брали растворы хлорида натрия в концентрации от 0,001 до 0,4 г/л.

2.10 Статистические методы

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. При обработке результатов вычисляли среднее арифметическое, средне квадратичное отклонение, достоверность результата, корреляцию Пирсона.

Глава 3. АССОЦИАЦИИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, ПОЛУЧЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА (ХЛОР)АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ, И ИХ БИОДЕГРАДАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

3.1. Характеристика бактериальных смешанных культур, полученных с применением Совола в качестве селективного фактора

В результате накопительного культивирования с использованием в качестве селективного фактора коммерческой смеси ПХБ марки Совол было получено шесть бактериальных смешанных культур: из почв, отобранных с территории ОАО «Завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей» (г. Пермь, Россия) – смешанные культуры PN1 и PN2-S; из почв, отобранных на территории ОАО «Средне-волжский завод химикатов» (г. Чапаевск, Россия) – смешанные культуры CHN1, CHN2, CHN3 и CHN4 (Таблица 6).

Таблица 6 – Плотность популяции и биоразнообразие бактериальных ассоциаций после культивирования на Соволе

Смешанная культура	Плотность популяции, КОЕ/мл	Количество доминирующих морфотипов, шт.	Индекс биоразнообразия, оцененный по ДГГЭ-профилям		
			Индекс Шеннона-Уивера (<i>H</i>)	Видовое богатство (<i>S</i>)	Однородность (<i>Eh</i>)
PN1	$4,5 \times 10^6$	8	2,27	15	0,84
PN2-S	$2,9 \times 10^5$	7	1,80	10	0,78
CHN1	$6,2 \times 10^6$	7	2,73	19	0,93
CHN2	$1,6 \times 10^5$	5	2,01	10	0,87
CHN3	$5,0 \times 10^4$	5	1,91	12	0,77
CHN4	$2,3 \times 10^4$	3	1,26	8	0,61

Установлено, что наибольшей численностью колониеобразующих единиц и разнообразием доминирующих морфотипов бактериальных колоний характеризовались смешанные культуры PN1 и CHN1 (Таблица 6). Каждая смешанная культура обладала уникальным составом, о чем свидетельствуют ДГГЭ-

профили генов 16S рРНК, полученных на основе анализа их тотальной ДНК (Рисунок 13). Наибольшее количество полос с высокой интенсивностью свечения выявлено в смешанных культурах PN1 и CHN1. К тому же, у данных культур индекс Шеннона-Уивера имел максимальные значения по сравнению с показателями остальных смешанных культур (H) – 2,27 и 2,73, соответственно, индекс равномерности распределения составил 0,84 и 0,93, соответственно (Таблица 6).

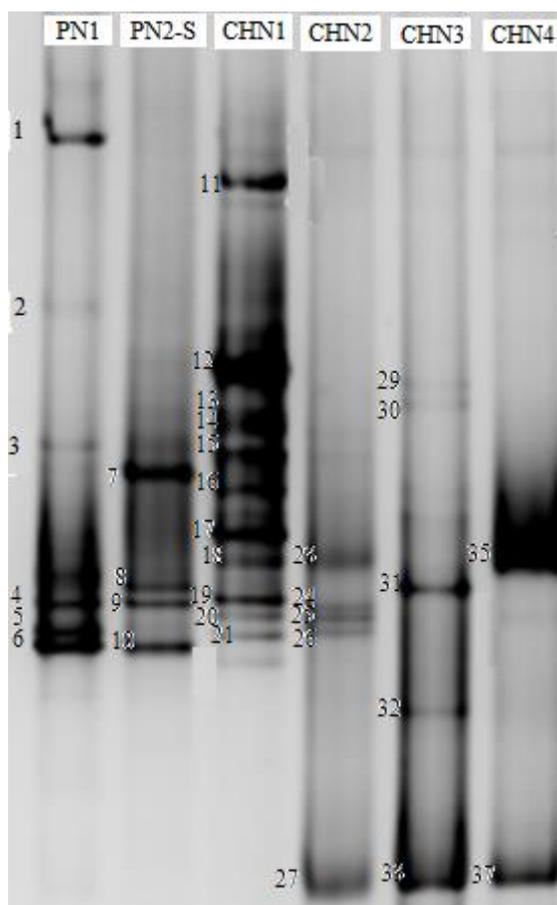


Рисунок 13 – ДГГЭ-электрофореграмма амплифицированных фрагментов 16S рРНК исследуемых ассоциаций (после селекции на Соведе). Цифры указывают на ДНК-фрагменты, выделенные из геля для дальнейшего изучения

Значения индексов биоразнообразия смешанных культур PN1 и CHN1 превышают аналогичные показатели ассоциаций ЕСС и ЕСТ, выделенных в результате накопительного культивирования в минеральной среде из ПХБ-загрязненных почв города Тайчжоу (Китай) (концентрация ПХБ в почвах города варьирует в пределах 0,35 – 2610 нг/г почвы) (Su *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2020).

Наименьшими показателями биоразнообразия характеризовалась бактериальная смешанная культура CHN4, о чем свидетельствует наименьшее количество ОТЕ и низкое значение равномерности распределения ($E = 0,61$ и $0,74$, соответственно), так как в образце присутствовала ОТЕ, составляющая 50,3 % от суммы интенсивностей свечения фрагментов ДНК (Рисунок 13). Стоит отметить, что уровень корреляции (r) между показателями, полученными при анализе доминирующих морфотипов и количественном учете КОЕ/мл представленных в ассоциациях бактерий, и индексами биоразнообразия, рассчитанными на основании ДГГЭ-анализа ДНК исследуемых ассоциаций, очень высокий и составляет 0,63–0,94.

На рисунке 14 показана дендрограмма, построенная на основании данных о сходстве ДГГЭ-профилей, позволяющая оценить сходство и различие полученных смешанных культур бактерий.

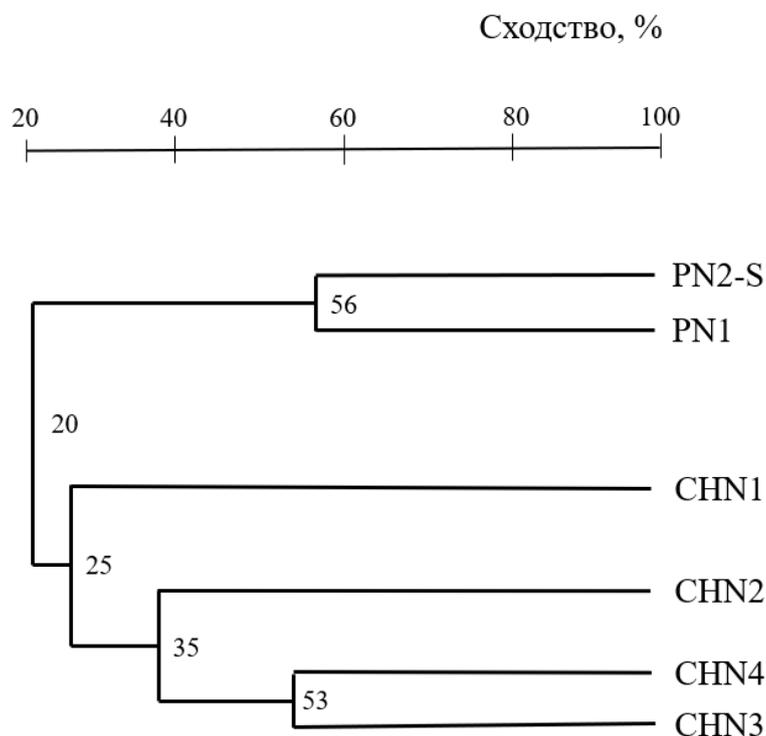


Рисунок 14 – Дендрограмма, построенная методом UPGMA, отображающая сходство ДГГЭ-профилей амплифицированных фрагментов 16S рДНК исследуемых ассоциаций. В узлах кластеров указаны значения уровня сходства (%).

Уровень сходства смешанных культур PN1 и PN2-S, выделенных из почв г. Перми, с ассоциациями CHN1–CHN4, выделенными из почв г. Чапаевск, составил 20 %. Смешанные культуры, полученные из почв г. Перми и г. Чапаевска, формируют самостоятельные ветви на дендрограмме. Уровень сходства между бактериальным составом PN1 и PN2-S составил 56 %, тогда как внутри ветви смешанных культур из почв г. Чапаевска уровень сходства варьировал 25–53 %. Известно, что в формировании бактериального сообщества значительную роль играет состав веществ, присутствующих в почве и/или среде культивирования (Su *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). В связи с этим, представляется интересным тот факт, что из почв, отличающихся спектром загрязняющих веществ (почвы, отобранные в г. Пермь и г. Чапаевск характеризуются качественными различиями (Воронина, 2020; Nazarov *et al.*, 2016)) при культивировании в среде (K1) с одним селективным фактором (Совол) удалось выделить бактериальные сообщества, значительно отличающиеся друг от друга и формирующие самостоятельные ветви на дендрограмме. В случае, когда образцы почв различаются количеством присутствующих загрязнителей (различия в количественном содержании ПХБ между образцами почв из г. Чапаевск составляет 1,6–5,1 раза (Nazarov *et al.*, 2016)), при одинаковых условиях культивирования также выделяются бактериальные сообщества с невысоким уровнем сходства между собой, но формирующие единый кластер на дендрограмме. Можно утверждать, что определяющим фактором в формировании смешанных бактериальных культур является исходный состав загрязнителей в почве, а селективный фактор (Совол), используемый при накопительном культивировании, оказывает вторичное действие.

Фрагменты 16S рДНК (33 фрагмента из 6 смешанных культур), отличающиеся электрофоретической подвижностью в ДГГЭ, были реамплифицированы после элюирования из геля (Рисунок 13). У большинства фрагментов 16S рДНК (23 фрагментов) были определены нуклеотидные последовательности (Рисунок 13, Таблица 7). Анализ полученных последовательностей показал, что в них присутствуют бактерии классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Chitinophagia*.

Таблица 7 – Результаты филогенетического анализа фрагментов гена 16S рРНК бактериальных ассоциаций по данным ДГГЭ-анализа

Бактериальная ассоциация	Номер полосы на ДГГЭ-хроматограмме	Номер нуклеотидной последовательности в базе данных GenBank	Ближайший родственный штамм (номер в базе данных GenBank)	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Размер фрагмента, п.н.
PN1	5	MN368515	Uncultured <i>Albidiferax</i> sp. TH121 (NOXW01000010)	93,57	499
	6	MN368516	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i> 12-3 ^T (AB008507)	99,60	500
PN2-S	7	MN368517	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i> 12-3 ^T (AB008507)	99,20	498
	10	MN368520		99,38	489
	8	MN368518	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B ^T (AF273082)	97,37	458
CHN1	9	MN368519	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411 ^T (Y18616)	99,18	489
	11	MN368521	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. MRY13-0052 (BATO0100155)	99,36	472
	13	MN368523		98,94	473
	16	MN368526		99,14	475
	17	MN368527		98,92	474
	18	MN368528		99,14	467
21	MN368531	98,75		480	

Окончание таблицы 7

Бактери- альная ассоциация	Номер полосы на ДГГЭ- хромато- грамме	Номер нуклеотидной последова- тельности в базе данных GenBank	Ближайший родственный штамм (номер в базе данных GenBank)	Сходство фрагмент а гена 16S рРНК, %	Размер фрагмента, п.н.
CHN1	12	MN368522	<i>Pseudomonas hunanensis</i> LV ^T (JX545210)	98,71	495
	14	MN368524		98,73	482
	15	MN368525	Uncultured	98,91	459
	19	MN368529	<i>Pseudomonas</i> sp. KOS6 (KK020676)	98,93	474
	20	MN368530	<i>Pseudomonas laurentina</i> GSL-010 ^T (KY471137)	98,92	474
CHN2	26	MN368532	<i>Brevundimonas alba</i> DSM4736 ^T (AJ227785)	98,17	441
	27	MN368533	<i>Azohydromonas australiana</i> IAM12664 ^T (AB188124)	98,17	496
CHN3	29	MN368534	Uncultured	98,95	477
	33	MN368536	<i>Steroidobacter</i> sp. JW-3 (ML142848)	98,95	474
	30	MN368535	<i>Steroidobacter agariperforans</i> KA5- B ^T (AB174844)	98,11	477
CHN4	37	MN368537	Uncultured fam. <i>Chitinophagaceae</i> clone SEV1DA051 (JQ407937)	99,37	480

В ассоциациях PN1 и PN2-S выявлены представители классов *Betaproteobacteria* и *Gamma proteobacteria*. При этом в обеих ассоциациях класс *Gamma proteobacteria* представлен родом *Pseudoxanthomonas*. Фрагмент 5 (ассоциация PN1) (Рисунок 13) показал наибольшее сходство с некультивируемым штаммом рода *Albidiferax* (класс *Betaproteobacteria*), тогда как в составе ассоциации PN2-S выявлен представитель рода *Acidovorax* (класс *Betaproteobacteria*).

Анализ нуклеотидной последовательности фрагментов гена 16S рДНК показал, что в ассоциации CHN1 преобладали грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gamma proteobacteria*), близкородственные штаммам *P. hunanensis* LV^T (JX545210) и *P. laurentina* GSL-010^T (KY471137) (Таблица 7). Среди 11 нуклеотидных последовательностей, 8 показало высокую степень идентичности с некультивируемыми бактериальными клонами данного рода (98,75–99,14 %). В бактериальной ассоциации CHN2 обнаружены бактерии родов *Brevundimonas* (класс *Alphaproteobacteria*) и *Azohydromonas* (класс *Betaproteobacteria*). Как показало секвенирование фрагментов 16S рДНК, в ассоциации CHN3 доминировали бактерии рода *Steroidobacter* (класс *Gamma proteobacteria*). Фрагмент 37 ассоциации CHN4 показал наибольшее сходство с некультивируемым клоном семейства *Chitinophagaceae* филум *Bacteroidetes* (99,37 %) (Таблица 7). Стоит отметить, что среди исследованных фрагментов гена 16S рДНК четырех бактериальных смешанных культур, полученных при культивировании почв, отобранных на территории г. Чапаевск, идентичных фрагментов из разных культур не обнаружено.

Доминирование бактерий класса *Gamma proteobacteria* ранее было описано для сообществ, выделенных из ПХБ-загрязненных речных осадков и почв, а также из креозот-загрязненной почвы, подвергнутой культивированию в присутствии полиароматических соединений (нафталина и фенантрена) (Providenti, Wyndham, 2001; Petrić *et al.*, 2011). В настоящем исследовании бактерии данного класса являются основным компонентом сообществ PN1, PN2-S, CHN1 and CHN3,

выделенных из ПХБ-загрязненных почв, что согласуется с литературными данными.

В литературе описан ряд бактериальных сообществ, обитающих в химически-загрязненных, в том числе и ПХБ-загрязненных почвах, основным компонентом которых являются бактерии класса *Betaproteobacteria* (Cervantes-González *et al.*, 2019; Voronina *et al.*, 2019). В связи с этим, обнаружение данного таксона в наших сообществах было ожидаемым.

Hoostal и Bouzat (2016) показали, что 18–32 % от всего состава бактериальных сообществ, выделенных из загрязненных районов, составляют бактерии филума *Bacteroidota*. В то же время, описано бактериальное сообщество из ПХБ-загрязненной почвы, в состав которого представители филума *Bacteroidota* входят в качестве минорных компонентов (Cervantes-González *et al.*, 2019). В настоящем исследовании представители филума *Bacteroidota* были обнаружены методом ДГГЭ только в составе смешанного сообщества СНН4, что согласуется с вышеприведенными данными.

Несмотря на то, что в большинстве бактериальных сообществ, выделенных из ПХБ-загрязненных районов, присутствуют в значительном количестве бактерии класса *Actinobacteria* (Kolar *et al.*, 2007; Gioia *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015), в настоящем исследовании методом ДГГЭ-анализа бактерии данного класса в составе ассоциаций не выявлены. Однако полученный результат не позволяет утверждать, что актинобактерии отсутствуют в данных сообществах, можно предположить, что они являются минорными компонентами. Данное предположение было подтверждено при выделении индивидуальных штаммов из одного из исследуемых сообществ (данные приведены в Главе 4).

3.2. Ассоциации, полученные при культивировании в минеральной среде с внесением бифенила как источника углерода

Состав бактериальных ассоциаций зависит от состава почвы/среды и доступности необходимых для роста макроэлементов (в том числе углерода) (Wu *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015). При накопительном культивировании, источником

углерода являлись вещества, присутствующие в почве, а селективным фактором являлась смесь ПХБ Совол. Смена источника углерода и селективного фактора на бифенил привела к сукцессионным изменениям в составе исследуемых смешанных бактериальных культур (Таблица 8). Анализ состава ассоциаций при каждом пересеве с интервалом культивирования 7 сут показал, что происходит снижение количества доминирующих морфотипов. В стабильных ассоциациях, полученных в результате селекции на бифениле, присутствует от 2 до 6 доминирующих морфотипов, тогда как в исходных смешанных культурах данный показатель варьировал от 3 до 8 (Таблицы 6, 8). Помимо снижения биоразнообразия в составе ассоциаций, снижалась и плотность, что было зафиксировано при оценке КОЕ/мл (Таблица 8). Таким образом, смена источника углерода и селективного фактора привела к изменению состава бактериальных ассоциаций.

Таблица 8 – Изменение морфологического состава и плотности бактериальных популяций во время селекции

Смешанная культура, полученная после культивирования на Соволе	Бактериальная ассоциация (культивирование на бифениле)	Бактериальные ассоциации, после первого цикла культивирования на бифениле		Стабильные бактериальные ассоциации, культивируемые на бифениле	
		Доминирующие морфотипы, шт.	Плотность популяции, КОЕ/мл	Доминирующие морфотипы, шт.	Плотность популяции, КОЕ/мл
PN1	PN1-B	8	$5,2 \times 10^5$	2	$4,2 \times 10^4$
PN2-S	PN2-B	7	$8,5 \times 10^4$	6	$1,5 \times 10^4$
CHN1	CHN1-B	4	$5,1 \times 10^5$	2	$5,0 \times 10^4$
CHN2	CHN2-B	3	$6,1 \times 10^3$	2	$3,2 \times 10^3$
CHN3	CHN3-B	2	$2,1 \times 10^4$	2	$6,0 \times 10^3$
CHN4	CHN4-B	3	$4,5 \times 10^3$	3	$4,5 \times 10^3$

Полученные стабильные бактериальные ассоциации были способны к росту в жидкой минеральной среде, содержащей бифенил как единственный источник углерода (Рисунок 15). Наибольшей удельной скоростью роста и оптической плотностью культуры обладала ассоциация PN2-B. Удельная скорость роста остальных ассоциаций была выше, чем у ассоциации, описанной Liz *et al.*, 2009, а

также ряда индивидуальных штаммов-деструкторов ПХБ, однако максимальная плотность культуры уступала аналогичному показателю как индивидуальных штаммов, так и бактериальных ассоциаций, выращенных на незамещенном бифениле (Pori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009; Liz *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2013). Полученные результаты свидетельствуют о том, что бактериальные ассоциации PN1-B, PN2-B, CHN1-B, CHN2-B, CHN3-B, CHN4-B осуществляют разложение бифенила.

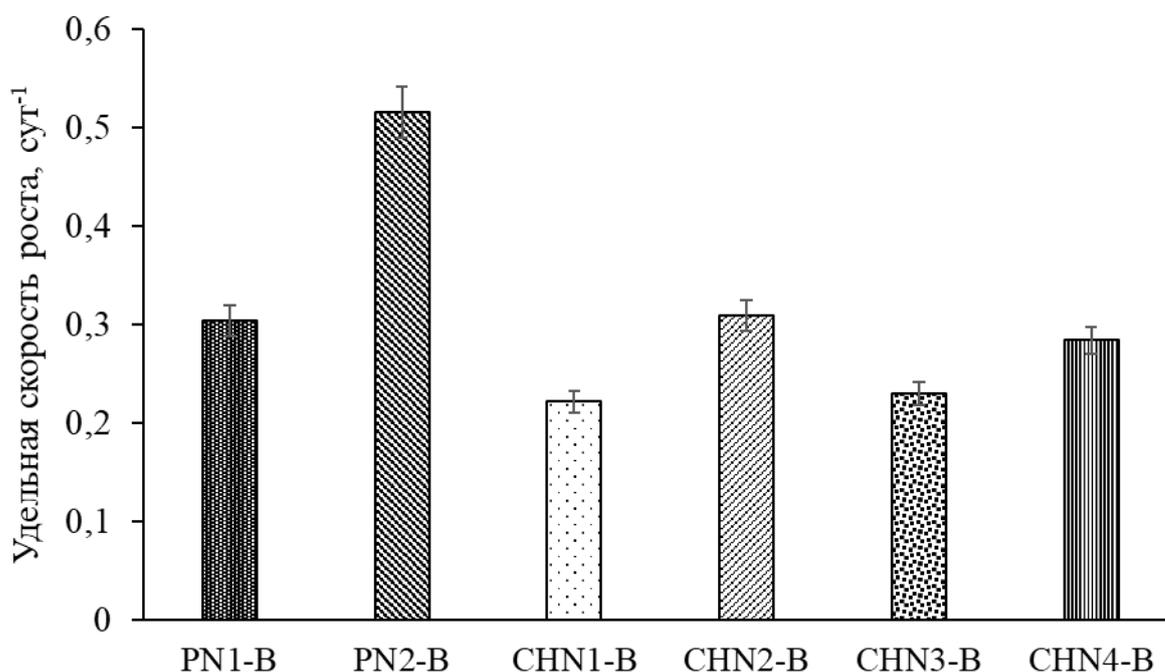


Рисунок 15 – Показатель удельной скорости роста бактериальных ассоциаций при культивировании в минеральной среде с бифенилом (1 г/л), в качестве единственного источника углерода

Изучена способность стабильной ассоциации PN2-B разлагать монохлорированные и дихлорированный (содержащий заместителей в обоих кольцах молекулы) бифенилы, а также коммерческие смеси ПХБ (Таблица 9, Рисунок 16). Начальные концентрации составляли 94,5 мг/л для моноХБ, 22,3 мг/л для диХБ, 13,8 мг/л для коммерческих смесей ПХБ (Delor 103 и Совол).

Наибольшую активность бактериальная ассоциация проявляла по отношению к 2-хлорбифенилу, осуществляя 100 %-ю деструкцию за 1 сутки культивирования. При этом в среде накапливаются невысокие концентрации

8С1-ГОФДК (3,3–4,8 мг/л), а количество аккумулированной 2-ХБК через двое суток составило 94,9 % от максимально возможного.

Таблица 9 – Эффективность деструкции хлорированных бифенилов бактериальной ассоциацией PN2-B

Хлорбифенил	Время, ч	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	ХБК, мг/л
2-ХБ	18	100	0,480	73,4±0,2
	48	100	0,334	74,5±0,1
3-ХБ	18	77,4±0,1	0,335	19,7±0,2
	48	100	0,682	6,4±0,1
4-ХБ	18	93,4±0,1	0,083	7,1±0,3
	48	100	0,211	4,6±0,1
2,4'-диХБ	18	61,9±0,1	1,187	0,24±0,1 (2-ХБК)
	48	86,2±0,2	1,411	0,24±0,2 (2-ХБК)

Разложение 3-хлорбифенила и 4-хлорбифенила происходило несколько медленнее, однако за двое суток PN2-B разлагает данные монохлорбифенилы на 100 %, при этом в среде аккумулируются незначительные количества ГОФДК ($ОП_{9С1-ГОФДК} = 0,682$, что эквивалентно 10,9 мг/л; $ОП_{10С1-ГОФДК} = 0,211$) и низкие концентрации соответствующих хлорбензойных кислот, с отрицательной динамикой аккумуляции в процессе деструкции хлорбифенилов. Стоит отметить, что ассоциация PN2-B, способна разлагать 3-хлорбензойную и 4-хлорбензойную кислоты, о чем свидетельствует снижение концентрации данного метаболита при трансформации 3-ХБ и 4-ХБ (Таблица 9). Анализ количества выделенного хлора позволяет предположить, что разложение 4-ХБК происходит через стадию отщепления иона хлора от молекулы кислоты, тогда как разложение 3-ХБК осуществляется без стадии дехлорирования с образованием в качестве следующего метаболита хлоркатехола (данные не показаны).

Установлено, что ассоциация PN2-B осуществляет разложение не только бифенила и индивидуальных конгенов ПХБ (Рисунок 15, Таблица 9), но и

коммерческих смесей полихлорированных бифенилов торговых марок Delor 103 и Совол (Рисунок 16).

Kolar с коллегами описал шесть бактериальных сообществ, полученных в результате накопительного культивирования с бифенилом в качестве селективного фактора, которые проявляют деструктивную активность в отношении смеси ПХБ, содержащей ди-гептахлорированные конгенеры (Kolar *et al.*, 2007). Бактериальное сообщество, в составе которого доминантными являются представители филумов *Actinobacteria* и *Firmicutes*, и в меньшей степени - филума *Proteobacteria*, осуществляет разложение смеси из 6 конгенов ПХБ в аэробных условиях за 4 недели на 54 % (Cervantes-González *et al.*, 2019).

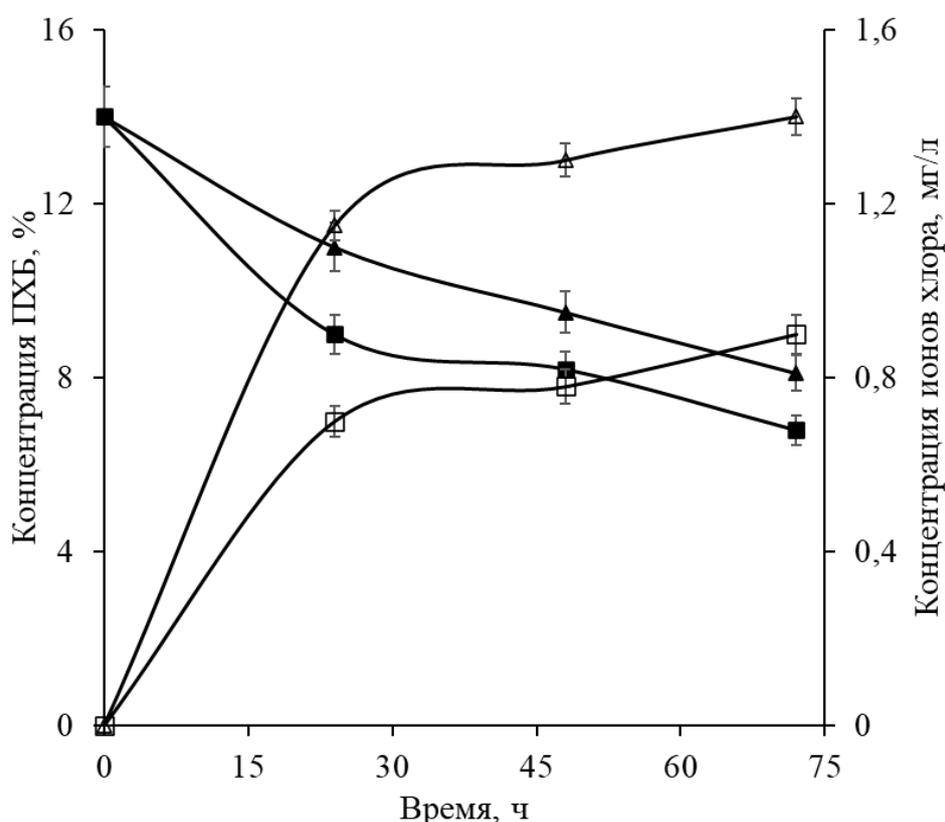


Рисунок 16 – Деградация коммерческих смесей ПХБ бактериальной ассоциацией PN2-B: Delor 103 (▲), Совол (■), концентрация ионов хлора при биодеструкции Delora 103 (△) и Совола (□)

Высокую активность по отношению к коммерческим смесям ПХБ демонстрировали бактериальные сообщества, состоящие из представителей *Proteobacteria* и *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria* (Kolar *et al.*, 2007; Liz *et*

al., 2009; Petrić *et al.*, 2011; Pathiraja *et al.*, 2019a, 2019b). Бактериальная ассоциация PN2-B, представленная в основном штаммами *Proteobacteria*, разлагает за трое суток 38,4 % (5,3 мг/л) смеси Delor 103 и 50,9 % (7,02 мг/л) смеси Совол (Рисунок 16). Разложение сопровождается накоплением в среде ионов хлора, и хлорбензойных кислот (количественный анализ не проводился), но не ГОФДК (Рисунок 16). Таким образом, ассоциация PN2-B эффективнее разлагает коммерческую смесь ПХБ марки Совол несмотря на то, что в данной смеси преобладают конгенеры ПХБ с 5 и 6 заместителями в молекуле, тогда как в смеси Delor 103 преобладают менее хлорированные конгенеры ПХБ.

Основываясь на полученных результатах можно заключить, что ассоциация PN2-B представляет значительный научный и практический интерес как ассоциация-деструктор ПХБ, сформировавшаяся под давлением специфических селективных факторов: длительного хлорорганического загрязнения, смеси полихлорированных бифенилов торговой марки Совол, незамещенного бифенила.

Глава 4. ШТАММЫ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ АССОЦИАЦИЙ

4.1 Индивидуальные штаммы, использующие бифенил как источник углерода

Из ассоциаций, полученных в результате последовательной селекции с использованием в качестве лимитирующего фактора СОВОЛА и бифенила (Глава 3), выделены индивидуальные штаммы бактерий, способные расти на бифениле, как единственном источнике углерода и энергии (Таблица 10).

Таблица 10 – Ростовые показатели штаммов, при культивировании на бифениле (1 г/л)

Штамм	ОП _{макс} , о.е.	μ , h ⁻¹	Штамм	ОП _{макс} , о.е.	μ , h ⁻¹
PNS1	1,064	0,035	PNB1	0,129	0,011
PNS2	0,356	0,023	PNB2	0,522	0,022
PNS3	0,362	0,023	PNB3	0,957	0,036
PNS4	0,582	0,029	PNB4	0,309	0,023
PNS5	1,378	0,046	PNB5	0,772	0,008
PNS6	1,359	0,025	PNB6	1,076	0,020
PNS7	0,227	0,019	PNB7	0,625	0,025
			PNB8	0,132	0,009

В результате периодического культивирования на минеральной среде К1, содержащей бифенил как единственный источник углерода, установлено, что штаммы демонстрировали невысокую скорость роста (0,008–0,046 ч⁻¹), но достигали значительной плотности культуры (0,129–1,378 о.е.). Штамм PNS5 по ростовым параметрам близок к штаммам *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. ruber* и *S. maltophilia* – активным деструкторам бифенила/ПХБ (Egorova *et al.*, 2013, Horvatova *et al.*, 2018). Удельная скорость роста штамма-деструктора ПХБ *Achromobacter xylosoxidans* IR08 при культивировании на бифениле была ниже, чем

у представленных в настоящей работе штаммов, также более низкой оптической плотностью культуры характеризовался штамм *Sphingomonas* sp. SS3 (Таблица 10) (Ilori *et al.*, 2008; Blanco-Moreno *et al.*, 2017).

4.2 Идентификация штаммов, выделенных из смешанной культуры PN2-S

Аэробные бактериальные штаммы, обозначенные как PNS, были выделены из смешанного бактериального сообщества PN2-S путем высева на агаризованную минеральную среду K1 в парах бифенила. В результате BOX-ПЦР установлено, что ДНК-профили данных штаммов распределяются в 6 геномогрупп, при этом штаммы PNS2 и PNS7, профили которых представлены на «дорожках» 2 и 4 формируют единую геномогруппу (Рисунок 17).

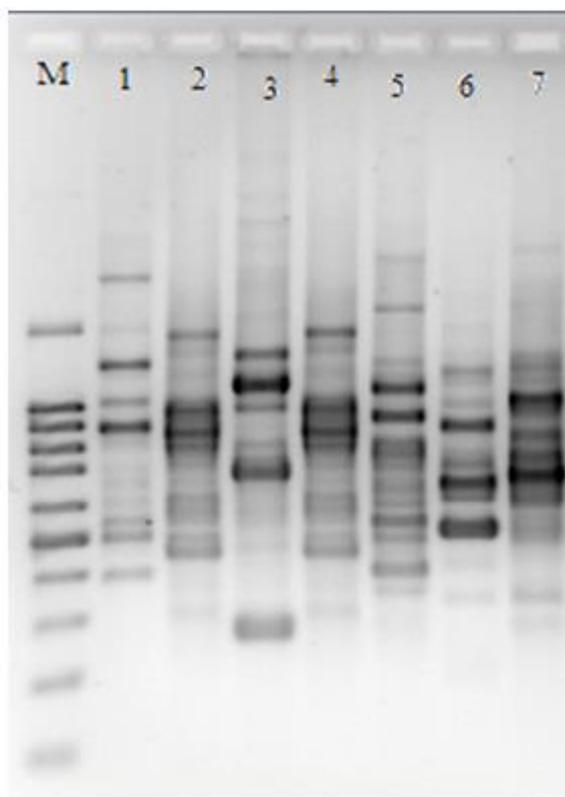


Рисунок 17 – Электрофореграмма ДНК-фрагментов, полученных методом BOX-ПЦР: **М** — маркер молекулярной массы O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Литва), **1** – штамм PNS1, **2** – штамм PNS2, **3** – штамм PNS3, **4** – штамм PNS7, **5** – штамм PNS6, **6** – штамм PNS5, **7** – штамм PNS4

У штаммов PNS1, PNS2, PNS3, PNS4, PNS5 и PNS6 были определены нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК и проведено их сравнение с

гомологичными последовательностями в базах данных NCBI и EzBioCloud (Таблица 11, Рисунок 18).

Таблица 11 – Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК штаммов-деструкторов бифенила с гомологичными последовательностями типовых штаммов

Штамм	Номер нуклеотидной последовательности в базе данных GenBank	Типовой штамм ближайшего родственного вида (номер в базе данных GenBank)	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Размер фрагмента, п.н.
PNS1	MN368544	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 ^T (CP001628)	100	897
PNS2	MN368545	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B ^T (AF273082)	100	890
PNS3	MN368546	<i>Starkeya novella</i> DSM 506 ^T (CP002026)	98,74	955
PNS4	MN368547	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158 ^T (BBIS01000088)	99,77	869
PNS5	MN368548	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 ^T (CP000758)	100	837
PNS6	MN368549	<i>Stenotrophomonas indicatrix</i> WS40 ^T (KJ452162)	99,77	874

Идентификация штаммов на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показала, что 5 штаммов принадлежат филуму *Proteobacteria*: штамм PNS3 – класс *Alphaproteobacteria*, порядок *Rhizobiales*, семейство *Xanthobacteraceae*, род *Starkeya*, штамм PNS5 – класс *Alphaproteobacteria*, порядок *Rhizobiales*, семейство *Brucellaceae*, род *Ochrobactrum*; штамм PNS2 – класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Lysobacterales*, семейство *Lysobacteraceae*, род *Pseudoxanthomonas*,

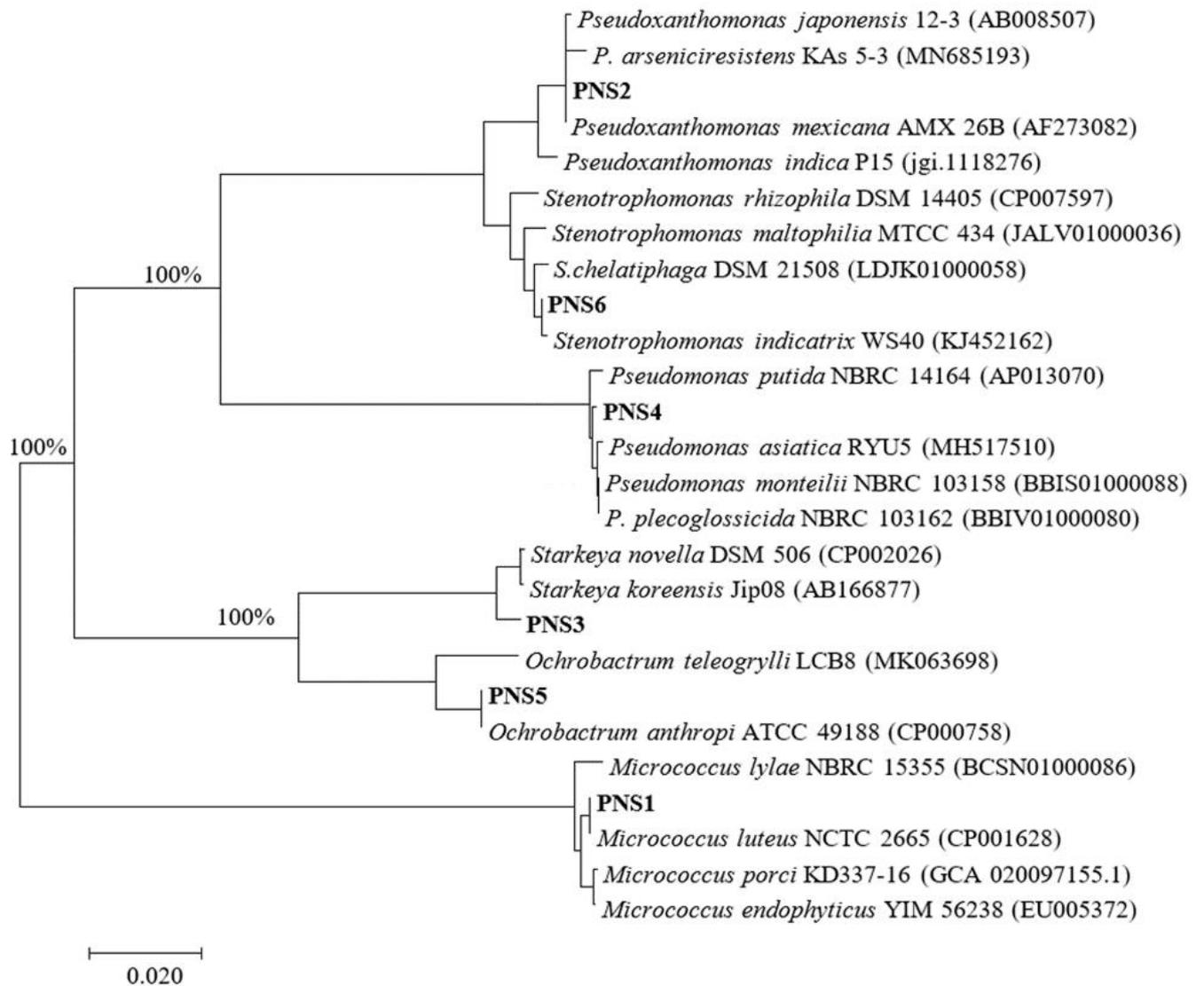


Рисунок 18 – Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК методом neighbor-joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

штамм PNS4 – класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Pseudomonadales*, семейство *Pseudomonadaceae*, род *Pseudomonas*, штамм PNS6 – класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Lysobacterales*, семейство *Lysobacteraceae*, род *Stenotrophomonas*; и один штамм PNS1 – филуму *Actinobacteria* класс *Actinomycetia*, порядок *Micrococcales*, семейство *Micrococcaceae*, род *Micrococcus* (Таблица 11, Рисунок 18).

Полученные результаты согласуются с количественными данными по доминирующим морфотипам в PN2-S (Таблица 6), а также частично совпадают с результатами идентификации фрагментов гена 16S рПНК, полученных методом ДГГЭ (Таблица 7). Так, наиболее филогенетически близким для штамма PNS2 и фрагмента ДНК (линия 8) (Рисунок 13) является штамм *Pseudoxanthomonas mexicana* AMX 26B^T (Таблицы 7, 10).

Штаммы *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *Stenotrophomonas* sp. PNS6 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами ВКМ Ас-3022, ВКМ В-3792 и ВКМ В-3793, соответственно.

Следует отметить, что в составе выделенных штаммов-деструкторов бифенила не выявлены бактерии рода *Acidovorax*, присутствие которых в составе смешанной культуры было показано методом ДГГЭ (Таблица 7). Можно предположить, что бактерии рода *Acidovorax* не способны использовать бифенил в качестве ростового субстрата.

Филогенетический анализ изолированных из смешанной культуры PN2-S штаммов, показал более высокий уровень биоразнообразия в составе смешанной культуры PN2-S, чем анализ фрагментов 16S рДНК, полученных методом ДГГЭ. Подобное явление было описано для ПАУ-деградирующих бактерий, выделенных из нефте-загрязненных осадков (Isaac *et al.*, 2013).

4.3 Идентификация штаммов, выделенных из бактериальной ассоциации PN2-B

Восемь аэробных бактериальных штаммов, обозначенных как PNB, были выделены из бактериальной ассоциации PN2-B в результате посева на агаризованную минеральную среду К1 в парах бифенила. Анализ ДНК-профилей данных штаммов показал, что они распределяются в 7 геномогрупп (Рисунок 19).

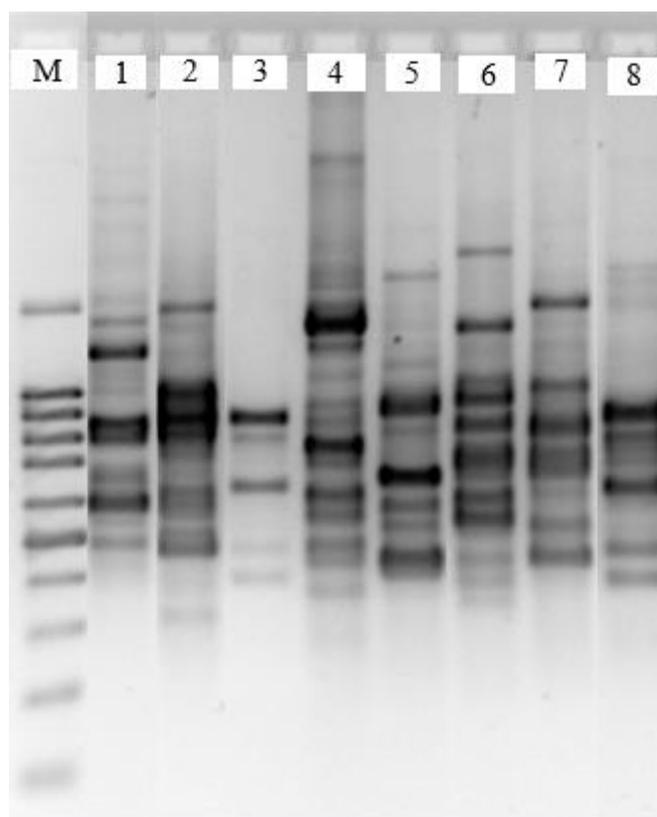


Рисунок 19 – Электрофореграмма ДНК-фрагментов, полученных методом BOX-ПЦР: **М** — маркер молекулярной массы O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Литва), **1** – штамм PNB1, **2** – штамм PNB2, **3** – штамм PNB3, **4** – штамм PNB4, **5** – штамм PNB5, **6** – штамм PNB6, **7** – штамм PNB7, **8** – штамм PNB8

Штаммы PNB3 и PNB8, профили которых представлены на дорожках 3 и 8 формируют одну геномгруппу. Следует отметить, что ДНК-профили штаммов PNB2, PNB7 и PNB2, представленные на дорожках 2, 4 (Рисунок 17) и 2 (Рисунок 19), совпадают. Кроме того, морфология колоний и клеток данных штаммов также совпадает (данные не показаны).

Для дальнейшего исследования были отобраны штаммы, имеющие различные ДНК-профили (фингерпринты) при электрофоретической разгонке (Рисунок 19).

Проведено сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммов PNB1, PNB2, PNB3, PNB4, PNB5, PNB6 и PNB7 с гомологичными

последовательностями в базах данных NCBI и EzBioCloud (Таблица 12, Рисунок 20).

Таблица 12 – Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК штаммов-деструкторов бифенила с гомологичными последовательностями типовых штаммов PN2-B

Штамм	Номер нуклеотидной последовательности в базе данных GenBank	Типовой штамм ближайшего родственного вида (номер в базе данных GenBank)	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Размер фрагмента, п.н.
PNB1	Без номера	<i>Brevibacterium sandarakinum</i> DSM 22082 ^T (LT629739)	97,51	843
PNB2	Без номера	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B ^T (AF273082)	100	890
PNB3	MN368539	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> HL22-2 ^T (JQ246444)	99,3	863
PNB4	MN368540	<i>Microbacterium resistens</i> NBRC 103078 ^T (BCRA01000173)	99,6	892
PNB5	MN368541	<i>Brevibacterium epidermidis</i> NBRC 14811 ^T (BCSJ01000023)	98,73	866
PNB6	MN368542	<i>Achromobacter deleyi</i> LMG 3458 ^T (HG324053)	100	885
PNB7	MN368543	<i>Bosea eneeae</i> 34614 ^T (AF288300)	99,66	890

Филогенетический анализ показал, что 4 штамма принадлежат филуму *Proteobacteria*: штамм PNB7 – класс *Alphaproteobacteria*, порядок *Rhizobiales*, семейство *Boseaceae*, род *Bosea*, штамм PNB6 – класс *Betaproteobacteria*, порядок *Burkholderiales*, семейство *Alcaligenaceae*, род *Achromobacter*, штамм PNB3 – класс *Gamma**proteobacteria*, порядок *Pseudomonadales*, семейство

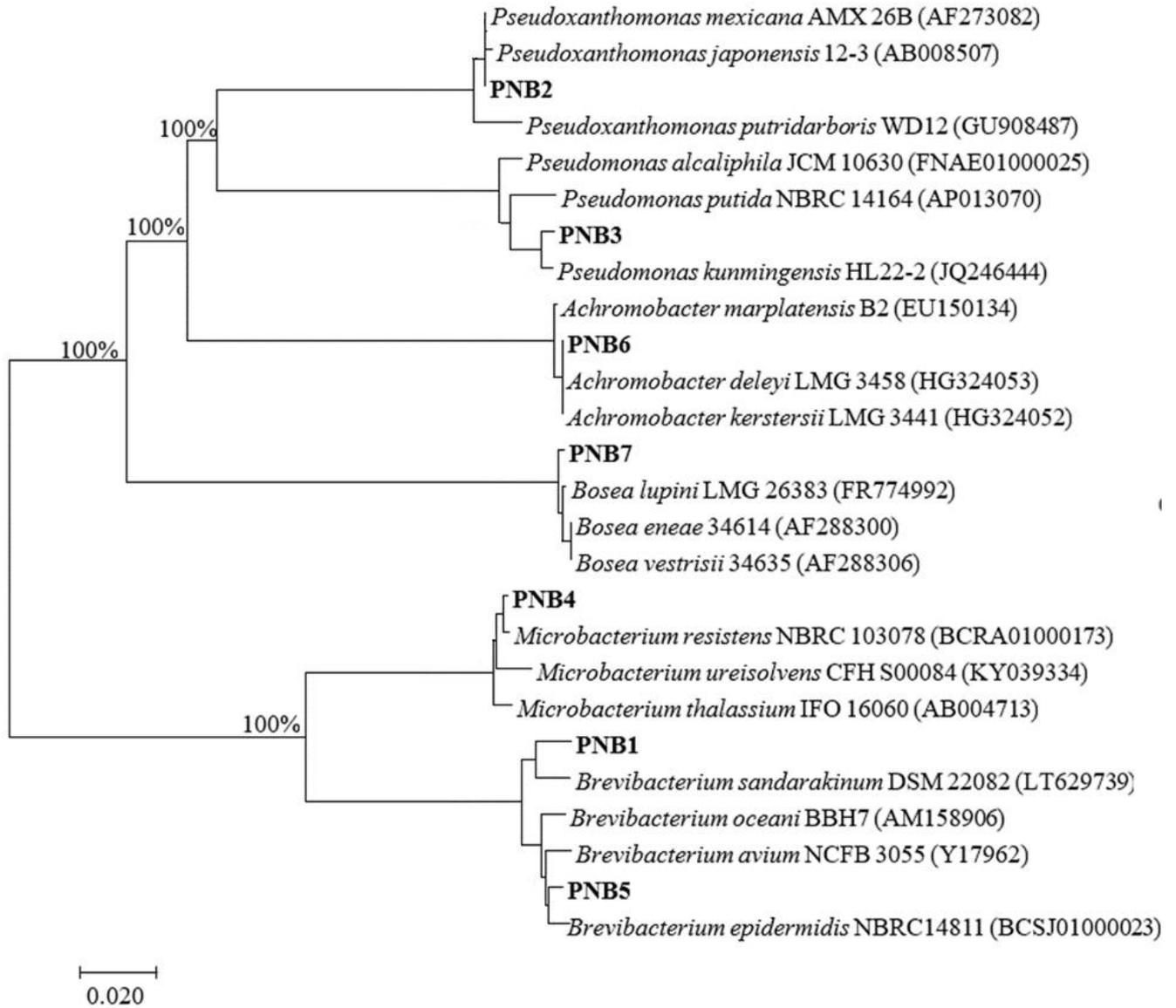


Рисунок 20 – Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК методом neighbor-joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

Pseudomonadaceae, род *Pseudomonas*, штамм PNB2 – класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Lysobacterales*, семейство *Lysobacteraceae*, род *Pseudoxanthomonas*; три штамма – филуму *Actinobacteria*: штаммы PNB1 и PNB5 – класс *Actinomycetia*, порядок *Brevibacteriales*, семейство *Brevibacteriaceae*, род *Brevibacterium*, штамм

PNB4 – класс *Actinomycetia*, порядок *Microbacteriales*, семейство *Microbacteriaceae*, род *Microbacterium* (Таблица 12, Рисунок 20).

При анализе фингерпринтов (Рисунки 17, 19) было отмечено, что штаммы PNS2 и PNB2 вероятно составляют одну геномную группу, выявленную в составе смешанной культуры PN2-S и в составе ассоциации PN2-B. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК подтвердил, что штаммы принадлежат к одному роду (Таблицы 7, 11, 12, Рисунки 18, 20).

Штаммы *Brevibacterium* sp. PNB5 и *Achromobacter* sp. PNB6 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами ВКМ Ас-3018, ВКМ В-3791 соответственно.

Таким образом, из бактериальных ассоциаций выделены индивидуальные аэробные штаммы, способные использовать бифенил как источник углерода, принадлежащие филумам *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Следует отметить, что способность к разложению бифенила для представителей родов *Bosea* и *Pseudoxanthomonas* описана впервые.

Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ТРАНСФОРМИРОВАТЬ ХЛОР- И ГИДРОКСИ-ЗАМЕЩЕННЫЕ БИФЕНИЛЫ

5.1 Бактериальная трансформация моно-замещённых бифенилов

Проанализирована способность аэробных бактериальных штаммов-деструкторов бифенила, выделенных в результате настоящего исследования, а также штамма *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), выделенного ранее из ПХБ-загрязненной почвы, осуществлять трансформацию моно-замещенных бифенилов.

Уровень деструкции 2-хлорбифенила (2-ХБ) исследуемыми штаммами варьировал в пределах 17,7–100 %, 8СІ-ГОФДК не обнаруживалась (за исключением штамма *Pseudomonas* sp. PNS4), а концентрация 2-хлорбензойной кислоты (2-ХБК) в среде составляла 0,3–18,9 мг/л (0,4–24,1 % от максимально возможного) (Таблица 13).

Анализ динамики деструкции показал, что полное разложение 2-ХБ осуществляет штамм *Pseudomonas* sp. PNS4. При этом в среде фиксируется незначительное количество ГОФДК (3,6 мг/л), и не обнаружено хлорбензойной кислоты. Полученные данные позволяют предположить, что штамм PNS4 способен разлагать 2-ХБК. Аналогичное предположение может быть сделано для штаммов *Bosea* sp. PNB7, *Micrococcus* sp. PNS1 и *Starkeya* sp. PNS3. У штамма PNB7 выявлено снижение концентрации 2-ХБК в среде в 2,7 раза, при этом количество разложенного 2-ХБ за тот же отрезок времени, увеличилось на 7 %. Штаммы PNS1 и PNS3 разлагают 80 % 2-ХБ за 2 суток, при этом в среде не зафиксировано накопление ГОФДК, и присутствует незначительное количество 2-ХБК. Высокую деградтивную активность к 2-ХБ проявлял также штамм *Ochrobactrum* sp. PNS5. За двое суток данный штамм разлагал 96,7 % 2-ХБ, при этом в среде отмечено накопление 2-ХБК (5,6 % от максимально возможного).

Уровень деструкции 3-хлорбифенила (3-ХБ) варьировал в пределах 36,2–100 % и в среднем был выше, чем при разложении 2-ХБ, на 20,2 %. Ни у одного из

штаммов не было зафиксировано накопление в среде 9С1-ГОФДК, но присутствовала 3-хлорбензойная кислота (3-ХБК) (Таблица 13).

Наиболее активным деструктором 3-ХБ является штамм *Achromobacter* sp. PNB5. За двое суток данный штамм разлагает 100 % 3-ХБ и более 60 % образующейся 3-ХБК. Способность к разложению 3-ХБК отмечена также для штаммов *Micrococcus* sp. PNS1, *Pseudoxanthomonas* sp. PNS2, *Starkeya* sp. PNS3, *Ochrobactrum* sp. PNS5, *Stenotrophomonas* sp. PNS6, *Bosea* sp. PNB7. При этом высокой деградативной активностью к 3-ХБ обладают штаммы *Starkeya* sp. PNS3, *Microbacterium* sp. PNB4 и *Achromobacter* sp. PNB6.

Скрининг штаммов по деградативной активности к 4-хлорбифенилу (4-ХБ) показал, что 100 %-ную деструкцию субстрата осуществляют штаммы *Mirobacterium* sp. PNB4 и *Brevibacterium* sp. PNB5 (Таблица 13). В культуральной среде обоих штаммов зафиксировано присутствие основных метаболитов: 10С1-ГОФДК (0,225–0,303 о.е.) и 4-хлорбензойной кислоты (4-ХБК). Однако количество 4-ХБК существенно отличалось. При разложении 4-ХБ штаммом PNB4 концентрация 4-ХБК к концу вторых суток достигает 81,1 % от максимально возможного, тогда как в случае штамма PNB5 – 6,8 % от максимально возможного (на 18 часов культивирования концентрация 4-ХБК составляла 8,5 % от максимально возможного). Полученные данные позволяют предположить, что штамм *Brevibacterium* sp. PNB5 осуществляет окисление 4-ХБ до соединений основного обмена клетки. Высокую деградативную активность к 4-ХБ проявляют также штаммы *Starkeya* sp. PNS3, *R. opacus* CH628, *Pseudoxanthomonas* sp. PNS2, *Pseudomonas* sp. PNB3 и *Achromobacter* sp. PNB6 (уровень деструкции 4-ХБ составляет 97,8 %, 96,9 %, 96,7 %, 87,6 % и 80,9 % соответственно). В культуральной среде данных штаммов зафиксировано накопление 4-ХБК (12,6–72,1 мг/л) и ГОФДК (за исключением штаммов *Starkeya* sp. PNS3 и *R. opacus* CH628) (0,221–0,431 о.е.). Следует отметить, что способность к разложению 4-ХБК выявлена также у штаммов *Micrococcus* sp. PNS1, *Pseudomonas* sp. PNS4, *Stenotrophomonas* sp. PNS6 и *Brevibacterium* sp. PNB1.

Таблица 13 – Разложение монохлорбифенилов индивидуальными штаммами

Штамм	Время, ч	2-ХБ			3-ХБ			4-ХБ		
		Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	2-ХБК, мг/л	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	3-ХБК, мг/л	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	4-ХБК, мг/л
PNB1	18	66,5±0,1	0	18,9±0,1	64,1±0,2	0	56,6±0,4	25,7±0,2	0,261	49,1±0,3
	48	76,7±0,1	0	17,3±0,1	74,3±0,2	0	62,7±0,2	58,6±0,1	0,243	43,8±0,4
PNB3	18	28,3±0,2	0	9,5±0,2	47,5±0,3	0	25,7±0,2	78,9±0,2	0,236	45,9±0,2
	48	57,3±0,2	0	18,4±0,3	67,8±0,3	0	55,9±0,1	87,6±0,2	0,221	47,5±0,5
PNB4	18	13,9±0,1	0	5,5±0,2	38,6±0,2	0	66,1±0,2	23,7±0,1	0,225	34,8±0,2
	48	32,3±0,2	0	3,5±0,2	85,6±0,2	0	71,6±0,2	100	0,225	63,7±0,3
PNB5	18	10,7±0,1	0	2,1±0,1	81,5±0,2	0	51,4±0,1	33,9±0,1	0,303	6,7±0,1
	48	17,7±0,1	0	3,2±0,1	100	0	20,2±0,1	100	0,226	5,3±0,2
PNB6	18	21,6±0,1	0	1,9±0,1	68,7±0,3	0	66,4±0,1	21,4±0,2	0,234	49,6±0,1
	48	48,9±0,3	0	2,9±0,2	98,3±0,3	0	68,9±0,1	80,9±0,3	0,237	58,0±0,1
PNB7	18	11,5±0,2	0	5,1±0,2	31,5±0,1	0	25,3±0,2	31,8±0,2	0	45,7±0,3
	48	18,5±0,2	0	1,9±0,1	40,8±0,2	0	33,4±0,3	58,8±0,2	0	48,1±0,2
PNS1	18	68,9±0,1	0	0,3±0,1	26,4±0,1	0	12,7±0,1	49,9±0,1	0	7,1±0,2
	48	80,8±0,1	0	0	51,1±0,3	0	7,7±0,1	60,8±0,2	0	5,1±0,1
PNS2	18	7,3±0,2	0	0,9±0,1	14,6±0,4	0	24,9±0,1	91,9±0,2	0,399	10,5±0,3
	48	22,6±0,1	0	0,8±0,1	36,2±0,3	0	3,4±0,2	96,7±0,3	0,431	12,6±0,2
PNS3	18	7,7±0,1	0	0	57,6±0,2	0	19,2±0,1	90,1±0,4	0	25,5±0,2
	48	80,9±0,2	0	0	82,6±0,2	0	13,3±0,6	97,8±0,5	0	72,1±0,2

Окончание таблицы 13

Штамм	Время, ч	2-ХБ			3-ХБ			4-ХБ		
		Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	2-ХБК, мг/л	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	3-ХБК, мг/л	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	4-ХБК, мг/л
PNS4	18	11,2±0,2	0	0	55,6±0,4	0	8,7±0,1	45,8±0,4	0,276	14,1±0,3
	48	100	0,393	0	75,5±0,3	0	59,1±0,3	65,6±0,2	0,263	12,2±0,2
PNS5	18	58,2±0,1	0	2,7±0,1	27,8±0,2	0	52,5±0,2	16,4±0,2	0,243	28,5±0,2
	48	96,7±0,1	0	4,4±0,2	64,7±0,2	0	17,7±0,2	73,8±0,2	0,231	48,1±0,1
PNS6	18	18,7±0,2	0	0	65,1±0,1	0	55,6±0,1	16,3±0,3	0	6,1±0,5
	48	49,2±0,2	0	0	74,3±0,1	0	51,5±0,5	18,8±0,2	0	1,3±0,3
CH628	24	97,3±0,2	0	0,5±0,1	н.о.	н.о.	н.о.	95,0±0,2	0	0,09±0,02
	48	99,7±0,2	0	0,5±0,1	н.о.	н.о.	н.о.	96,9±0,2	0	0,11±0,03

Примечание. н.о. – не определяли

Стоит отметить, что штамм *Brevibacterium* sp. PNB5, осуществляет за двое суток 100 % разложение 3-ХБ и 4-ХБ, и утилизирует образующиеся в качестве метаболитов хлорбензойные кислоты (Таблица 13).

На основании анализа метаболического профиля можно заключить, что представленные штаммы-деструкторы осуществляют разложение моноклорбифенилов по классическому пути бактериальной трансформации бифенила, а бифенил 2,3-диоксигеназа данных штаммов окисляет незамещенное кольцо молекулы моноклорированных бифенилов (Рисунок 5). Стоит отметить, что при индивидуальном культивировании данные штаммы, за исключением штамма *Brevibacterium* sp. PNB1, проявляют большую активность в отношении *мета*- и *пара*-хлорированных бифенилов, чем в отношении *орто*-хлорбифенила. А штаммы *Micrococcus* sp. PNS1 и *Stenotrophomonas* sp. PNS6, характеризуются уникальной способностью разлагать *орто*-, *мета*- и *пара*-монозамещенные хлорбензойные кислоты.

У 7 штаммов изучена способность осуществлять разложение моноклорированных бифенилов (Рисунок 18). Начальная концентрация субстрата составила 0,5 г/л.

Установлено, что эффективность деструкции зависит от расположения заместителя в молекуле бифенила. В случае, когда гидроксигруппа находилась у 3 углеродного атома молекулы бифенила, наибольшую активность с достижением 96–98 % деструкции проявляли штаммы PNB5 и PNS1, в то время как уровень деструкции 4-гидроксибифенила у данных штаммов составлял 48–58 %. Обратный результат показывает штамм PNB7 (Рисунок 21). Эффективность деструкции 3-гидроксибифенила у данного штамма составляла 7 % за 14 сут., тогда как аналогичный показатель в случае использования в качестве субстрата 4-гидроксибифенила достигал 99 % уже на 3 сутки культивирования. Не проявлял деструктивную активность к 3-гидроксибифенилу штамм PNS5, а к 4-гидроксибифенилу штамм PNB6.

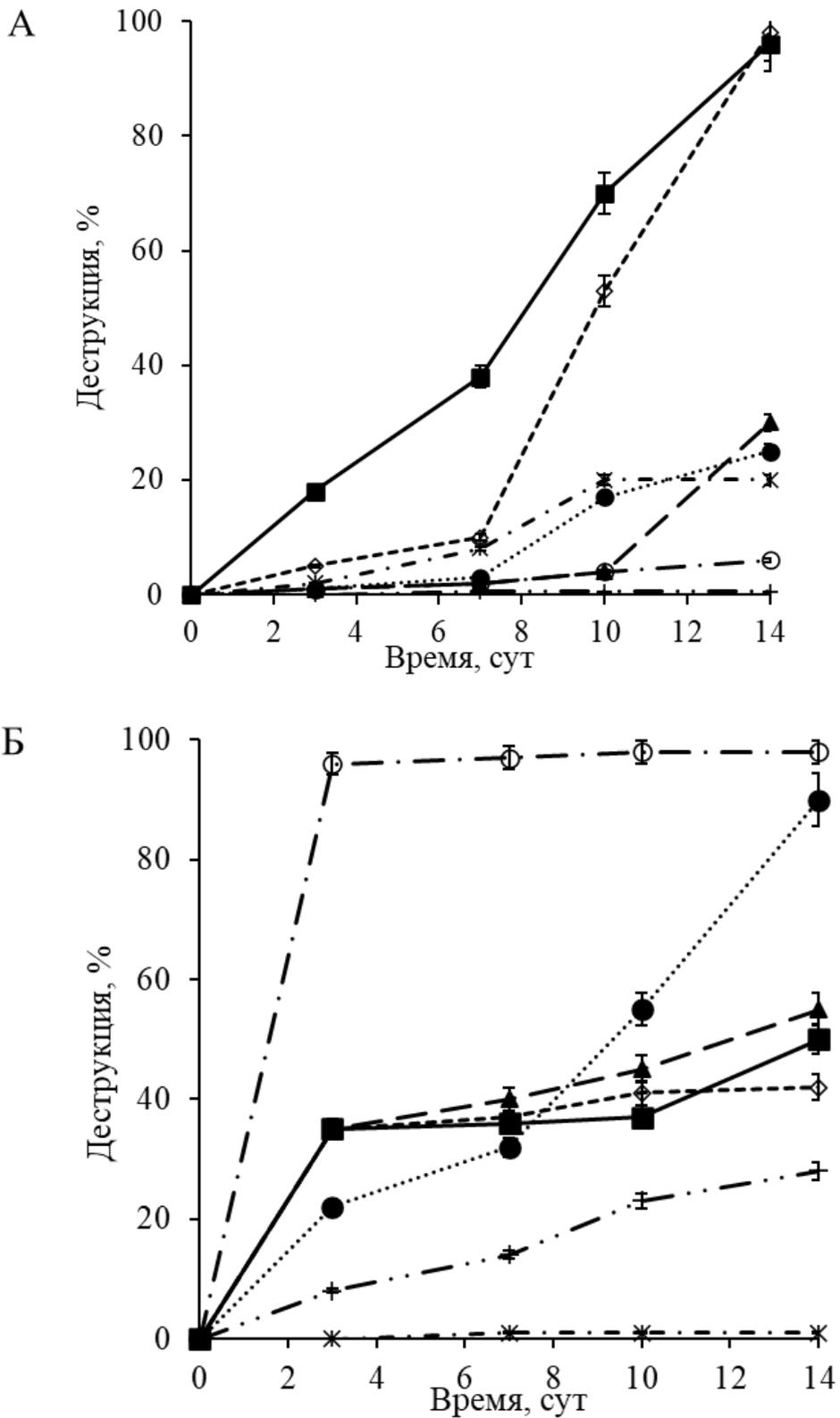


Рисунок 21 – Динамика деструкции 3-гидрокси- (А) и 4-гидрокси-замещенных (Б) бифенилов штаммами *Achromobacter* sp. PNB6 (-*-), *Bosea* sp. PNB7 (-◇-), *Brevibacterium* sp. PNB5 (-■-), *Micrococcus* sp. PNS1 (--◇--), *Ochrobactrum* sp. PNS5 (-+·), *Pseudomonas* sp. PNB3 (-▲-), *Stenotrophomonas* sp. PNS6 (··●··)

Анализ удельной скорости деструкции показал, что штаммы PNS1, PNS6, PNB3, PNB5 и PNB7 осуществляют разложение моногидроксилированных бифенилов в 1,8–65,9 раза быстрее, чем монохлорированных бифенилов (Таблица 14). Можно предположить, что наличие гидроксильного радикала делает молекулу замещенного бифенила более доступной для ферментативных систем исследуемых штаммов. Исключение составляют штаммы *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *Achromobacter* sp. PNB6. Штамм PNS5 осуществлял разложение 3-ХБ, но не 3-гидроксибифенила, а штамм PNB6 не проявлял активности к 4-гидроксибифенилу, тогда как осуществлял деструкцию 4-ХБ.

Таблица 14 – Удельная скорость деструкции (сут⁻¹) моно-замещенных бифенилов

Субстрат	PNS1	PNS5	PNS6	PNB3	PNB5	PNB6	PNB7
3-гидроксибифенил	6,88	0	2,05	2,32	7,01	1,52	0,51
4-гидроксибифенил	3,42	2,21	6,59	4,28	4,17	0	7,13
3-хлорбифенил	0,36	0,16	0,69	0,57	2,27	2,03	0,26
4-хлорбифенил	0,47	0,08	0,10	1,05	2,27	0,82	0,44

Известно, что за деструктивную активность по отношению к ароматическим углеводородам у аэробных бактерий отвечают ферменты классов ди- и монооксигеназ (Sondossi *et al.*, 1991; Francova *et al.*, 2004; Kanteev *et al.*, 2015; Suman *et al.*, 2024). В зависимости от того, какое кольцо молекулы моногидроксибифенила (замещенное или не замещенное) подвергается окислению под действием оксигеназ, в качестве метаболитов образуются бензойная или гидроксибензойные кислоты с последующей их трансформацией до соединений основного обмена клетки. В настоящем исследовании был проведен качественный анализ метаболитов, образующихся при деструкции 3-гидрокси и 4-гидроксибифенилов (Таблица 15).

Таблица 15 – Основные соединения, образующиеся при биодеструкции моногидроксибифенилов

Метаболиты	PNS1	PNS5	PNS6	PNB3	PNB5	PNB6	PNB7
Образуются при бактериальной деструкции 3-гидроксибифенила							
бензойная кислота	–	–	–	–	–	–	–
3-гидроксибензойная кислота	+	-	+	+	+	+	+
катехол	+	–	–	+	–	–	–
Образуются при бактериальной деструкции 4-гидроксибифенила							
бензойная кислота	–	–	–	–	–	–	–
4-гидроксибензойная кислота	+	+	+	+	+	–	+
3,4-дигидрокси бензойная кислота	+	+	+	+	+	–	+
катехол	–	–	–	–	–	–	–

Как видно из полученных результатов, разложение моногидроксибифенилов идет с образованием моногидроксибензойных кислот и их последующим окислением. Бензойная кислота не зарегистрирована ни в одном из вариантов экспериментов. Полученные результаты позволяют предположить, что происходит окисление незамещенного кольца исследуемых гидроксибифенилов (Рисунок 5). Однако, остается открытым вопрос моно- или диоксигеназы участвуют в процессе трансформации гидроксибифенилов у исследуемых штаммов.

Таким образом, все исследованные в настоящей работе штаммы проявляют высокую деградтивную активность к монозамещенным хлор/гидроксибифенилам.

5.2. Бактериальная трансформация ди-замещённых бифенилов

5.2.1 Бактериальная деструкция 2,4'-дихлорбифенила

В результате скрининга установлено, что штаммы, выделенные из бактериальных сообществ PN2-S и PN2-B, осуществляют разложение 2,4'-дихлорбифенила (2,4'-диХБ) на 15,7–78,6 %, что в целом несколько ниже, чем при разложении монохлорбифенилов (Таблицы 13, 16).

Таблица 16 – Показатели биодеструкции 2,4'-дихлорбифенила рассматриваемыми штаммами

Штамм	Время, ч	Деструкция, %	ГОФДК, о.е.	ХБК, мг/л
PNB1	18	0	0	0
	48	0	0	0
PNB3	18	67,7±0,3	0,188	0,11±0,02 (4-ХБК)
	48	78,6±0,2	0	0,09±0,02 (4-ХБК)
PNB4	18	34,8±0,2	0	0
	48	69,4±0,2	0	0
PNB5	18	25,4±0,1	0,183	0,36±0,04 (4-ХБК)
	48	61,9±0,2	0,219	0,05±0,01 (4-ХБК)
PNB6	18	5,2±0,2	0	0,44±0,02 (2-ХБК)
	48	46,5±0,3	0,171	0
PNB7	18	5,7±0,1	0	0,07±0,03 (2-ХБК)
				0,11± 0,02 (4-ХБК)
	48	15,7±0,2	0	0,02±0,01 (2-ХБК)
				0,21±0,01 (4-ХБК)
PNS1	18	33,2±0,2	0,175	0,18±0,01 (4-ХБК)
	48	43,0±0,3	0,244	0,19±0,02 (4-ХБК)
PNS2	18	22,1±0,2	0	0,18±0,01 (4-ХБК)
	48	69,2±0,1	0	0,07±0,01 (4-ХБК)
PNS3	18	20,7±0,2	0	0
	48	47,7±0,3	0,175	0,13±0,01 (4-ХБК)
PNS4	18	10,7±0,1	0	0
	48	54,9±0,4	0	0,34±0,03 (4-ХБК)
PNS5	18	19,6±0,4	0,161	0,13±0,01 (2-ХБК)
				0,10±0,04 (4-ХБК)
	48	71,5±0,2	0,153	0,07±0,01 (2-ХБК)
				0,08±0,02 (4-ХБК)
PNS6	18	5,1±0,2	0,205	0,21±0,02 (4-ХБК)
	48	36,5±0,3	0,349	0,74±0,01 (4-ХБК)
CH628	24	89,7	0,613	3,52±0,04 (2-ХБК)
				7,05± 0,03 (4-ХБК)
	48	99,2	0,612	6,59±0,01 (2-ХБК)
				6,87±0,02 (4-ХБК)

Данная тенденция согласуется с результатами для большинства активных штаммов-деструкторов ПХБ (Gioia *et al.*, 2014; Pori *et al.*, 2008; Murinová and Dercová, 2014; Murinová *et al.*, 2014; Ponce *et al.*, 2011). Штамм *Brevibacterium* sp. PNB1 не проявил деградтивной активности к 2,4'-диХБ (Таблица 16). По-видимому, бифенил диоксигеназа данного штамма обладает активностью только в отношении незамещенного кольца хлорбифенила. Об этом свидетельствует высокий уровень деструкции монохлорированных бифенилов (58,6–76,7 %) с образованием соответствующих хлорбензойных кислот, и отсутствие деструкции 2,4'-диХБ, в молекуле которого заместители представлены в обоих кольцах (Таблицы 13, 16).

Анализ эффективности биодеструкции 2,4'-диХБ штаммом *R. opacus* CH628 показал, что ферментативные системы данного штамма эффективно окисляют как незамещенное, так и моно-замещенное кольцо в молекуле бифенила. Данное предположение подтверждается высоким уровнем деструкции (>99 %) как монохлорированных бифенилов, так и дихлорированного конгенера, содержащего по одному заместителю в каждом ароматическом цикле (Таблицы 13, 16).

Анализ образующихся метаболитов показал, что у большинства исследуемых штаммов бифенил диоксигеназа осуществляла атаку *орто*-хлорированного кольца молекулы 2,4'-диХБ с образованием 4-ХБК. При этом у штамма *Achromobacter* sp. PNB5 отмечено снижение концентрации 4-ХБК в процессе деструкции 2,4'-диХБ, как и при разложении 4-ХБ. Окисление *пара*-хлорированного кольца дихлорбифенила осуществляла бифенил диоксигеназа штамма *Achromobacter* sp. PNB6, с образованием 2-ХБК. При этом зафиксировано снижение концентрации образующейся 2-ХБК, чего не наблюдалось в случае деструкции 2-ХБ. Бифенил диоксигеназы штаммов *Bosea* sp. PNB7, *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *R. opacus* CH628 проявляют окислительную активность к обоим кольцам в молекуле 2,4'-диХБ, в результате чего в среде зафиксировано присутствие 2-хлорбензойной и 4-хлорбензойной кислот. При этом у штаммов PNB7 и PNS5 зафиксировано снижение концентрации 2-ХБК в процессе деструкции 2,4'-диХБ, хотя при разложении 2-ХБ подобное явление отмечено только для штамма *Bosea* sp. PNB7.

Интересным представляется тот факт, что в среде культивирования штамма PNB4, разлагающего 2,4'-диХБ на 69,4 % не обнаружено присутствие ГОФДК и хлорбензойной кислоты. Таким образом не представляется возможным предположить *орто*- или *пара*-хлорированное кольцо молекулы 2,4'-диХБ подвергается окислению.

5.2.2 Бактериальная деструкция 3,4-дихлорбифенила

Особенности биотрансформации 3,4-дихлорбифенила (3,4-диХБ), (заместители располагаются в одном кольце молекулы) изучены на примере штамма *R. oracus* CH628 (ВКМ АС-3029).

Анализ данных показал, что штамм CH628 осуществляет полное разложение 3,4-диХБ за 7 суток культивирования при 30 °С. Основным метаболитом является 3,4-диХБК (Рисунок 22). Начальная концентрация субстрата 0,1 г/л.

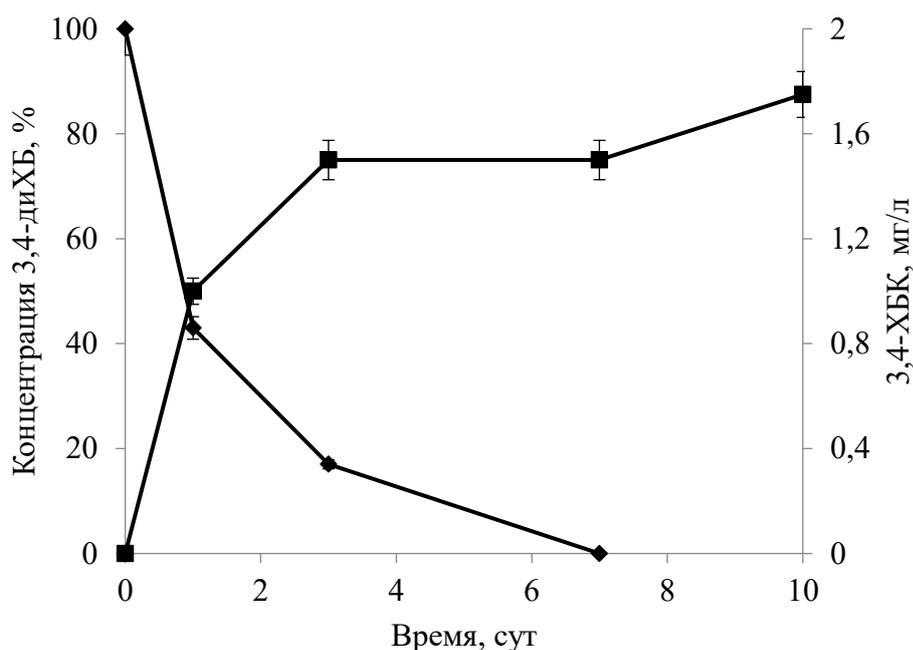


Рисунок 22 – Разложение 3,4-диХБ штаммом *R. oracus* CH628 (—◆—) и образование основного метаболита 3,4-ХБК (—■—)

Известно, что термофильный штамм *Bacillus* sp. JF8 разлагал 3,4-диХБ также через стадию образования 3,4-диХБК (Shimura *et al.*, 1999). Помимо хлорбензойной кислоты, в среде культивирования штамма CH628 была идентифицирована ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 438 нм (ОП=0,120–0,264 о.е.),

что свидетельствовало о расположении атомов хлора в фенольной части молекулы, при этом один из заместителей находится у 9-го углеродного атома (Fortin *et al.*, 2005).

Известно, что низкохлорированные конгенеры ПХБ (количество атомов хлора ≤ 3) в присутствии аэробных микроорганизмов преимущественно подвергаются окислительной деградации под действием ферментов класса диоксигеназ с образованием катехолподобных соединений (Furukawa, Fujihara, 2008).

Очевидно, что для штамма CH628 наиболее удобным структурным фрагментом молекулы 3,4-диХБ для атаки является стерически свободный, незамещенный ароматический цикл (Рисунок 23).

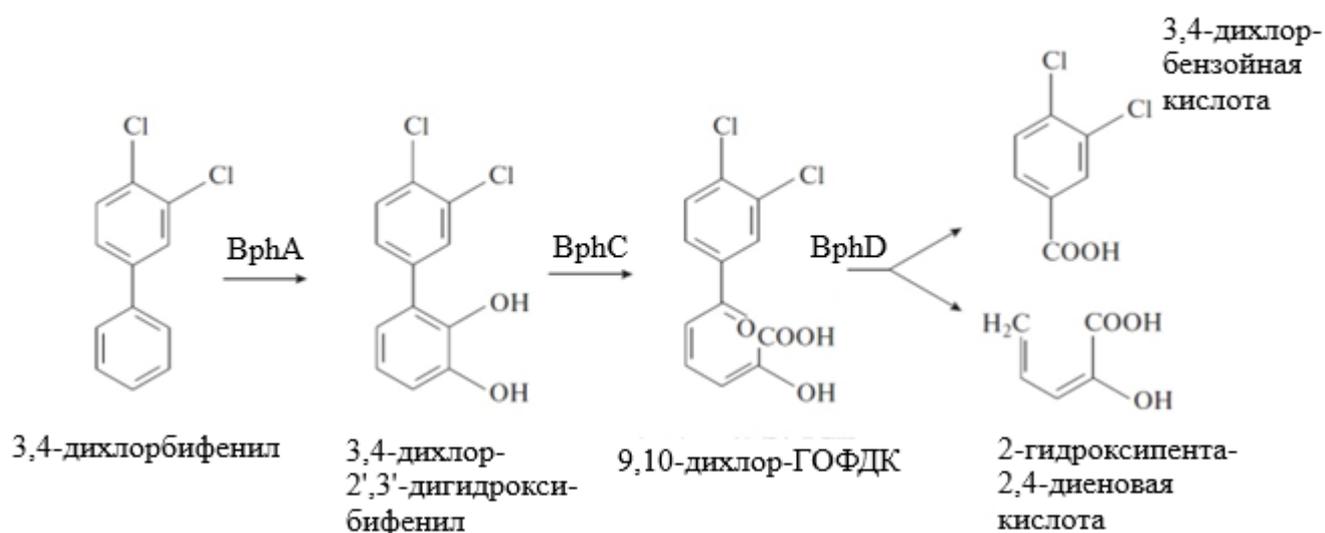


Рисунок 23 – Схема метаболического пути 3,4-дихлорбифенила у штамма *R. oracis* CH628 (Егорова и соавт., 2021)

Окисление 3,4-диХБ в данном случае протекает через стадию дигидроксилирования с образованием 3,4-дихлор-2',3'-дигидроксибифенила. Далее следует стандартный для аэробных бактерий *meta*-распад нехлорированного цикла, и образуется замещенная гидроксиоксофенилгексадиеновая кислота (9,10-диCl-ГОФДК). В результате последующего ферментативного расщепления

9,10-диС1-ГОФДК образуются пентадиеновая и 3,4-дихлорбензойная кислоты (Рисунок 23) (Passatore *et al.*, 2014).

Возможный альтернативный вариант — взаимодействие атомов кислорода под действием бифенил диоксигеназы штамма СН628 по хлорированному циклу — является менее выгодным из-за стерических препятствий. В результате окисления хлорированного кольца 3,4-диХБ образовавшиеся аналоги дихлордигидроксибифенила будут характеризоваться расположением всех заместителей в одном ароматическом кольце, а при *мета*-распаде все заместители будут располагаться в диеноатной части ГОФДК. Последующее гидролитическое расщепление такой молекулы приведет к образованию дихлорпентадиеновой кислоты и бензойной кислоты. Однако в настоящем исследовании бензойная кислота не была выявлена среди метаболитов, образующихся при разложении 3,4-диХБ штаммом *R. oracis* СН628.

Таким образом, накопление в среде 3,4-диХБК (Рисунок 22), но не бензойной кислоты, подтверждает высказанное предположение, что штамм *R. oracis* СН628 осуществляет окисление незамещенного кольца 3,4-диХБ.

5.2.3 Биодеструкция смеси монохлормоногидроксибифенилов

Смесь Р была получена при химической модификации 3,4-диХБ, состоит из монохлормоногидроксизамещенных бифенилов (4-гидрокси-3-хлорбифенила и 3-гидрокси-4-хлорбифенила), несущих заместителей в одном кольце молекулы (содержание данных конгенов в смеси составляет 98,4 %) (раздел 2.1.3).

Время трансформации смеси Р штаммом *R. oracis* СН628 при условиях, аналогичных биодеструкции 3,4-диХБ, увеличивалось (исходная концентрация смеси Р 0,1 г/л) (Рисунок 24).

Штамм *R. oracis* СН628 осуществлял 100 %-ное разложение смеси за 10 суток. Снижение биодegradативной активности может быть обусловлено токсическим эффектом, который оказывают на бактериальные клетки гидроксилированные монохлорбифенилы. Согласно данным (Bhalla *et al.*, 2016), концентрация 4-гидрокси-3-хлорбифенила, при которой наблюдалось 50 %-ное

падение бактериальной люминесценции, составляла 1,15 мг/л, а для 3-гидрокси-4-хлорбифенила данный показатель составлял 6,34 мг/л, что в 7–39 раз меньше, чем аналогичный показатель для негидроксилированных хлорбифенилов. Уровень цитотоксичности 100 мг/л 4-гидрокси-3-хлорбифенила, исследованный на специально подготовленных бактериальных клетках, составлял $33,1 \pm 5,5 \%$ (Mizukami-Murata *et al.*, 2016).

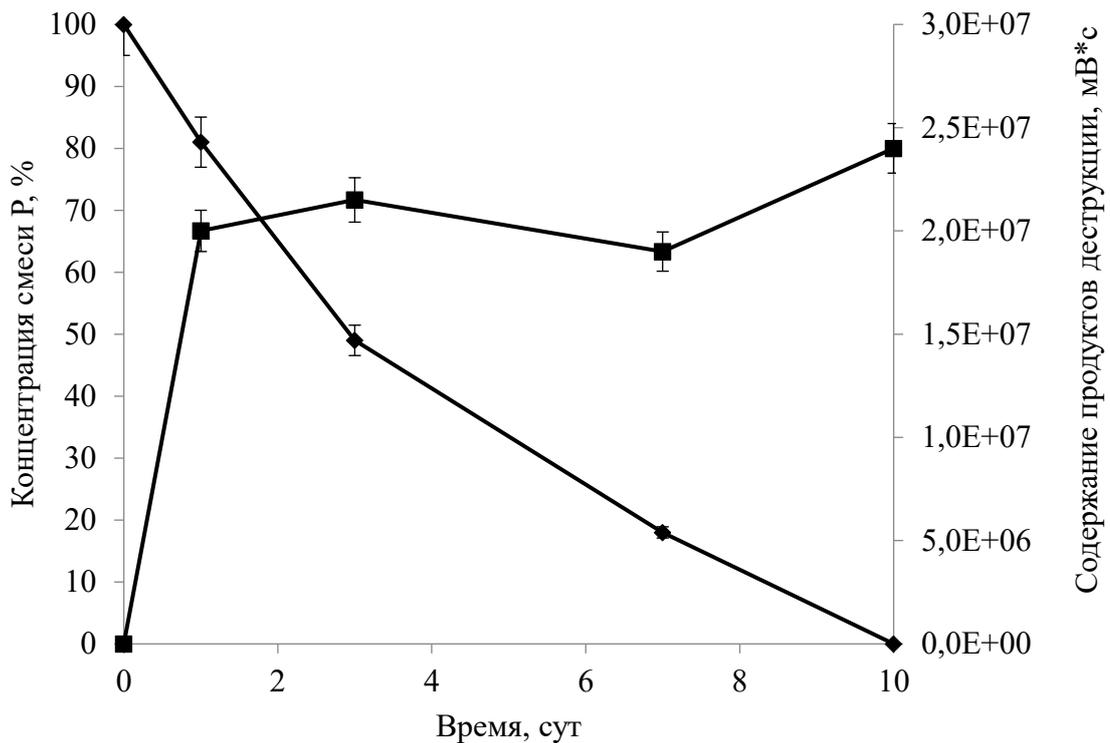


Рисунок 24 – Деструкция смеси Р штаммом *R. oracus* СН628 (—◆—) и накопление хлоргидрокси-замещенных бензойных кислот (—■—)

Следует отметить, что удельная скорость деструкции смеси Р по сравнению с аналогичным показателем для штамма *R. oracus* СН628 при разложении 3,4-диХБ снизилась в 1,2–1,4 раза (Таблица 16). Поскольку основную часть смеси Р составляют гидрохлорбифенилы, то снижение скорости деструкции исследуемой смеси по сравнению с аналогичным показателем при разложении 3,4-диХБ, вероятно, обусловлено токсичностью компонентов смеси.

Таблица 16 – Кинетические параметры разложения 3,4-диХБ и смеси Р штаммом *R. oracus* СН628

Субстрат	Деструкция, %	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	Уравнение деструкции	R ²
3,4-диХБ	100	0,765	$y = 2,0062x^2 - 28,101x + 85,845$	0,908
смесь Р	100	0,691	$y = 0,833x^2 - 18,107x + 99,023$	0,996

Методом ВЭЖХ при биодеструкции смеси Р в культуральной среде штамма *R. oracus* СН628 были зафиксированы 3-ХБК, 4-ХБК и моногидрокси-монохлорбензойные кислоты, но не обнаруживалась бензойная кислота (Рисунок 24). Известно, что основным метаболитом при разложении 4-гидрокси-3-хлорбифенила штаммом *Sphingomonas* sp. N-9 является 4-гидрокси-3-хлорбензойная кислота (Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Спектрофотометрические исследования показали, что при разложении смеси Р отмечалось присутствие нескольких ГОФДК с максимальной длиной волны поглощения при 436 и 418 нм ($ОП_{436} = 0,112-0,134$ о.е., $ОП_{418} = 0,254-0,351$ о.е., соответственно). Известно, что $\lambda_{\text{макс}} = 436$ нм характерна для 9С1-ГОФДК, образующейся при окислении и последующем расщеплении незамещенного цикла молекулы 3-ХБ (Fortin *et al.*, 2005). Полученные данные позволяют предположить, что штамм *R. oracus* СН628 осуществлял окисление компонентов смеси Р (т.е. монохлорбифенилов и моногидрокси-монохлорбифенилов) аналогично 3,4-диХБ по незамещенному циклу молекулы (Рисунок 23).

Таким образом, установлено, что исследованные штаммы проявляют деструктивную активность к дихлорированным и моногидрокси-монохлорированным бифенилам, несущим заместителей как в одном кольце молекулы, так и в обоих кольцах бифенильного каркаса. Первичная оксигеназная атака осуществляется предпочтительно по двум вицинальным углеродным атомам

в незамещенном ароматическом цикле молекулы бифенила. В случае, когда незамещенный ароматический цикл отсутствует, окисление дихлорированного бифенила было также отмечено у всех штаммов, за исключением *Brevibacterium* sp. PNB1.

5.3. Разложение три-замещённых бифенилов штаммом

Rhodococcus opacus CN628

Изучение возможности биодеструкции бифенила, несущего три заместителя в молекуле (хлор- и/или гидроксигруппы) проводили с использованием в качестве модельных соединений 2,4,5-трихлорбифенил (2,4,5-триХБ) и 2,4,6-трихлорбифенил (2,4,6-триХБ), а также полученных на их основе смесей моногидроксидихлорбифенилов М1 и М2 (состав представлен в разделе 2.1.3). Исходная концентрация трихлорированных бифенилов, смесей М1 и М2 составляла 0,1 г/л.

Установлено, что штамм *R. opacus* CN628 проявляет биодеградативную активность как к 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ, так и к смесям М1 и М2 (Рисунок 25). Анализ данных по биотрансформации конгенов трихлорбифенилов показал, что штамм CN628 осуществляет полное разрушение 2,4,6-триХБ за 14 дней. Для 2,4,5-триХБ период биодеградации составил 10 дней.

Низкохлорированные конгены ПХБ (число атомов хлора ≤ 3) в присутствии аэробных микроорганизмов подвергаются преимущественно окислительной деградации под действием ферментов класса оксигеназ с образованием катехолоподобных соединений (Furukawa, Fujiihara, 2008). Для конгенов 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ наилучшим структурным фрагментом для атаки штамма CN628 является незамещенное ароматическое кольцо (Рисунок 26). Окисление исходных конгенов происходит через стадию дигидроксилирования с образованием структур, которые затем подвергаются ароматизации с выделением двух протонов ($2H^+$), образуя диолы. Далее происходит стандартное для аэробных бактерий *мета*-расщепление незамещенного кольца и образование замещенных гексадиеновых кислот (ГОФДК).

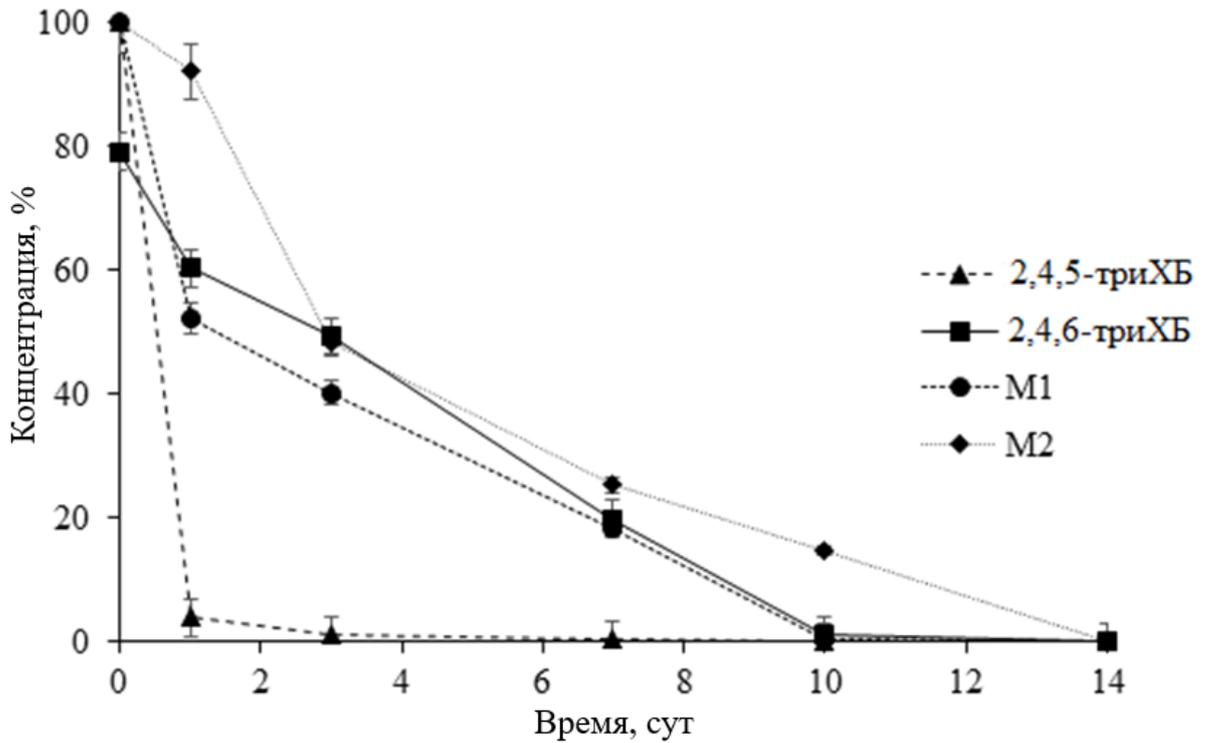


Рисунок 25 – Деградация трихлорированных бифенилов и смесей моногидрокси-дихлорбифенилов штаммом *R. oracus* CH628

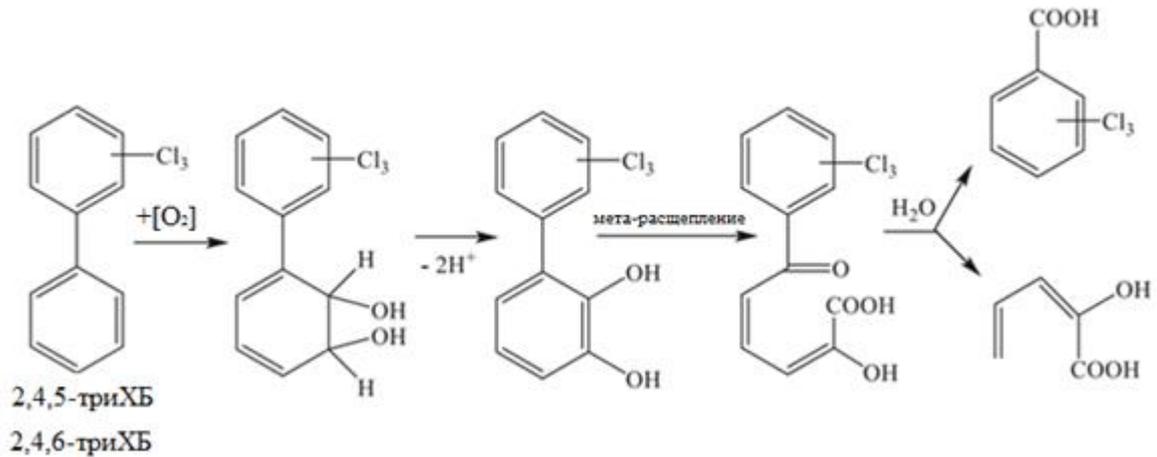


Рисунок 26 – Метаболический путь окислительной биodeградации трихлорбифенилов штаммом *R. oracus* CH628 (Gorbunova *et al.*, 2021)

Дальнейшее расщепление ГОФДК-кислот связано с действием фермента гидролазы, что приводит к образованию пентадиеновой кислоты и трихлорбензойной кислоты (Passatore *et al.*, 2014) (Рисунок 26).

Методом ВЭЖХ были выявлены основные метаболиты 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ: 2,4,5-трихлорбензойная (2,4,5-ХБК) и 2,4,6-трихлорбензойная (2,4,6-ХБК)

кислоты соответственно (Рисунок 27). Полученные данные подтверждают, что штамм СН628 осуществляет биodeградацию рассматриваемых конгенов трихлорбифенилов по классическому пути аэробного окисления ПХБ (Рисунки 26, 27).

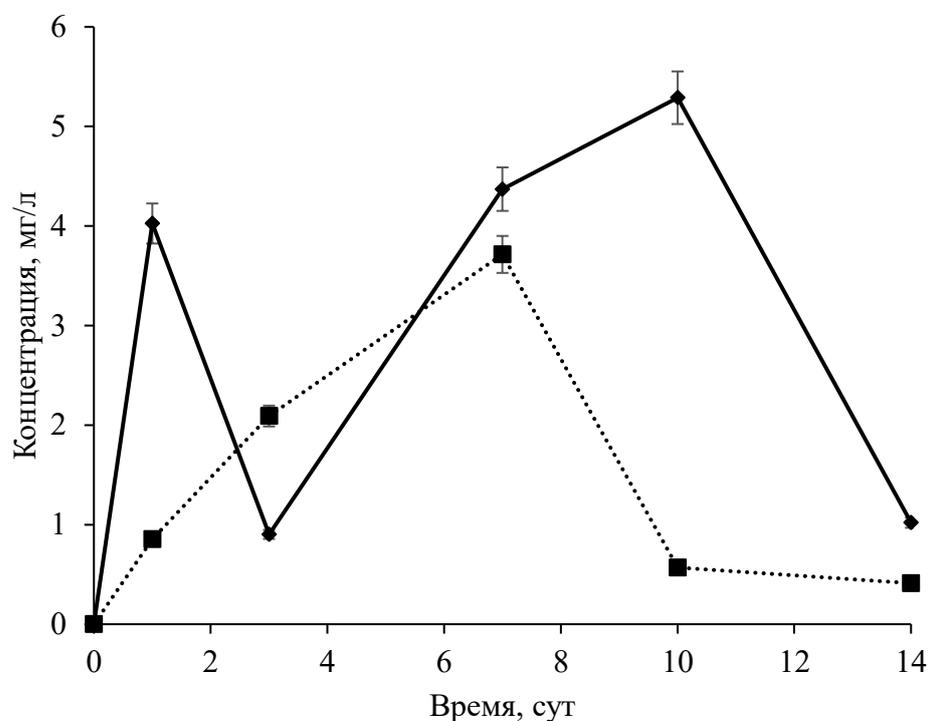


Рисунок 27 – Основные продукты разложения 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ штаммом *R. oracus* СН628: 2,4,5-ХБК (—◆—) и 2,4,6-ХБК (…■…)

Различие во времени биodeградации 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ вероятно связано с химической структурой как исходных конгенов, так и их метаболитов. Первая стадия окисления незамещённого кольца рассматриваемых конгенов скорее всего не отличается по времени протекания. Различия вероятно возникают на последующих стадиях, связанных с процессами ароматизации, *мета*-расщепления и расщепления ГОФДК. Можно предположить, что симметричное расположение трех атомов хлора обеспечивает большую стабильность 2,4,6-триХБ и его производных по сравнению с 2,4,5-триХБ и его производными. Это подтверждается результатами спектрофотометрии: при биodeградации 2,4,6-триХБ штаммом СН628 временное накопление ГОФДК в

среде обнаруживается при длине волны 392 нм, ОП = 0,217–0,477. Накопление ГОФДК в среде при разрушении 2,4,5-триХБ не наблюдалось.

При изучении биодegradации смесей М1 и М2 было установлено, что полное разложение обеих смесей штаммом СН628 происходит за 14 суток (Рисунок 25). По всей видимости, появление гидроксигруппы вместо атома хлора привело к снижению доступности молекул химически модифицированного 2,4,5-триХБ для ферментативных систем штамма СН628, либо к проявлению токсического эффекта (Sondossi *et al.*, 1991; Camara *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006; Tehrani *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Bhalla *et al.*, 2016). Что касается смеси М2, такой вывод не является релевантным, поскольку 2,4,6-триХБ и его гидроксипроизводные имеют одинаковое время биодegradации (14 дней).

На основании данных, представленных в работе Bhalla *et al.* (2016), можно сделать вывод, что присутствие заместителей в положениях {2-ОН + 5-Cl}, {4-ОН + 5-Cl} и {3-ОН + 4-Cl} в молекуле бифенила вызывает большую токсичность, чем присутствие заместителей в положениях {2-ОН + 4-Cl} и {4-ОН + 2-Cl}, независимо от наличия других заместителей. Для первой группы ЕС₅₀ варьируется в пределах 0,34–6,34 мг/л; для второй группы ЕС₅₀ составляет 0,07–0,09 мг/л. Вероятно, появление НО-группы в положении 2 или положении 4 в молекуле 2,4,6-триХБ при гидроксировании не увеличивает уровень токсичности молекулы для штаммов, представленных в исследовании. Это приводит к тому, что время дegradации смеси М2 остается на уровне времени дegradации 2,4,6-триХБ.

Метаболиты смесей М1 и М2 не показывают принципиальных различий от метаболитов 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ (Рисунок 28). Анализ ВЭЖХ смесей М1 и М2 при длине волны 232 нм в УФ-диапазоне не показал пиков, характерных для полихлорбензойных кислот. Однако анализ обеих смесей при длине волны 205 нм выявил пики, соответствующие двум веществам с временами удерживания 12,6 и 14,1 мин. Этот диапазон времени удерживания соответствует гидроксиполихлорбензойным кислотам. Таким образом, было установлено, что под действием бактериального штамма СН628 метаболиты для обеих смесей М1 и М2 представляют собой гидроксидихлорбензойные кислоты. Полученные данные

указывают на схожий путь биodeградации для компонентов смесей М1 и М2 по сравнению с исходными конгенерами 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ.

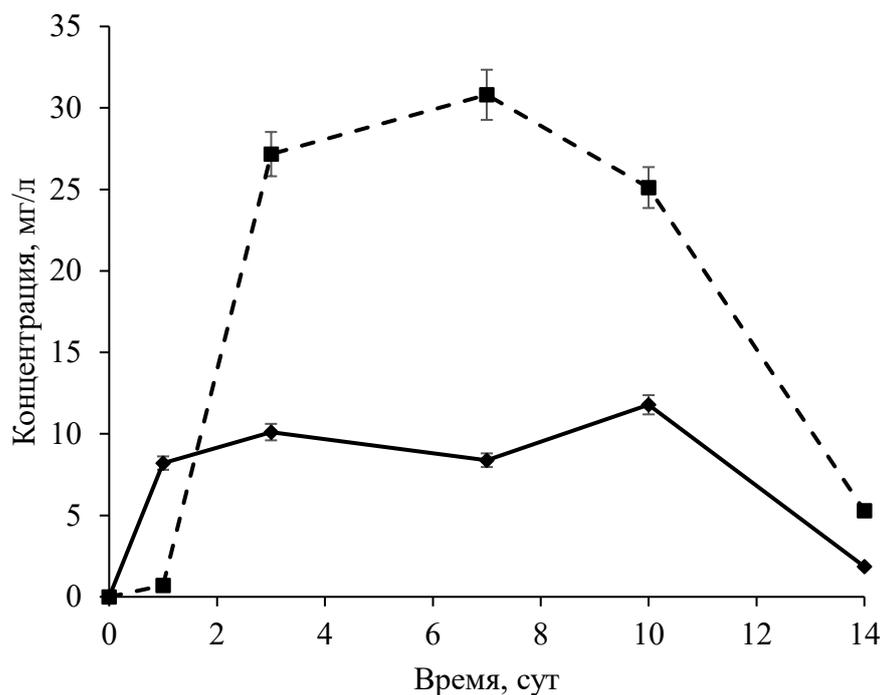


Рисунок 28 – Концентрации гидрокси-дихлорбензойных кислот в зависимости от времени биodeградации смеси М1 (—●—) и М2 (---■---) штаммом *R. oracis* SN628

Таким образом, штамм *R. oracis* SN628 эффективно разлагает трихлорированные бифенилы, и полученные на их основе моногидрокси-дихлорированные бифенилы. При этом установлено, что трансформация осуществляется по «верхнему» бифенильному пути с первоначальной диоксигеназной атакой незамещенного кольца бифенильного каркаса молекулы.

5.4 Разложение тетра-замещённого бифенила и полученной в результате его химической модификации смеси гидрокси-производных

Основываясь на данных о высокой биodeградативной активности штамма *R. oracis* SN628 к моно, ди- и три-замещенным хлор- и гидрокси-бифенилам, была изучена его активность по отношению к 2,5,3',4'-тетрахлоробифенилу (2,5,3',4'-тетраХБ) и смеси гидрокси- и дигидрокси(ди-три)хлорбифенилов

(смесь Т) (состав смеси представлен в разделе 2.1.3), полученных в результате химической модификацией данного конгенера.

Установлено, что штамм *R. oracus* СН628 осуществляет разложение 2,5,3',4'-тетраХБ за 10 дней, тогда как разрушение смеси Т занимает 14 дней (Рисунок 29). Начальная концентрация каждого субстрата составляла 0,25 г/л.

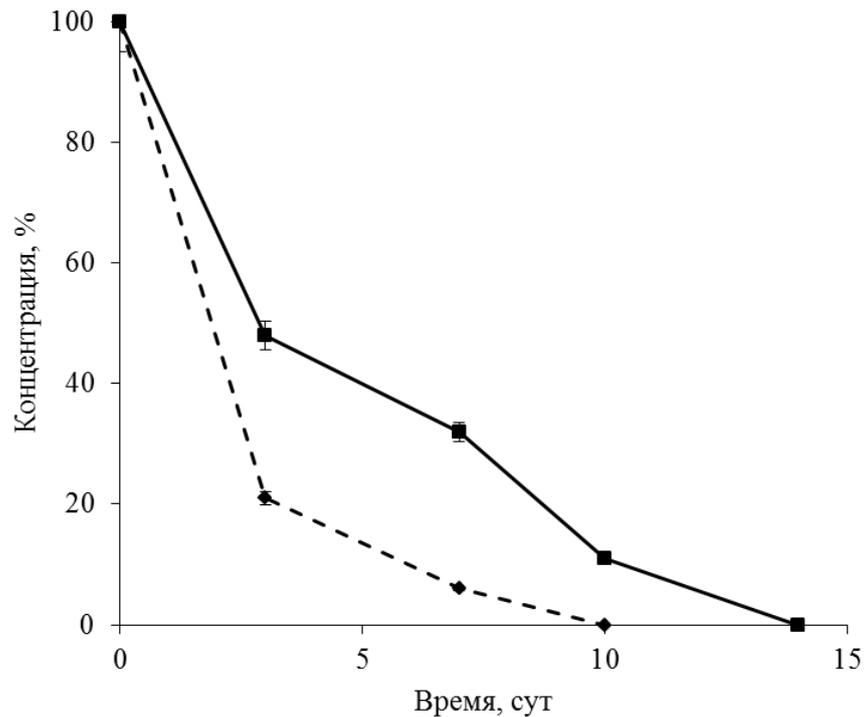


Рисунок 29 – Изменение концентрации 2,5,3',4'-тетраХБ (—♦—) и смеси Т (—■—) в процессе разложения штаммом *R. oracus* СН628

Расчёты показали, что эффективность разрушения 2,5,3',4'-тетраХБ на 1 г клеток штамма СН628 составила 90 мг ПХБ/день, а для смеси гидроксипроизводных 2,5,3',4'-тетраХБ этот показатель равен 56 мг ПХБ/день. Также было установлено, что штамм СН628 разлагает все соединения, входящие в смесь Т. При этом наиболее активный процесс дегградации наблюдается в первые 3 дня эксперимента. Удельная скорость деструкции компонентов смеси Т составила: для гидрокси-трихлорбифенилов — 0,303 день⁻¹, для гидрокси-дихлорбифенилов — 0,309 день⁻¹ и для дигидрокси-дихлорбифенилов — 0,725 день⁻¹.

В результате исследований не было обнаружено накопления токсичных соединений, являющихся продуктами аэробного бактериального разложения

2,5,3',4'-тетраХБ и смеси Т. Данные, полученные при анализе образующихся метаболитов, не позволили определить по какому кольцу молекулы 2,5,3',4'-тетраХБ происходит первичное окисление.

На основе анализа изменения оптической плотности культуры штамма *R. oracis* СН628 при культивировании в минеральной среде с 2,5,3',4' тетраХБ (1) и смесью Т (2) в качестве источника углерода получены уравнения, описывающие данный процесс:

$$A = 0,0009x^2 - 0,0145x + 0,5553, R^2 = 0,977 \quad (1)$$

$$A = 0,0011x^2 - 0,0187x + 0,5526, R^2 = 0,984 \quad (2)$$

Из полученных уравнений видно, что при культивировании штамма *R. oracis* СН628 на смеси Т плотность планктонной культуры уменьшается быстрее, чем при использовании в качестве субстрата 2,5,3',4'-тетраХБ. Этот факт может быть связан с потенциально большей токсичностью гидроксипроизводных хлорбифенилов для аэробных бактериальных клеток (Tehrani, Van Aken, 2014; Passatore *et al.*, 2014).

Таким образом, штамм *R. oracis* СН628 проявляет высокую деградтивную активность к тетрахлорбифенилу и полученным на его основе гидроксированным хлорбифенилам.

5.5 Разложение коммерческих смесей ПХБ и полученных на их основе смесей гидрокси-хлорбифенилов

5.5.1 Биодеградация Трихлорбифенила и Совола.

В Таблице 17 представлены результаты по биоразложению коммерческих смесей ПХБ торговых марок Трихлорбифенил и Совол бактериальным штаммом *R. oracis* СН628. Начальная концентрация каждой смеси составила 0,6 г/л.

Анализ полученных данных показывает, что штамм СН628 успешно биоутилизирует смесь Трихлорбифенил за 10 суток. Тогда как его активность в отношении смеси Совол значительно ниже. Вероятно, существенную роль в биодоступности смесей ПХБ играет соотношение в их составе низко-, средне- и

высоко-хлорированных групп конгенов хлорбифенилов. Преобладающей группой конгенов в составе Трихлорбифенила являются три- и тетра-хлорированные бифенилы, тогда как в составе Совола основная доля приходится на пента- и гекса-хлорбифенилы (Kirichenko *et al.*, 2000, Первова и соавт., 2015).

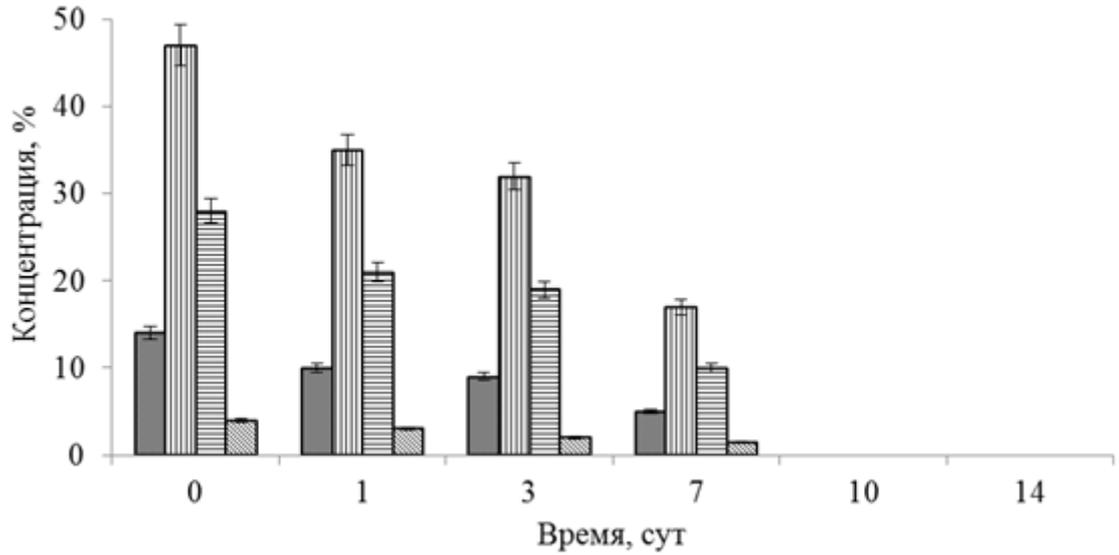
Таблица 17 – **Эффективность трансформации коммерческих смесей ПХБ штаммом *R. oracus* СН628**

Время, сут	Количество смеси ПХБ после биодеструкции, %	
	Трихлорбифенил	Совол
0	100	100
1	74,9	89,6
3	70,2	88,5
7	34,9	39,2
10	0	13,8
14	0	2,2
Удельная скорость деструкции (сут ⁻¹)	0,921	0,273

Представленные на рисунке 30 данные показывают, что все группы конгенов ПХБ смеси Трихлорбифенил (от ди- до пентахлорбифенилов) эффективно разлагаются под действием штамма *R. oracus* СН628.

Для конгенов ПХБ смеси Совол процесс биоутилизации является более сложным. Полная деструкция трихлорбифенилов и гептахлорбифенилов происходит за 10 суток эксперимента. Однако учитывая, что содержание три- и гептахлорбифенилов в составе смеси Совол находится на уровне 1 % (Kirichenko *et al.*, 2000), процесс их деградации не является определяющим для скорости утилизации всей коммерческой смеси.

А



Б

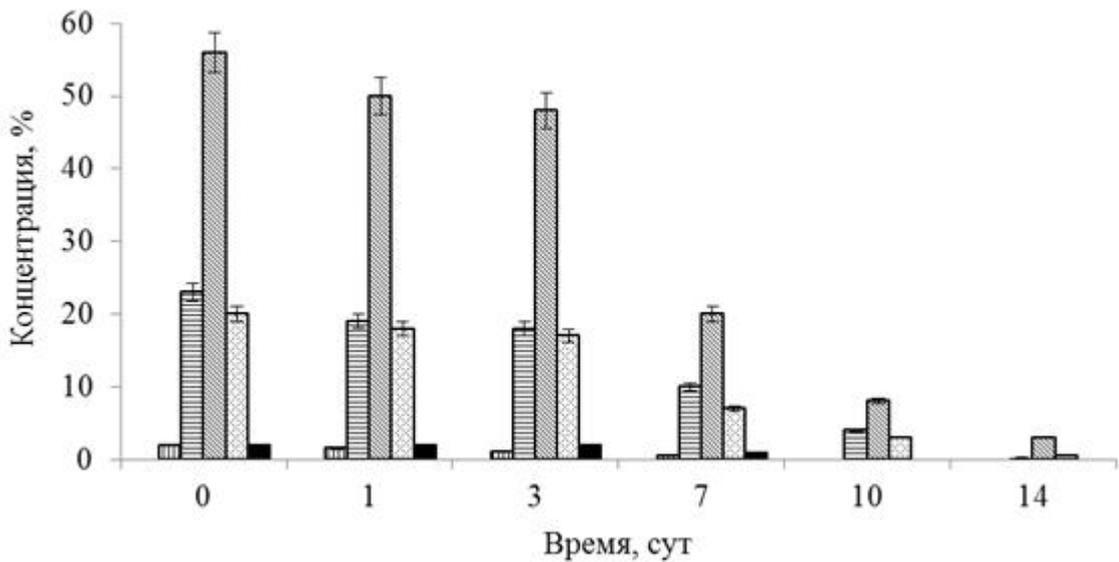


Рисунок 30 – Концентрация конгенерных групп ПХБ, входящих в состав Трихлорбифенила (А) и Совола (Б) в процессе деструкции штаммом *R. oracis* СН628: дихлорбифенилы (■), трихлорбифенилы (▨), тетрахлорбифенилы (▩), пентахлорбифенилы (▧), гексахлорбифенилы (▤), гептахлорбифенилы (■)

Деструкцию тетрахлорированных бифенилов в составе Совола штамм СН628 осуществляет за 14 суток на 99 %. Полученные ранее результаты по деструкции 2,5,3',4'-тетраХБ позволяли предположить большую эффективность биодegradации

данной группы конгенов штаммом СН628. По всей видимости, присутствие нескольких тетрахлорированных конгенов негативно повлияло на активность штамма *R. oracis* СН628. Остаточное содержание пента- и гексахлорбифенилов к 14 суткам составило 2–4 % от начальной концентрации. При этом известно, что пентахлорбифенилы составляют 50 % состава конгенов смеси Совол, а на долю гексахлорированных бифенилов приходится 20 % от общего содержания. Известно, что чем более хлорированы конгенеры, тем ниже их доступность для биодеструкции (Liu *et al.*, 2012). Удельная скорость деструкции Совола штаммом СН628 была в 3,4 раза ниже, чем аналогичный показатель при деструкции Трихлорбифенила, а эффективность деструкции за 10 суток составила для Трихлорбифенила 100 %, а для Совола – 86,3 % (Таблица 17). Причина такого результата, очевидно, обусловлена конгенерным составом коммерческих смесей ПХБ.

5.5.2 Биодegradация смеси М3, полученной в результате химической модификации смеси ПХБ марки Трихлорбифенил

Данные, представленные на рисунке 31, показывают, что штамм *R. oracis* СН628 полностью разрушает все компоненты смеси М3 (0,1 г/л) (состав представлен в разделе 2.1.3) за 14 дней. В связи с соэлюированием многих компонентов деградированной смеси невозможно предоставить более подробную информацию о скорости биодegradации отдельных гидрокси-ПХБ и конгенов ПХБ из смеси М3 под действием бактериального штамма.

Появление в составе конгенов гидрокси-группы, снижает скорость деструкции данной смеси штаммом *R. oracis* СН628, по сравнению с аналогичным показателем в случае, когда субстратом деструкции является Трихлорбифенил.

ВЭЖХ-анализ культуральной среды показал, что основными продуктами биодegradации смеси М3 являются хлорбензойные и гидрокси-хлорбензойные кислоты (Рисунок 31).

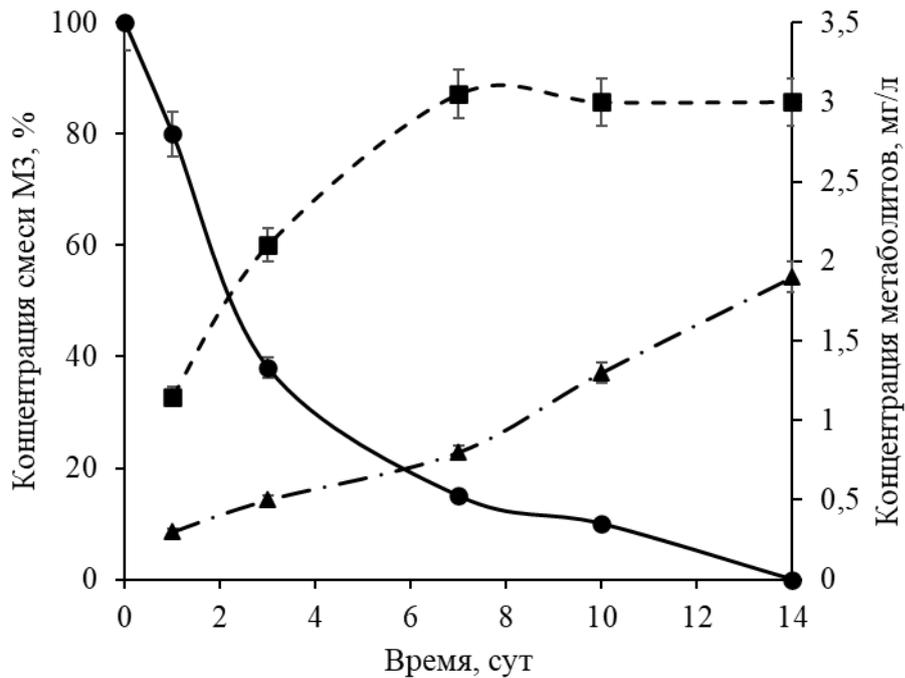


Рисунок 31 – Динамика процесса деструкции смеси МЗ (—●—) и образования основных метаболитов (хлорбензойные кислоты (—■—), гидрокси-хлорбензойные кислоты (—▼—)) с использованием штамма *R. oracis* SN628

Хлорбензойные кислоты, содержащие более 2 атомов хлора в молекуле, детектировали при длине волны 232 нм в ультрафиолетовом диапазоне, а гидрокси-хлорбензойные кислоты – при длине волны 205 нм. Было зафиксировано шесть пиков хлорбензойных кислот, и восемь пиков гидрокси-хлорбензойных кислот. Количественный анализ показал, что хлорбензойных кислот в среде накапливалось больше, чем гидрокси-производных. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что штамм SN628 активно разлагает как ПХБ, так и гидрокси-производные ПХБ. Однако, поскольку доля гидрокси-ПХБ в смеси МЗ больше, чем доля непрореагировавших ПХБ, вклад гидрокси-хлорбензойных кислот как метаболитов также должен быть значительным. Тем не менее, анализ показал, что общее содержание гидрокси-хлорбензойных кислот было ниже, чем общее содержание хлорбензойных кислот. Этот факт позволяет предположить, что штамм SN628 является эффективным деструктором гидроксилированных хлорбензойных кислот.

Также было установлено, что процесс биodeградации смеси МЗ сопровождался высвобождением атомов хлора в среду - до 2,2 % от максимально возможного количества.

С учетом полученных результатов исследования, а также с учетом ранее полученных данных (Tehrani *et al.*, 2012; Mizukami-Murata *et al.*, 2016; Plotnikova *et al.*, 2012), можно сделать вывод, что штамм *R. oracus* СН628 эффективно разлагает все компоненты смеси МЗ, при этом образующиеся хлор- и гидроксихлорбензойные кислоты не являются конечными метаболитами, а трансформируются до соединений основного обмена клетки.

5.5.3 Биodeградация смесей G1, G2 и G3, полученных в результате химической модификации смеси ПХБ марки Совол

Способность штамма *R. oracus* СН628 разлагать смеси G1, G2 и G3, содержащие в составе гидроксированные производные ПХБ (0,1 г/л) (состав представлен в разделе 2.1.3), изучали при культивировании штамма в минеральной среде К1 с соответствующей смесью G без внесения дополнительных источников углерода (Рисунок 32).

Наиболее активно убыль смесей G в большинстве случаев протекала в первые трое суток. Эффективность деструкции исследуемых смесей за 14 суток составила: смесь G1 – 100 %; смесь G2 – 98,6 %; смесь G3 – 95,5 %.

Установлено, что удельная скорость деструкции исследуемых смесей находилась в линейной корреляционной зависимости от содержания гидроксипроизводных в составе смеси. Штамм СН628 более эффективно разлагал смеси с большим содержанием гидроксипроизводных.

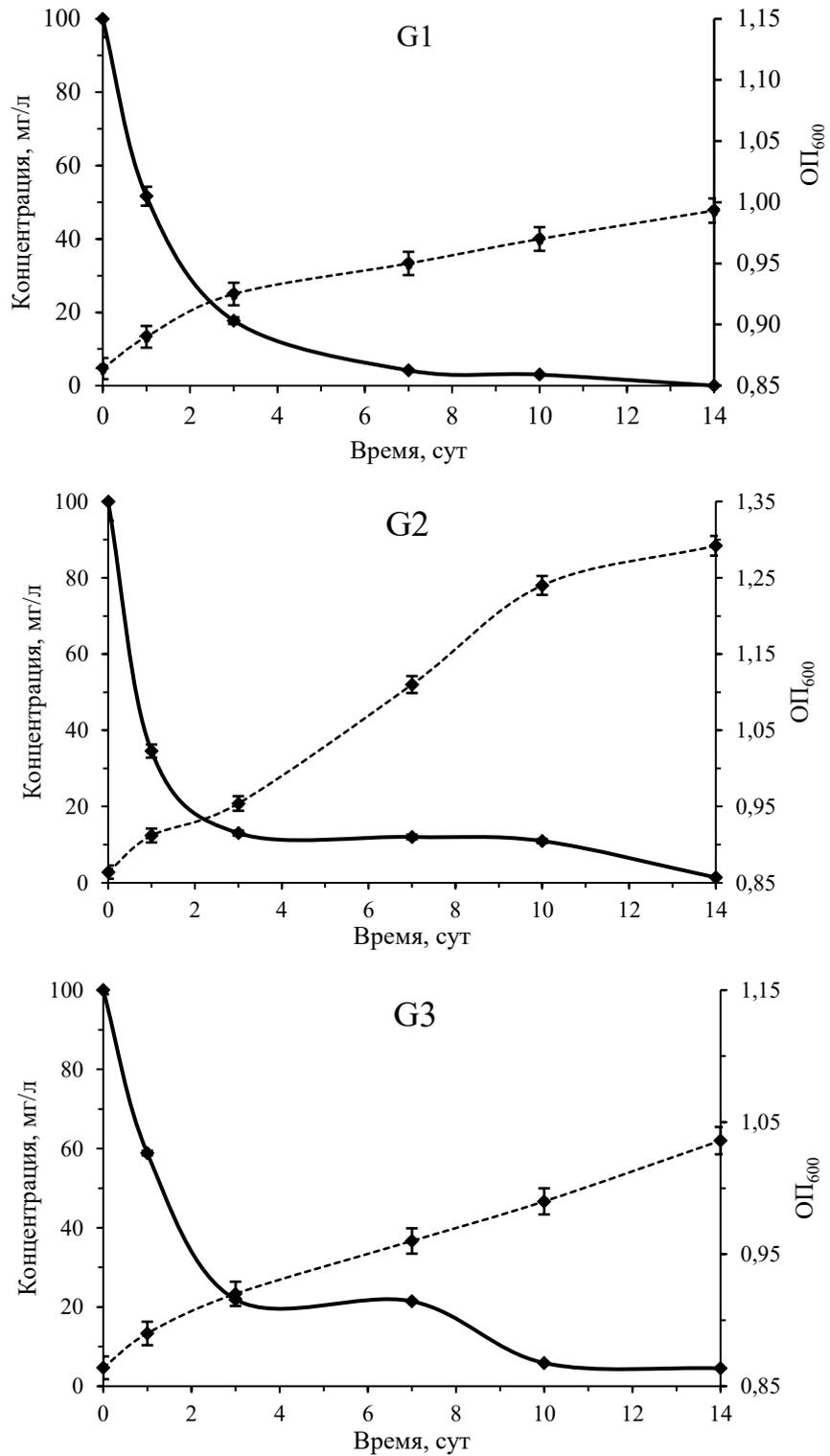


Рисунок 32 – Динамика деструкции смесей G1, G2 и G3 (—◆—) в процессе роста штамма *R. oracus* CH628 (---◆---)

Показано, что основными продуктами биодеструкции смесей G1, G2 и G3 являются хлорированные и гидроксированные бензойные кислоты (Таблица 18).

Таблица 18 – Метаболиты, образующиеся при разложении смесей G1, G2 и G3 штаммом *R. oracus* CH628

Смесь	Время, сут	ХБК, мг/л	Гидрокси-БК, мг/л	Катехол, мг/л	СГ	
					мг/л	% от максимально возможного
G1	1	12,18±0,02	4,78±0,01	1,16±0,04	1,08±0,01	2,89
	3	11,99±0,01	18,16±0,01	1,19±0,02	1,68±0,02	4,51
	7	9,58±0,01	24,33±0,01	1,09±0,01	11,37±0,04	30,43
G2	1	8,73±0,03	5,78±0,03	1,21±0,03	0,66±0,03	1,54
	3	9,59±0,02	28,05±0,02	0,98±0,04	1,04±0,02	2,42
	7	10,33±0,03	26,96±0,05	0,91±0,02	1,19±0,01	2,77
G3	1	8,84±0,04	15,76±0,02	0,71±0,01	0,71±0,01	1,72
	3	8,64±0,01	24,03±0,01	1,04±0,01	1,05±0,02	2,53
	7	4,35±0,03	33,90±0,02	1,66±0,01	0,92±0,02	2,22

Концентрация ХБК и гидрокси-БК в среде колебалась в процессе разложения смесей данным штаммом, и не имела зависимости от времени деструкции и вида исходной смеси. Известно, что ряд хлорбензойных кислот являются конечными продуктами трансформации ПХБ у штаммов-деструкторов. Отсутствие корреляционной зависимости количества ХБК и гидрокси-БК в среде от количества трансформированной исходной смеси гидроксилированных полихлорбифенилов позволяет предположить, что данные соединения не являются конечными для штамма CH628 и подвергаются дальнейшей трансформации.

Одним из возможных продуктов метаболизма хлорбензойных кислот является катехол или его хлорированные производные. В настоящем исследовании обнаружено наличие (хлор)катехолов в среде (Таблица 18). Стоит отметить, что данные соединения аккумулируются в низкой концентрации. Корреляционных связей между изменением концентрации хлор- и гидроксибензойных кислот в среде культивирования и концентрацией (хлор)катехолов не выявлено. Вероятно, это обусловлено разной эффективностью работы ферментативных систем штамма CH628, ответственных за разложение кислот и катехолов. Также одной из причин

отсутствия закономерностей может являться присутствие сразу нескольких ХБК и гидрокси-БК, как продуктов разложения разных гидроксиполихлорбифенилов.

Кроме того в среде культивирования было зафиксировано накопление свободных ионов хлора (Таблица 18). Отщепление хлора может происходить на двух этапах трансформации смесей G: либо при окислении хлорированных атомов углерода в молекуле гидрокси-ПХБ, либо при последующем окислении хлорбензойной кислоты и/или хлоркатехола. Разделить эти два процесса в настоящем исследовании не представлялось возможным.

Таким образом, трансформация смесей гидроксилированных полихлорбифенилов штаммом *R. oracis* CH628 происходит с образованием метаболитов, соответствующих классическому пути биодеструкции бифенила/ПХБ.

Глава 6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ХЛОР- И ГИДРОКСИ- БИФЕНИЛОВ

6.1. Внехромосомные элементы

Известно, что гены, обуславливающие деструкцию ПХБ у аэробных бактериальных штаммов, могут располагаться как на хромосоме, так и на внехромосомных элементах бактериального генома (Bhatt *et al.*, 2021).

С помощью метода пульс-электрофореза было изучено наличие плазмид большой молекулярной массы у штаммов, выделенных в рамках настоящего исследования (Рисунок 33).

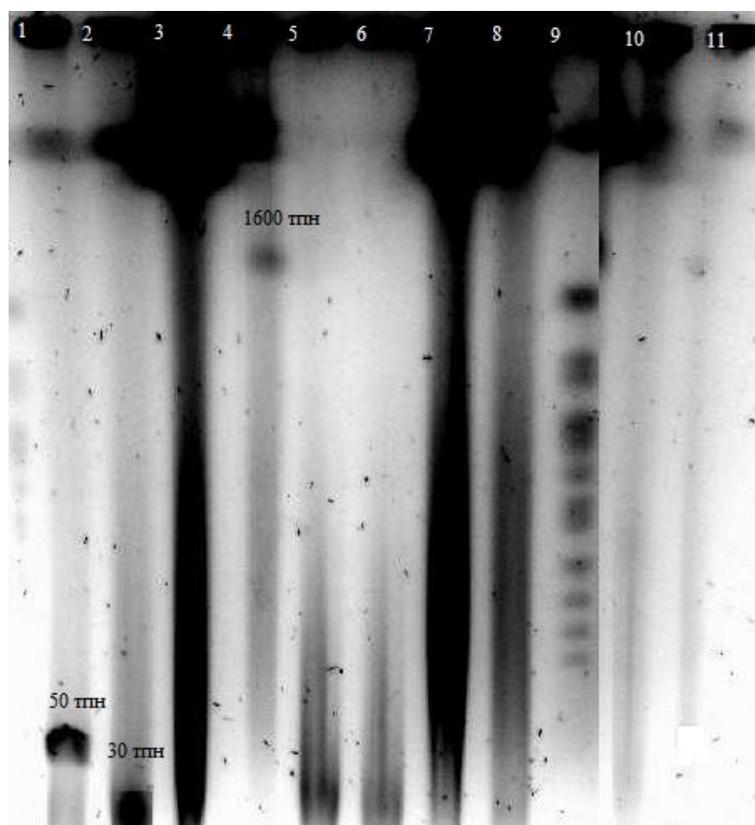


Рисунок 33 – Электрофореграмма плазмидных ДНК исследуемых штаммов: **1** – штамм PNS1, **2** – штамм PNS3, **3** – штамм PNS4, **4** – штамм PNS5, **5** – штамм PNS2, **6** – штамм PNS6, **7** – штамм PNB7, **8** – штамм PNB6, **9** – маркер молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США), **10** – штамм PNB5, **11** – штамм PNB4

Как видно из электрофореграммы, в штамме PNS5 присутствует внехромосомная ДНК размером около 1600 т.п.н., в штамме PNS1 обнаружена плазида размером около 50 т.п.н., в штамме PNS3 – плазида размером 30 т.п.н..

Наилучший результат был получен при использовании режима пульсации от 60с до 120с. Применение режима 60с–90с позволило выявить внехромосомную ДНК только у штамма PNS1.

Сопоставление размера выявленных плазмид с известными Д-плазмидами позволяет предположить, что гены деструкции бифенила у данных штаммов могут иметь плазмидную локализацию (Fukuda *et al.*, 1998; Pieper, 2005).

6.2. Анализ генов, кодирующих бифенил- и бензоат-диоксигеназы, у индивидуальных штаммов

Проведенные исследования показали, что штаммы, изолированные из смешанной культуры PN2-S и бактериальной ассоциации PN2-B, проявляют деградтивную активность к моно(хлор/гидрокси)бифенилам и к дихлорбифенилу (Разделы 5.1, 5.2). Анализ метаболитов позволил предположить, что трансформация происходит по «верхнему» бифенильному пути с образованием в качестве конечных продуктов хлор/гидроксибензойных кислот (Таблицы 13, 15, 16, Рисунок 5).

Известно, что первичную атаку на молекулу бифенила/хлорбифенила у аэробных бактерий осуществляет бифенил 2,3-диоксигеназа (Elangovan *et al.*, 2019). В результате проведенных исследований было установлено, что все исследуемые штаммы несут ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (Рисунок 33). Полученные нуклеотидные последовательности гена *bphA1* размещены в международной базе данных GenBank, номера указаны на рисунке в скобках после обозначения штамма.

Следует отметить, что гены *bphA1* у исследуемых в настоящей работе штаммов, формируют отдельную ветвь на филогенетическом дереве (Рисунок 35). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей выявленных генов с генами *bphA1* штаммов *Pseudomonas* sp. VRP2-6, *Pseudomonas* sp. VRP2-2,

Rhodococcus wratislaviensis P13 и *R. wratislaviensis* P12, изолированных ранее из территориально близких эконищ, составил 82,32–99,76 % (Шумкова и соавт., 2015; Воронина и соавт., 2019).

Так как среди промежуточных соединений биodeградации моногидроксифенилов был выявлен катехол, который может быть образован из гидроксibenзойных кислот под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы, нами проведен скрининг исследуемых штаммов на наличие гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы (Рисунок 36).

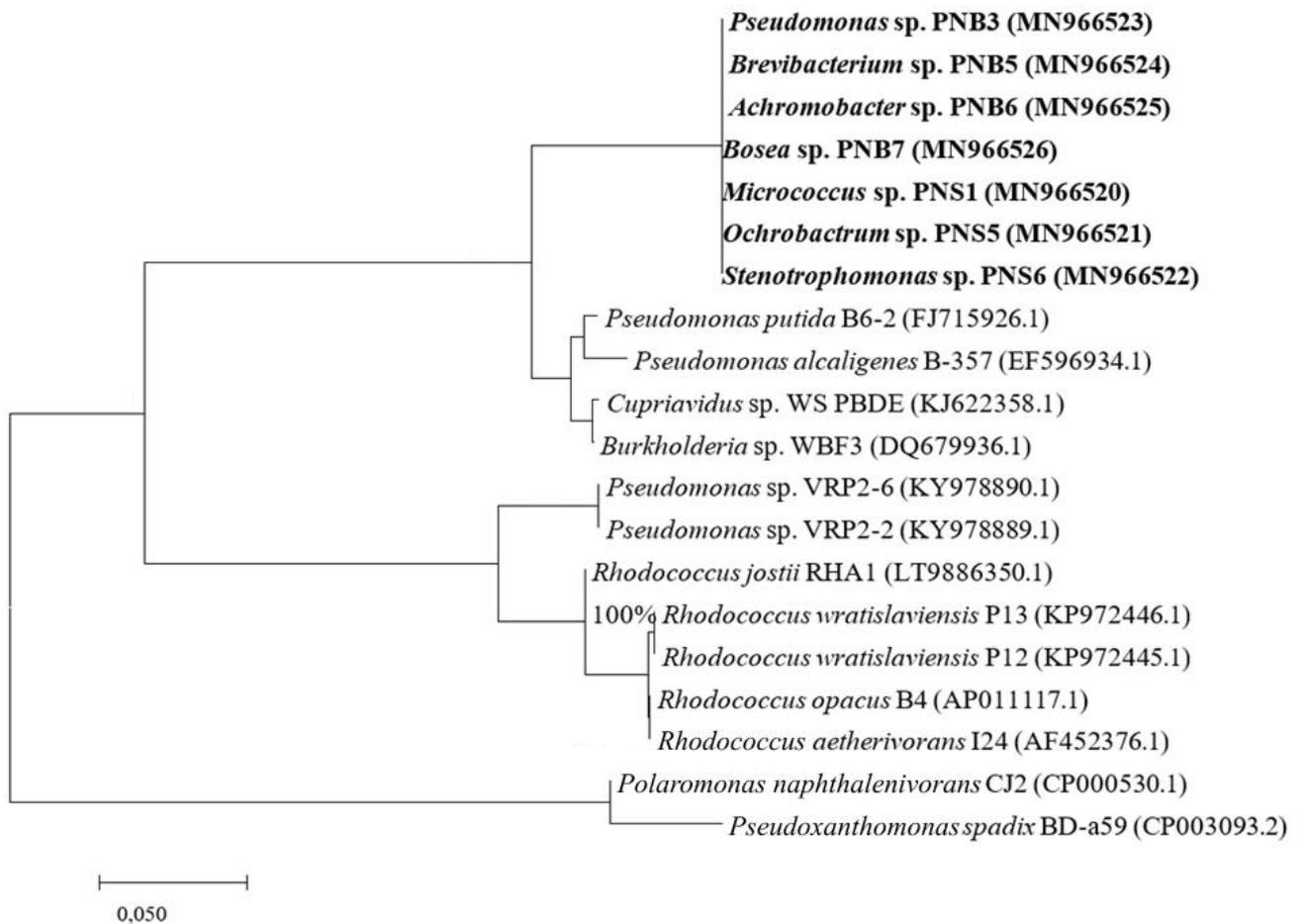


Рисунок 35 – Дерево сходства генов α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназ, построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Статистическая достоверность порядка ветвления > 98 % («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

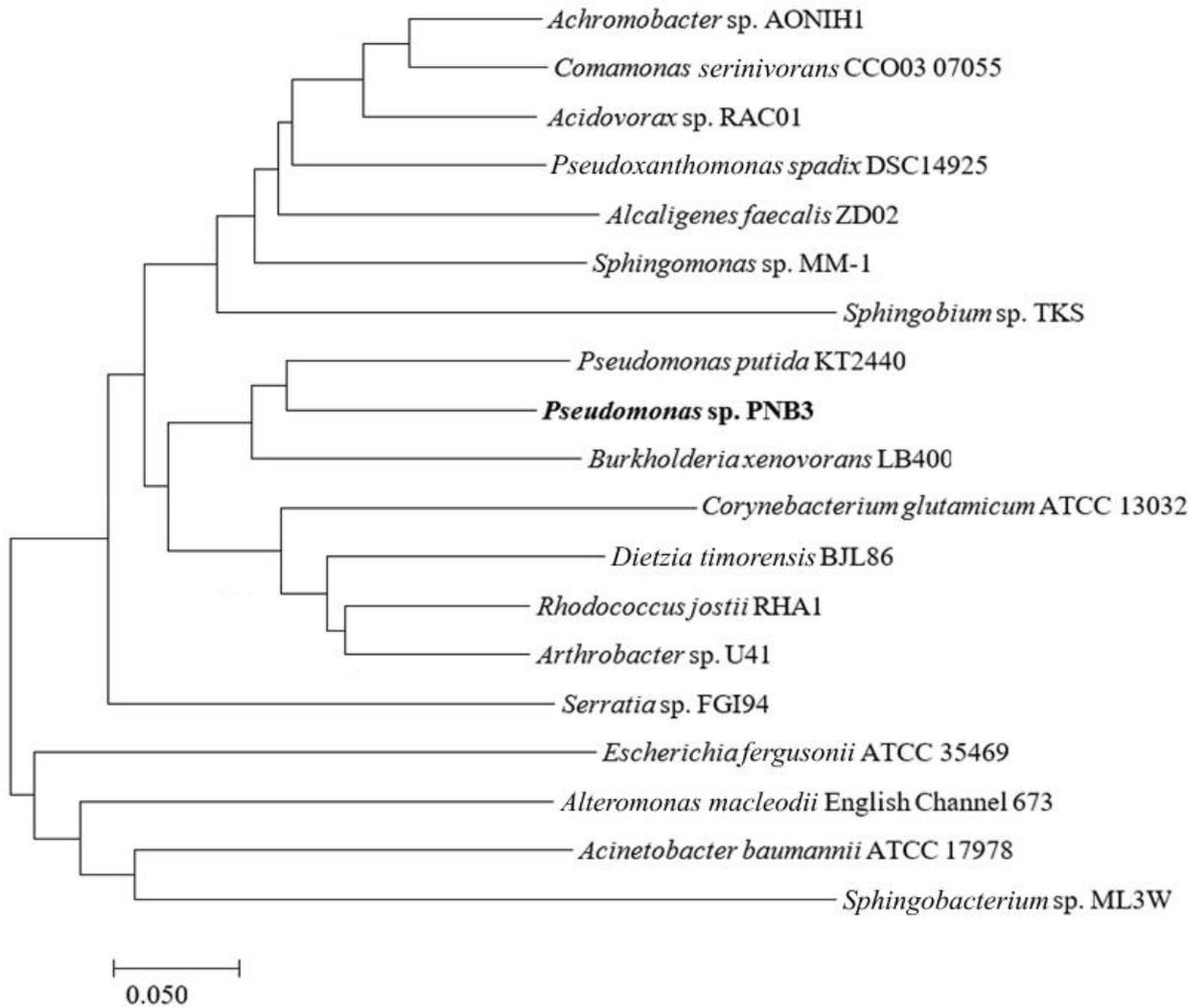


Рисунок 36 – Дерево сходства генов α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназ, построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Статистическая достоверность порядка ветвления $> 98\%$ («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

Положительная амплификация с праймерами к гену *benA* была получена только у штамма *Pseudomonas* sp. PNB3 (на Рисунке 36 выделено жирным шрифтом). Следует отметить, что нуклеотидная последовательность *benA*_{PNB3} при построении филогенетического дерева была расположена в одной ветви с геном *benA* известного штамма-деструктора ароматических соединений *Pseudomonas putida* KT2440 (van Duuren *et al.*, 2011; Kahlon, 2016). Таким образом, можно предположить, что у штаммов *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5, *Stenotrophomonas* sp. PNS6, *Brevibacterium* sp. PNB5, *Achromobacter* sp. PNB6 и

Bosea sp. PNB7 отсутствует бензоат 1,2-диоксигеназа, а трансформация бензойной кислоты и ее производных до соединений основного обмена клетки происходит под действием других ферментов.

6.3. Анализ генома штамма *Rhodococcus opacus* CH628

На основании анализа биodeградативного потенциала для более подробного изучения на генетическом уровне был отобран штамм *Rhodococcus opacus* CH628. С использованием методов NGS-секвенирования получена нуклеотидная последовательность генома штамма *R. opacus* CH628. После первичной обработки данная последовательность размещена в международной базе данных NCBI под номером JBLZMV000000000, а также проанализирована с использованием онлайн-сервиса RAST.

Ранее, на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, штамм CH628 был идентифицирован как *Rhodococcus wratislaviensis*. Однако на основании анализа полногеномной последовательности с использованием средней идентичности нуклеотидов (ANI) установлено, что геном штамма CH628 на 99,321 % идентичен геному типового штамма *Rhodococcus opacus* DSM 43205 (GenBank X80630) с перекрытием генома на 88,3 %.

По данным RAST размер генома штамма *R. opacus* CH628 составляет 8229 т.п.н., содержание GC – 67,2 %, количество кодирующих последовательностей – 8188, количество РНК – 56. Распределение генов по функциональным группам представлено на рисунке 37. Выявлено 203 гена, кодирующих ферменты метаболизма ароматических соединений.

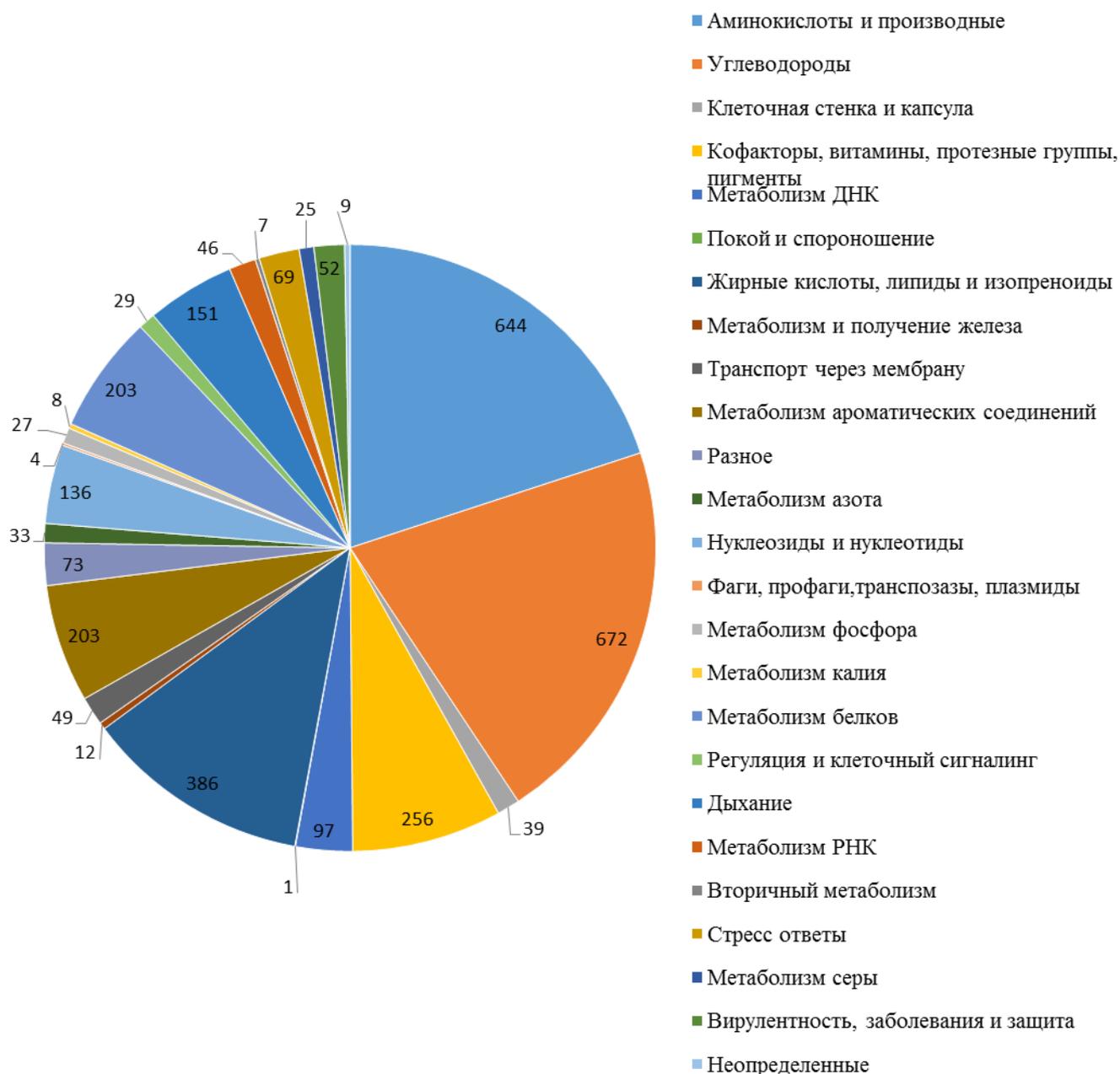


Рисунок 37 – Распределение генов *R. oracis* CH628 по функциональным группам. Изображение получено с помощью SEED Viewer 2.0

Известно, что биохимический путь аэробной трансформации бифенила и его производных включает последовательную работу ферментов классов диоксигеназ, дегидрогеназ и гидролаз (Рисунок 5) (Горбунова и соавт., 2024; Fortin *et al.*, 2006). Автоматическое аннотирование нуклеотидной последовательности штамма CH628 в базе NCBI позволило выявить 49 генов, кодирующих диоксигеназы, 388 генов, кодирующих дегидрогеназы и 341 ген, кодирующих гидролазы. Ключевую роль в окислении бифенила и его хлор- и гидроксипроизводных выполняют

диоксигеназы (Master, Mohn, 2001; Barriault, Sylvestre, 2002; Barriault *et al.*, 2002). Анализ с помощью Sequence Set Browser (NCBI) позволил выявить ферменты класса диоксигеназ, наиболее вероятно участвующие в разложении бифенила (Таблица 19).

Таблица 19 – Диоксигеназы штамма *R. opacus* CH628 и гены их кодирующие, осуществляющие окисление бифенила и его производных

№	CDS регион в нуклеотидной последовательности	№ белка	Размер, а.к.	Название фермента
1	JBLZMV010000002.1 214083–215156(±)	MFW2237543	357	α-субъединица ароматической диоксигеназы
2	JBLZMV010000020.1 70864–72129(-)	MFW2241406	421	α-субъединица ароматической диоксигеназы
3	JBLZMV010000020.1 78896–80341(±)	MFW2241415	481	α-субъединица ароматической диоксигеназы
4	JBLZMV010000003.1 106515–107018(-)	MFW22378261	167	β-субъединица ароматической диоксигеназы
5	JBLZMV010000020.1 70397–70867(-)	MFW2241405	156	β-субъединица ароматической диоксигеназы
6	JBLZMV010000036.1 11553–12071(-)	MFW2242780	172	β-субъединица ароматической диоксигеназы
7	JBLZMV010000001.1 555828–556739(±)	MFW2237136	303	Бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназа
8	JBLZMV010000012.1 121990–122895(±)	MFW2240179	301	Бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназа

С использованием алгоритмов сервиса RAST установлено, что в разложении бифенила до образования бензойной и пентадиеновой кислот у штамма CH628 участвуют бифенил 2,3-диоксигеназа (КФ1.14.12.18) (номер генов в системе RAST: *bphA1* – 4673, *bphA2* – 4670, контиг – 36) и бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназа (КФ 1.13.11.39) (номер генов *bphC* в системе RAST – 1695 и 2466) (Рисунок 38).

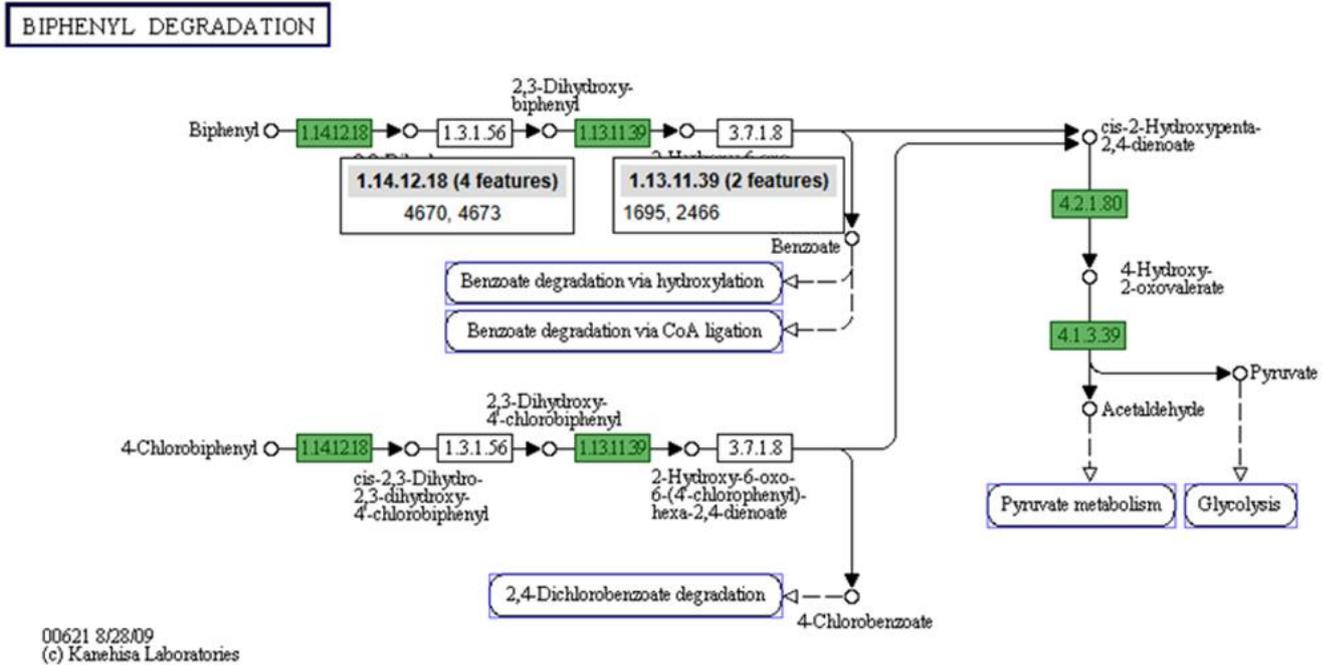


Рисунок 38 – Схема метаболического пути бифенила/хлорбифенила у аэробных бактерий. Зеленым обозначены ферменты, выявленные у штамма *R. oracus* CH628 в сервисе RAST (<https://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi>)

Таким образом, в результате анализа генома штамма CH628 выявлены гены, кодирующие первый фермент метаболического пути, обуславливающего биодеградативный потенциал штамма в отношении хлор- и гидрокси-замещенных бифенилов.

6.4. Моделирование белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штамма *R. oracus* CH628

6.4.1 Анализ нуклеотидной последовательности *bphA1*_{CH628}

Нуклеотидная последовательность гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штамма *R. oracus* CH628, была депонирована в GenBank под номером MW070532. Анализ полученной последовательности выявил высокий уровень сходства с α -субъединицей нафталин диоксигеназы (*narA*) (Рисунок 39).

На рисунке 39 визуализированы эволюционные связи гена *bphA1*_{CH628} с нуклеотидными последовательностями, уровень сходства с которыми находится в пределах 91,8–100 %.

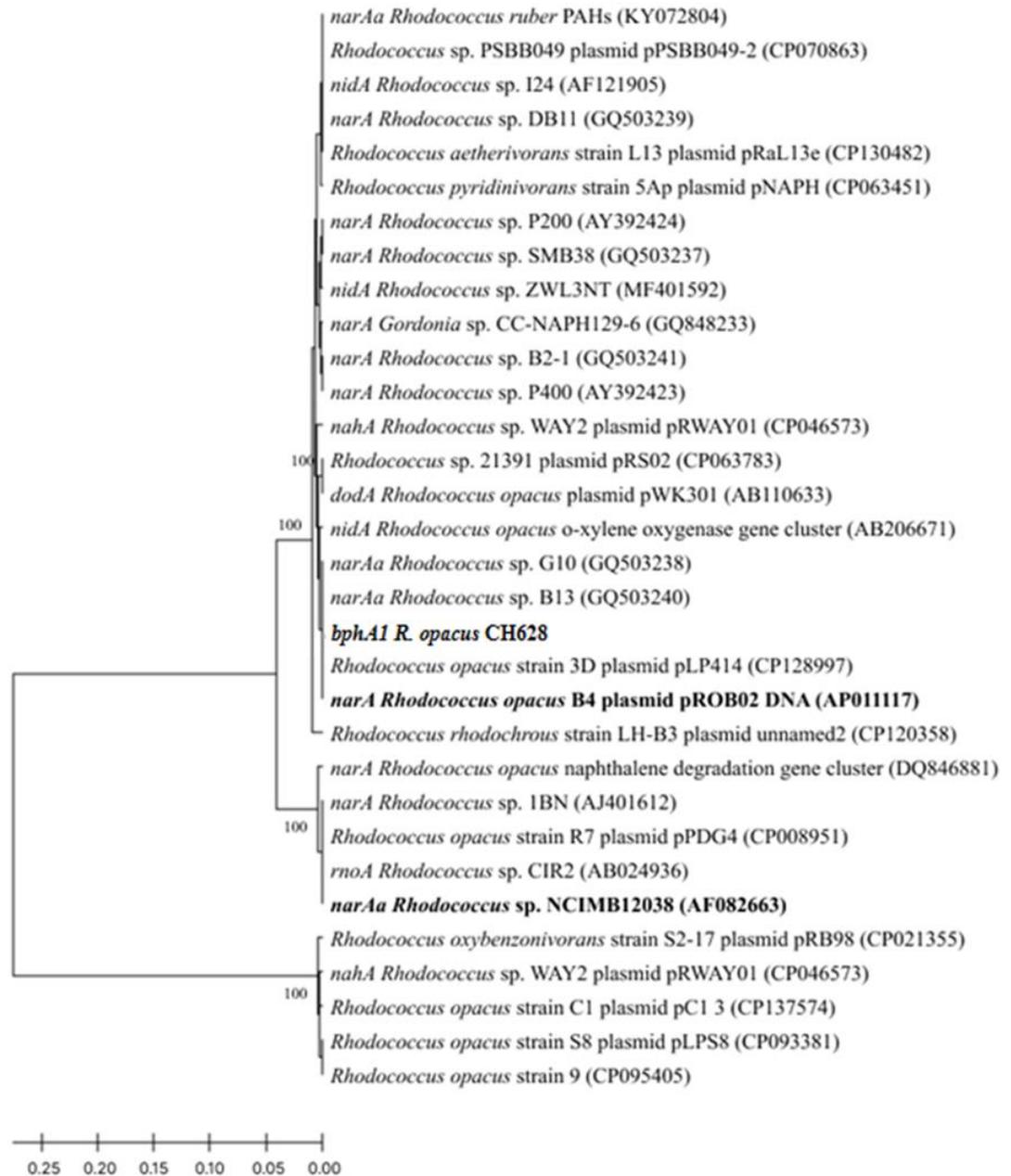


Рисунок 39 – Филогенетическое дерево последовательности *bphA1* штамма *R. opacus* CH628 построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

В одной «ветке» с исследуемым геном располагаются гены нафталин диоксигеназ штаммов-деструкторов ароматических соединений, выделенных из района солеотвала горнодобывающего предприятия, очистных сооружений и из почв химического завода (Na *et al.*, 2005; Anan'ina *et al.*, 2011; Anokhina *et al.*, 2020). Следует отметить, что такое расположение генов свидетельствует об их высоком сходстве, несмотря на то, что данные штаммы выделены с территорий, удаленных друг от друга. Можно предположить, что основным фактором селекции в данном случае выступало химическое загрязнение, а не географическое положение местообитания бактерий. Аналогичное предположение было сделано в работе (Shumkova *et al.*, 2015).

6.4.2 Анализ первичной структуры *VphA1_{CH628}*

В результате дедуктивной трансляции с использованием алгоритмов программы MEGA X и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что уровень сходства *VphA1_{CH628}* с первичной структурой α -субъединицы нафталин диоксигеназы (КФ 1.14.12.12) штамма-деструктора *R. opacus* B4 (GenBank ВАН47212.1) и α -субъединицы нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A) составляет 98,6 и 93,7 % соответственно.

Для построения филогенетического дерева поиск аминокислотных последовательностей выполнялся с помощью NCBI BLAST, ограничивая зону поиска базами данных Protein Data Bank и UniProt. Последовательности для анализа были получены с использованием функции Protein BLAST базы данных GenBank, а также из баз данных Protein Data Bank (PDB) и UniProtKB/Swiss-Prot (swissprot). Визуализация математической модели между исследуемой аминокислотной последовательностью и известными показала, что *VphA1_{CH628}* располагается в «ветви» нафталиновых диоксигеназ (Рисунок 40). При построении филогенетического дерева брали в расчет последовательности, уровень сходства между которыми составлял от 36 до 98 %.

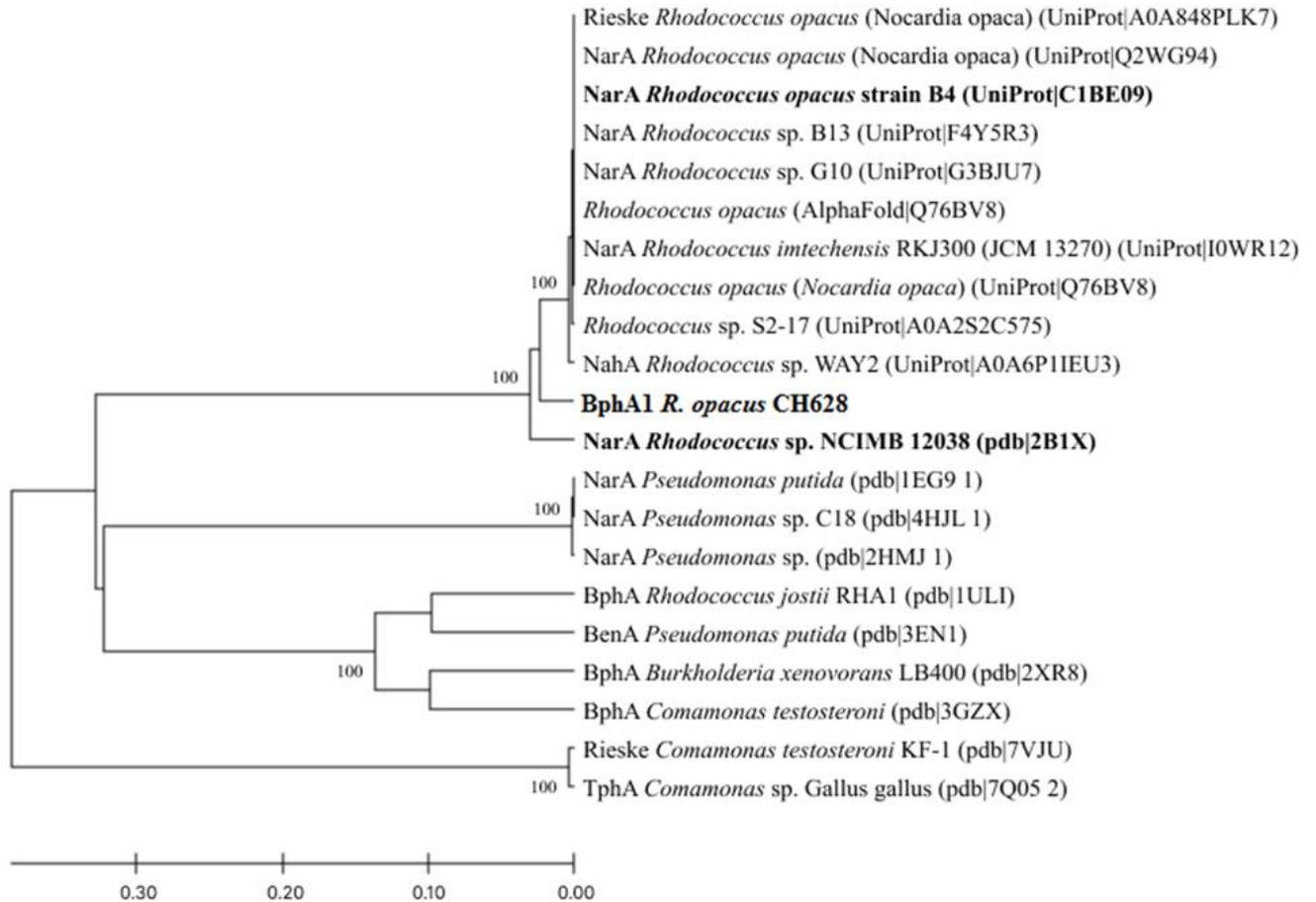


Рисунок 40 – Филогенетическое дерево последовательности BphA1 штамма *R. opacus* CH628 построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 аминокислотной замене на 100 аминокислотных остатков. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

6.4.3 Моделирование вторичной и третичной структуры BphA1

Вторичная структура α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. opacus* CH628 была получена с использованием программ MODELLER, AlphaFold и trRosetta, отличающихся алгоритмами построения белковой структуры.

В основе моделирования вторичной и третичной структур белков в программе MODELLER лежит принцип построения по известной модели белка, характеризующейся наибольшим уровнем сходства первичной структуры с аминокислотной последовательностью исследуемого белка/фермента. В рамках

настоящего исследования в качестве модели была выбрана классическая структура NarA1, описанная у штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A), которая показала высокий уровень сходства с анализируемой последовательностью (идентичность 93.72 % для аминокислотной последовательности).

Rhodococcus sp. NCIMB12038 осуществляет разложение нафталина и ряда других ароматических соединений. В штамме *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 выявлены различные пути разложения нафталина, которые регулируются независимо. Было показано, что метаболический путь разложения нафталина у данного штамма аналогичен таковому, описанному для штаммов рода *Pseudomonas*, с салицилатом в качестве центрального метаболита ((Liu *et al.*, 2011).

В результате использования алгоритмов программы MODELLER на основе NarA1_{NCIMB12038} было построено пять моделей VphA1 штамма *R. opacus* CH628, отличающихся по показателю энергии. Для дальнейшего исследования была выбрана модель VphA1_{CH628} с наименьшим показателем DOPE (-45531.87).

Построение моделей белков без шаблона возможно при использовании программ AlphaFold и trRosetta. Однако данные программы используют различные подходы для прогнозирования новой структуры. В AlphaFold используются алгоритмы мономерной модели, тогда как в trRosetta используются нейронные сети глубокого обучения и алгоритм Rosetta. Использование данных программных комплексов позволило получить две модели VphA1_{CH628}. Параметры вторичной структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штамма *R. opacus* CH628 представлены в таблице 20. Для удобства описания модели VphA1, полученные с применением различных программ обозначены как:

VphA1(M) – построена в программе MODELLER,

VphA1(AF) – разработана с применением AlphaFold,

VphA1(TR) – смоделирована с использованием базовых параметров trRosetta (Таблица 20, Рисунок 41).

Использование алгоритма построения «по шаблону» (MODELLER) привело к созданию модели VphA1(M) отличающейся меньшим количеством α спиралей и наименьшей площадью молекулы, тогда как объем характеризуется средним

значением, между показателями объема для VphA1(AF) и VphA1(TR). Модель VphA1(TR) обладает наименьшим объемом при наибольшей площади молекулы, содержит большее количество π -спиралей и строгих β -витков.

Таблица 20 – Характеристики вторичной и третичной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма CH628

Элемент структуры	VphA1(M)	VphA1(AF)	VphA1(TR)
α спирали	11	13	13
π -спирали	5	5	6
строгие α -витки	2	3	3
β складчатости	20	20	17
строгие β -витки	10	10	12
Объём e^3	49,40	50,41	48,60
Площадь e^3	18,66	19,26	21,01
Количество АК	401	401	401

3D-Модели VphA1_{CH628} были визуализированы и предварительно проанализированы с использованием программы PyMOL (Рисунки 42–44). Визуализация позволила оценить общее качество моделей и проверить ключевые структурные элементы.

Для наглядного сравнения 3D-модели VphA1(M), VphA1(AF) и VphA1(TR) были выровнены относительно друг друга (Рисунок 45), что позволило оценить различия в структурных элементах.

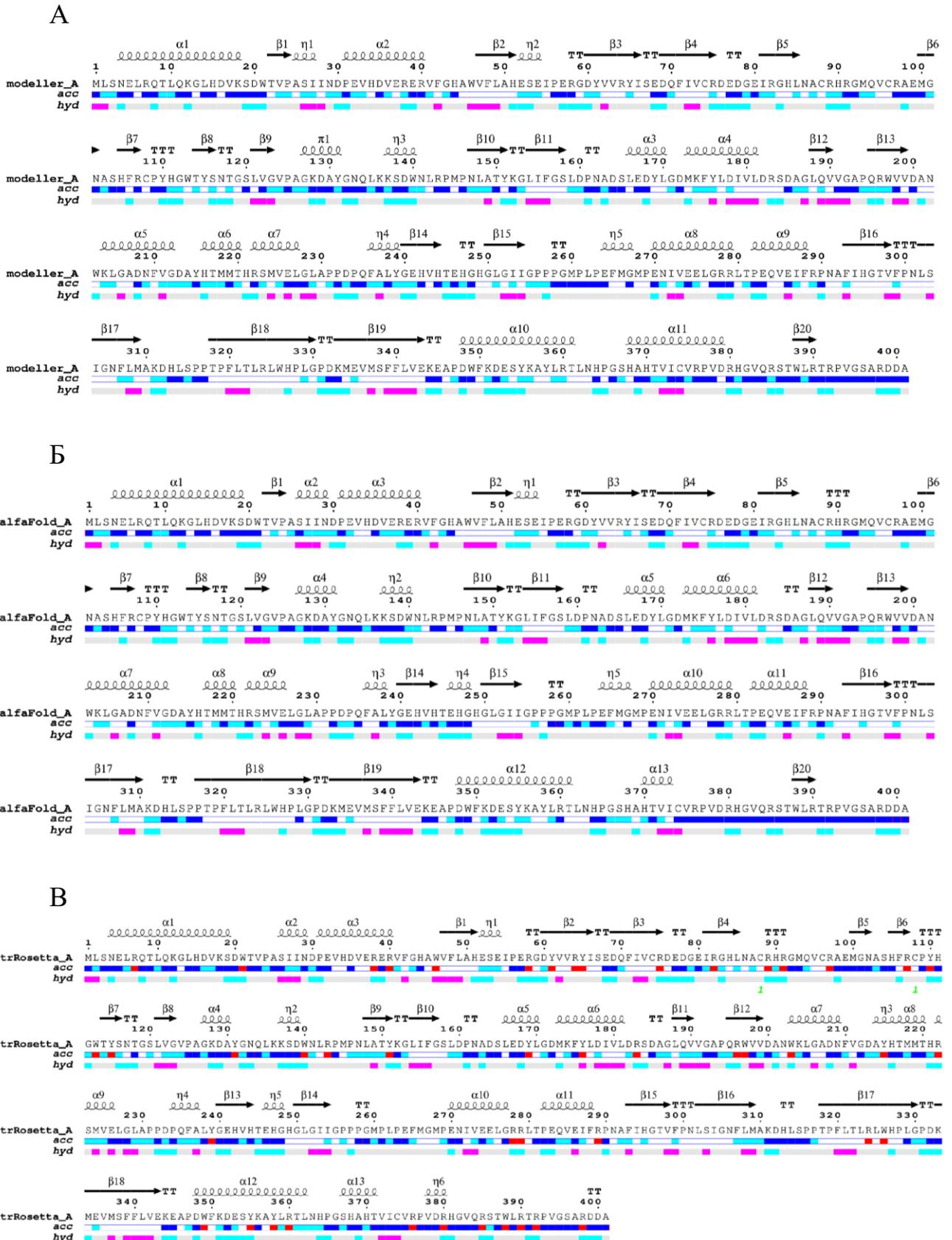


Рисунок 41 – Вторичная структура VphA1_{CH628}: А – модель построена в программе MODELLER, Б – модель построена с использованием AlphaFold, В – модель получена при помощи алгоритма trRosetta

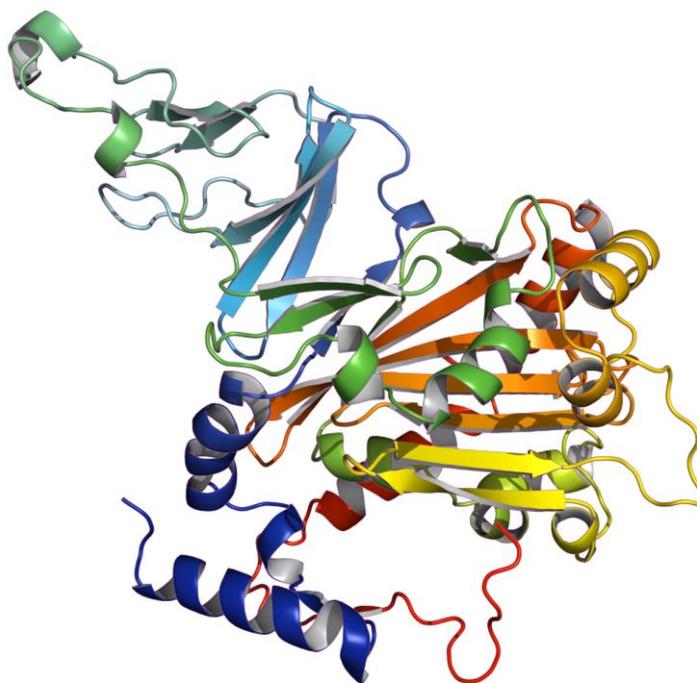


Рисунок 42 – Модель VphA1_{CH628} (VphA1(M)), полученная при помощи гомологичного моделирования, программой Modeller 10.4, используя в качестве шаблона NarA1 *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (pdb|2B1X|A).

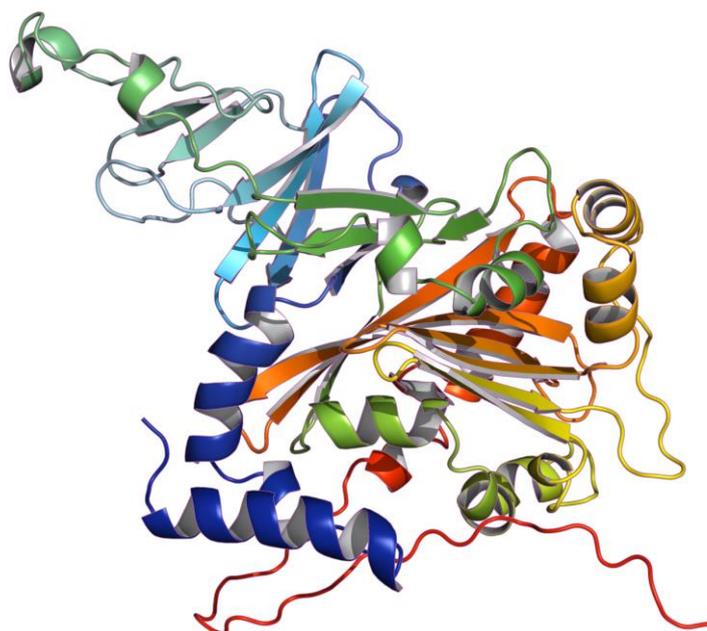


Рисунок 43 – Модель VphA1_{CH628} (VphA1(AF)), полученная при помощи системы искусственного интеллекта AlphaFold.

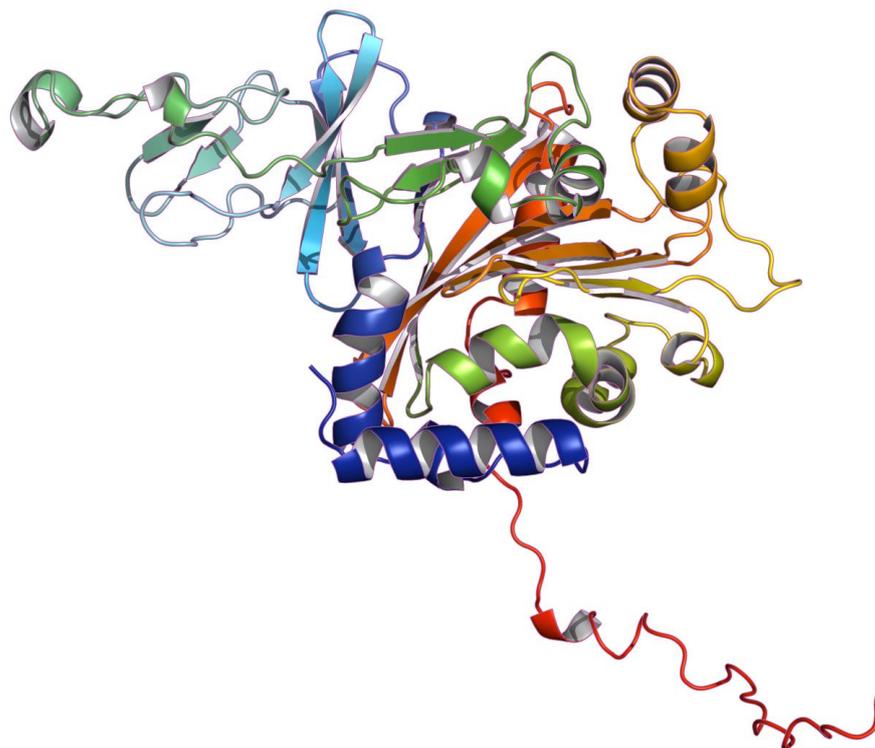


Рисунок 44 – Модель VphA1_{CH628} (VphA1(TR)), полученная при помощи алгоритма глубокого обучения TrRosetta.

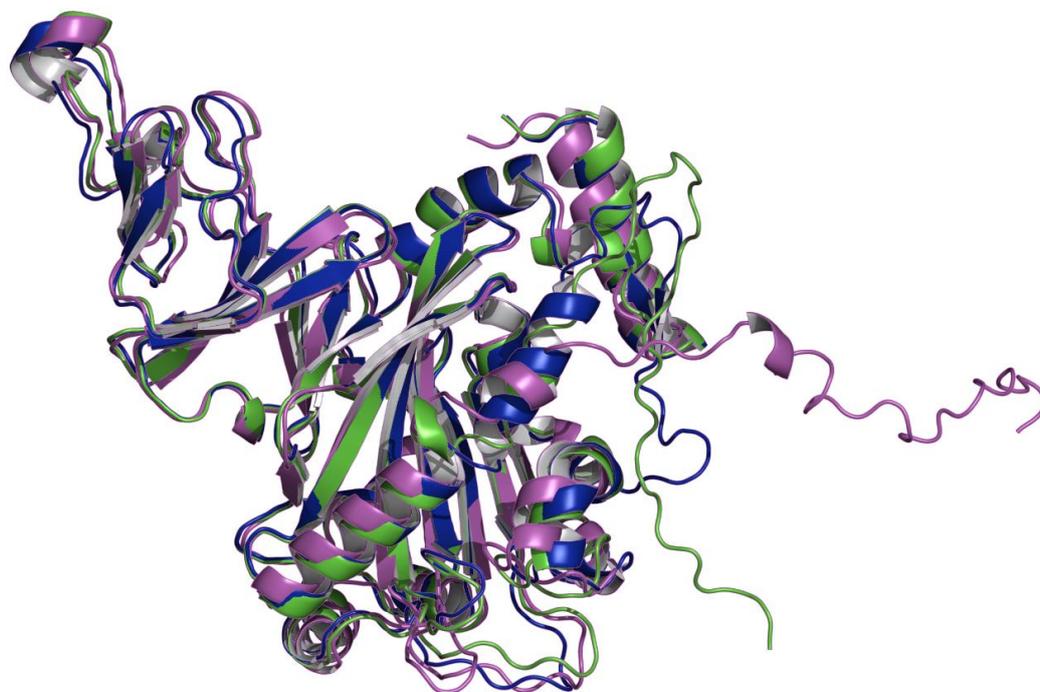


Рисунок 45 – Выровненные, относительно друг друга, модели VphA1_{CH628}: VphA1(M) – синий, VphA1(AF) – зелёный, VphA1(TR) – розовый

Из рисунка 45 видно, что петлевые области $VphA1_{CH628}$, особенно на периферии, имеют заметные различия между моделями. Модель $VphA1(TR)$ демонстрирует больше отклонений от структуры $VphA1(M)$ и $VphA1(AF)$ в вытянутых петлях. По всей видимости, $trRosetta$ с меньшей точностью моделирует гибкие области белка, чем $MODELLER$ и $AlphaFold$. Можно предположить, что $VphA1(TR)$ характеризуется менее стабильной структурой, так как содержит менее компактные петлевые области. Данное предположение подтвердилось при оценке качества моделей.

Качество полученных моделей $VphA1_{CH628}$ оценивали с использованием нескольких независимых методик анализа структурных моделей, включая $ERRAT$, $VERIFY3D$ и $PROCHECK$ (Таблица 21, Рисунок 46). Эти инструменты позволяют выявить возможные ошибки в предсказании структуры, а также определить, насколько корректно аминокислотная последовательность согласуется с предсказанными трёхмерными структурами.

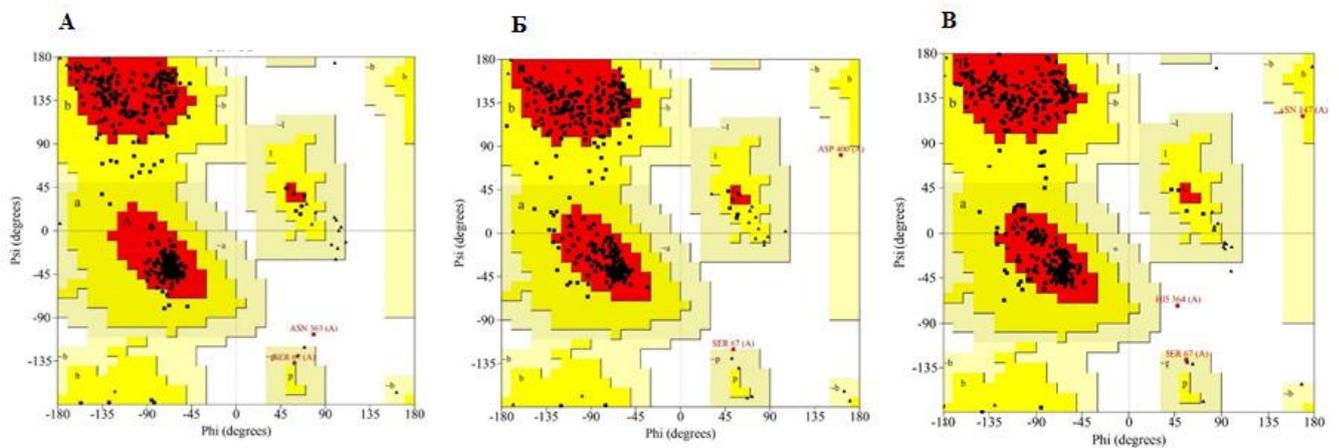


Рисунок 44 – График Рамачандрана модели $VphA1_{CH628}$, построенный с использованием $Modeller$ 10.4 (А), $AlphaFold$ (Б), $TrRosetta$ (С)

Таблица 21 – Сравнение параметров качества полученных моделей белка

Использованная программа	ERRAT, %	VERIFY 3D, %	График Рамачандрана
Modeller	87,532	96,01 (Пройдено)	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 90,7 % (304)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 8,7 % (29)
			Остатки в широко разрешенных областях 0,3 % (1)
			Остатки в запрещенных областях 0,3 % (1)
			8 маркированных остатков (из 399)
AlphaFold	90,836	82,79 (Пройдено)	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 86,3 % (289)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 13,1 % (44)
			Остатки в широко разрешенных областях 0,6 % (2)
			Остатки в запрещенных областях 0,0 % (0)
			7 маркированных остатков (из 399)
TrRosetta	89,92	71,82 (Не пройдено)	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 91,0 % (305)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 8,1 % (27)
			Остатки в широко разрешенных областях 0,6 % (2)
			Остатки в запрещенных областях 0,3 % (1)
			3 маркированных остатка (из 399)

VphA1(M) показала наивысшую точность: 90,7 % аминокислотных остатков находились в благоприятных регионах графика Рамачандрана, а ERRAT-показатель составил 87,53 %. VphA1(AF) продемонстрировала высокую точность в предсказании активного центра фермента, хотя её общие показатели ERRAT (90,8 %) и VERIFY3D (82,79 %) были чуть ниже по сравнению с VphA1(M). Модель VphA1_{CH628}, созданная с помощью trRosetta, оказалась наименее точной, так как ее показатель VERIFY3D составил 71,82 %. Таким образом, VphA1(M) характеризуется наиболее точной структурой.

Построенные модели служат основой для дальнейшего структурного и функционального анализа, позволяя сравнить VphA1 с другими диоксигеназами и выявить уникальные или консервативные структурные особенности.

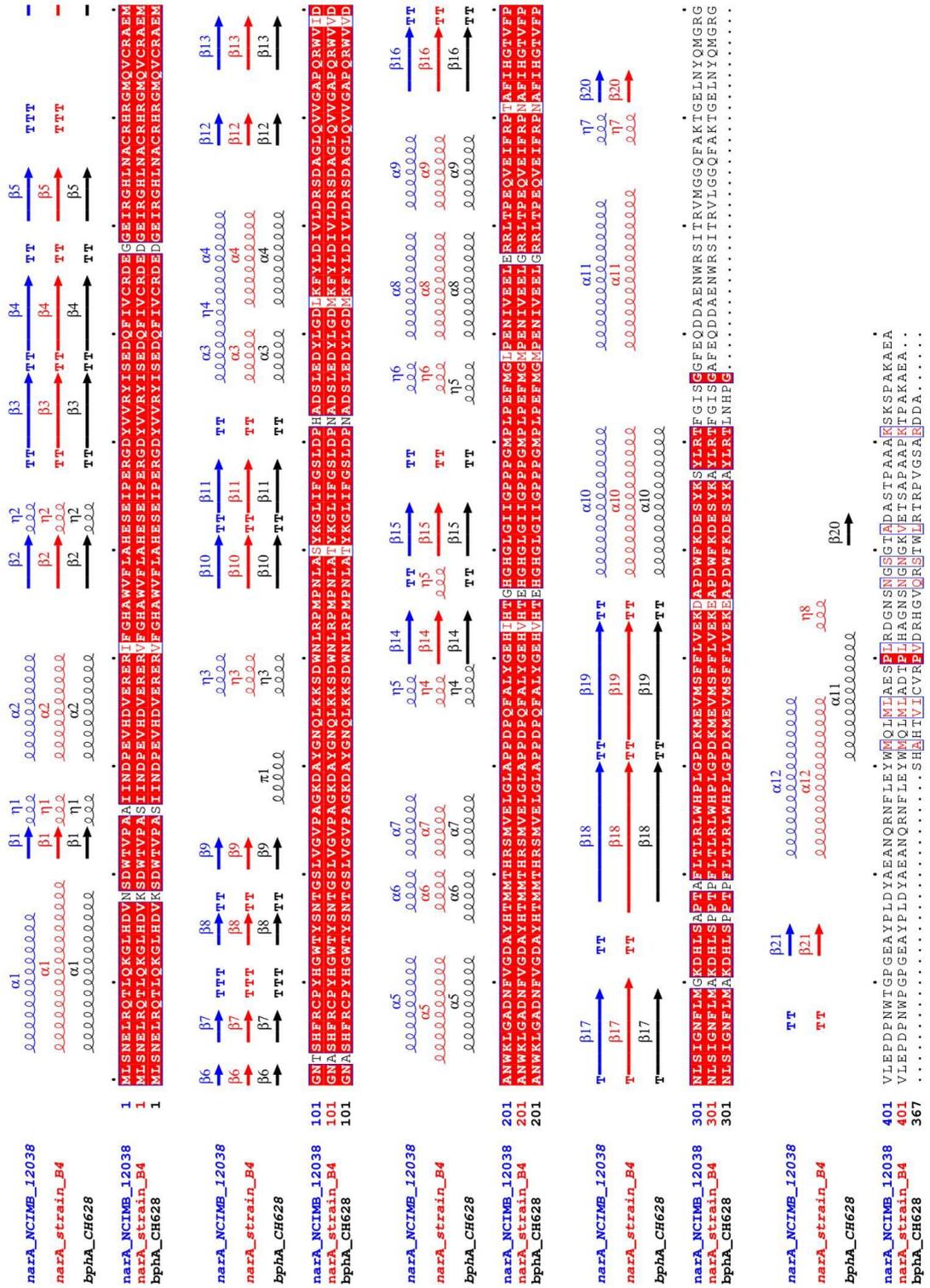
В рамках настоящего исследования было осуществлено сравнение модели VphA1_{CH628}, полученной с использованием MODELLER с моделями α -субъединиц известных штаммов-деструкторов ароматических соединений (Рисунок 47).

Анализ показал, что VphA1_{CH628} структурно ближе к α -субъединице нафталин диоксигеназы штаммов *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 и *R. opacus* B4. Из рисунка 47 А видно, что для сравниваемых аминокислотных последовательностей характерны длинные области с одинаковым набором аминокислот. Сравнение количественных показателей вторичной структуры VphA1_{CH628} с NarA_{NCIMB12038} и NarA_{B4} выявило различие в одну α -спираль, 2-3 η -спирали, и одну β -складчатость.

Принципиально другую картину мы получили при сравнении VphA1_{CH628} с α -субъединицей бифенил диоксигеназы штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 (Рисунок 47 Б). Выявлено, что при незначительных отличиях в количественных показателях расположение спиралей и складчатостей практически не совпадало.

Полученные результаты позволяют предположить, что бифенил диоксигеназа штамма *R. opacus* CH628 способна катализировать реакции, характерные для нафталиновых диоксигеназ.

A



Б

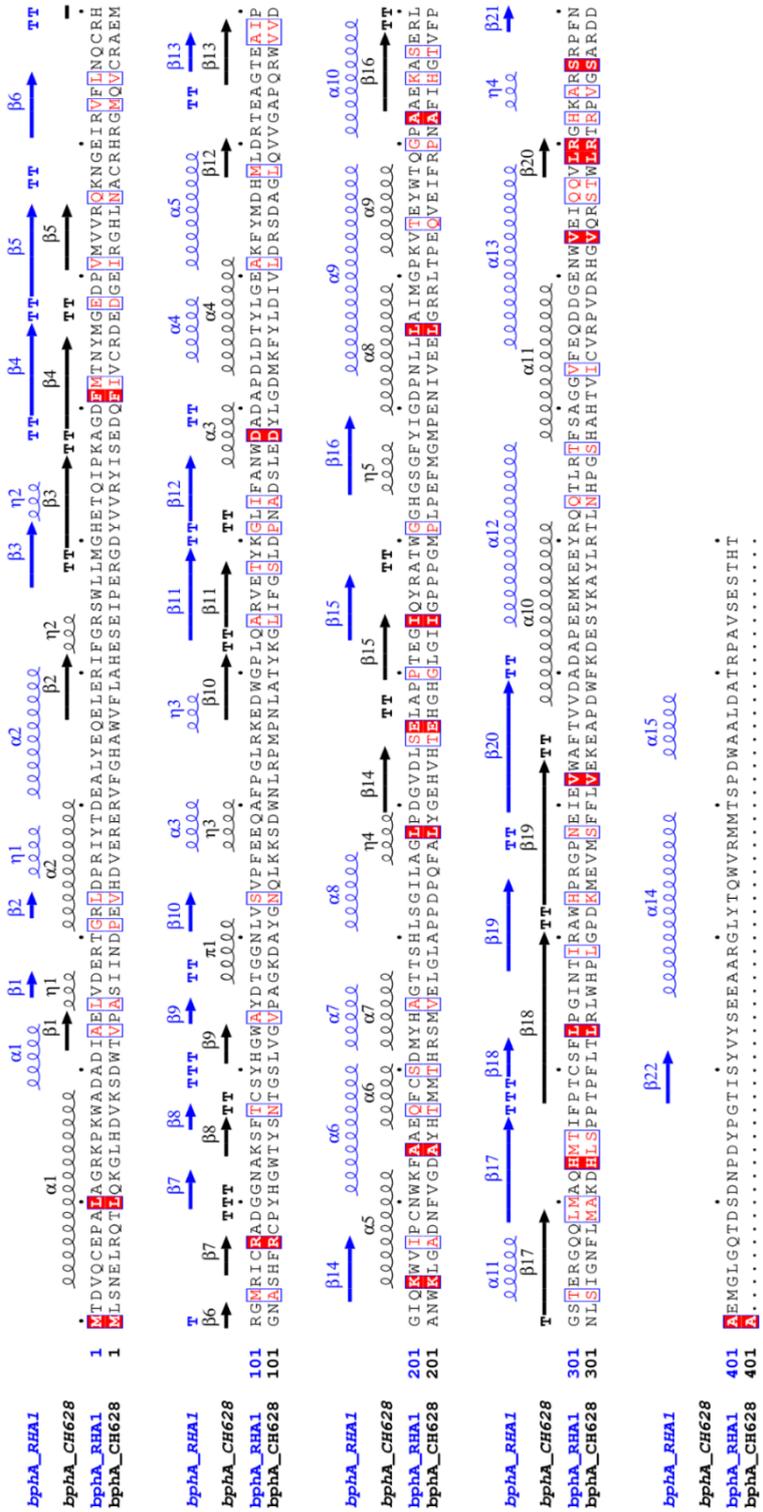


Рисунок 47 – Сопоставление аминокислотной последовательности и вторичной структуры α-субъединицы бифенил диоксигеназы штамма *R. oracus* CH628 (черный цвет) с гомологичными структурами штаммов: А – *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (синий цвет), *Rhodococcus oracus* V4 (красный цвет), Б – *Rhodococcus jostii* RHA1 (синий цвет).

6.4.4 Анализ активного центра фермента

Используя программу CASTp, мы идентифицировали область активного центра для 2В1Х (нафталин диоксигеназа) штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038, включающую следующие аминокислоты: Asn209, Phe 210, Asp 213, Ala 214, His 216, Thr 217, His 221, Pro 231, Phe236, Ile 254, Phe293, His295, Phe307, Met309, Phe362, Phe368, Asp372. В этой области включены все аминокислоты, участвующие во взаимодействии с субстратом и ионом Fe³⁺.

Для VphA1_{CH628} аналогичный анализ с использованием всех моделей показал, что область активного центра была идентифицирована только в модели, созданной с помощью AlphaFold (Рисунок 48).

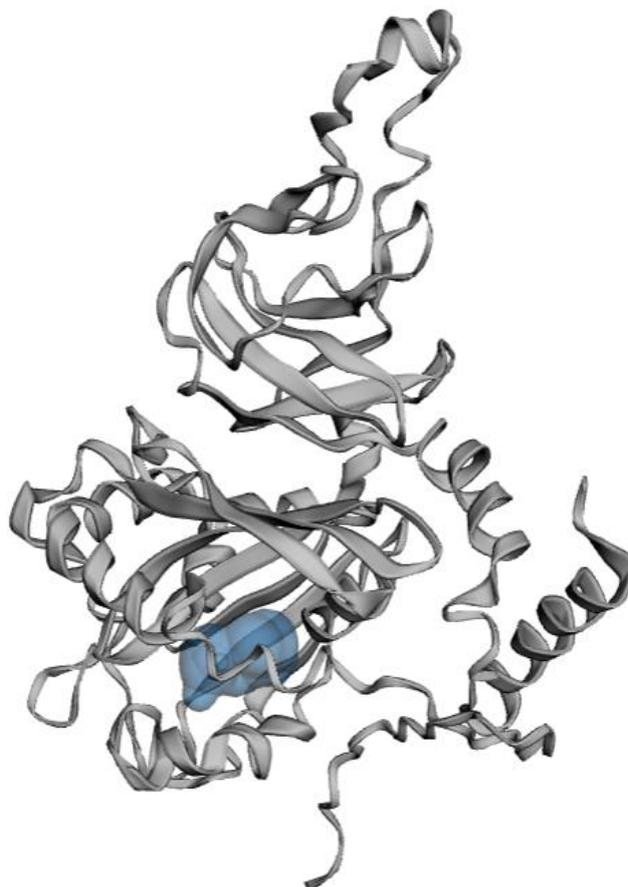


Рисунок 48 – Модель VphA1 *R. oracus* CH628, полученная при помощи системы искусственного интеллекта AlphaFold. Синим цветом выделена предполагаемая область активного центра.

На основании полученных данных, можно предположить, что субстрат-связывающий карман в каталитическом домене α -субъединицы $\text{VphA1}_{\text{CH628}}$ формируют спирали $\alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 10, \alpha 11$, β -нити $\beta 15, \beta 16, \beta 17$, петли $\alpha 10\text{--}\alpha 11$ и $\beta 14$. В активном центре находятся аминокислоты Asn209, Phe210, Asp213, Ala214, His216, Thr217, His221, Met 224, Ala230, Phe236, Ala237, Ile254, Phe293, His295, Phe307, Met309, Thr361, Leu362, Ala369. Следует отметить, что аминокислоты His216 и His221 также присутствуют в составе активного центра нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A) и участвуют во взаимодействии с ионом Fe^{3+} .

У штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 карман связывания субстрата, расположен между основным β -слоем и α -спиралями в каталитическом домене α -субъединицы бифенил диоксигеназы и формируется спиралями $\alpha 6, \alpha 7, \alpha 8, \alpha 9$, β -нитью 16, петлями $\alpha 13\text{--}\alpha 14$ и $\beta 17\text{--}\beta 18$, включая остатки вокруг иона Fe^{3+} (Gln217, Phe218, His224, His230 и Asp378). В кармане связывания субстрата два кольца связанной молекулы бифенила расположены не параллельно, а со смещением. Каждое кольцо субстрата зафиксировано с обеих сторон; кольцо 1 располагается между His224 и Leu323, а кольцо 2 – между Ala225 и Phe368 (Furusawa Y. *et al.*, 2004).

Сравнение активных центров $\text{VphA1}_{\text{CH628}}$ и $\text{VphA1}_{\text{RHA1}}$ показало, что аминокислоты Ala225 и Leu323, взаимодействующие с молекулой бифенила в активном центре штамма *R. jostii* RHA1 и находящиеся в таких же позициях Val225 и Leu323 штамма *R. opacus* CH628 (Рисунок 47 Б) относятся к группе нейтральных гидрофобных аминокислот, что может обеспечивать взаимодействие активного центра $\text{VphA1}_{\text{CH628}}$ с молекулой бифенила. Одной из аминокислот, участвующих во взаимодействии с ионом Fe^{3+} , в $\text{VphA1}_{\text{RHA1}}$ является Gln217. В данной позиции в составе $\text{VphA1}_{\text{CH628}}$ находится Thr217 (Рисунок 47 Б). Так как данные аминокислоты принадлежат группе полярных гидрофильных аминокислот, можно предположить, что Thr217 активного центра $\text{VphA1}_{\text{CH628}}$ также участвует во взаимодействии с ионом Fe^{3+} .

Сходство ряда ключевых аминокислотных остатков активного центра BphA1_{CH628}, NarA_{NCIMB12038} и BphA1_{RHA1}, позволяет предположить, что бифенил диоксигеназа штамма *R. opacus* CH628 способна эффективно катализировать диоксигеназные реакции, необходимые для разложения как нафталина/полициклических ароматических углеводородов, так и хлор- и гидроксифенилов.

Таким образом, в ходе данного исследования были созданы и проанализированы три модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. opacus* CH628 с использованием программ MODELLER, AlphaFold и trRosetta. Наиболее высокие показатели точности структуры продемонстрировала модель, созданная с помощью MODELLER, где более 90 % аминокислотных остатков находятся в благоприятных регионах, что делает её наиболее достоверной для общего структурного анализа. Однако модель AlphaFold показала наибольшую точность в предсказании активного центра фермента.

Анализ активного центра выявил значительное сходство между BphA1 штамма *R. opacus* CH628 и нафталин диоксигеназой (NarA1) штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. Большинство консервативных аминокислотных остатков, таких как His216 и His221, которые участвуют во взаимодействии с субстратами и ионами металлов, присутствуют в обеих последовательностях. Также выявлены сходства в строении субстрат-связывающего каталитического кармана BphA1_{CH628} и BphA1_{RHA1} и некоторых ключевых аминокислотных остатков активного центра.

Можно заключить, что модель BphA1_{CH628}, построенная с помощью AlphaFold, наиболее пригодна для дальнейших исследований, связанных с функциональным анализом активного центра фермента, в то время как модель BphA1_{CH628}, созданная в программе MODELLER, рекомендуется для общего структурного анализа и понимания стабильности белка. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего структурного и биохимического изучения бифенил диоксигеназы штамма *R. opacus* CH628.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время проблема очистки окружающей среды от стойких органических загрязнителей, в частности полихлорированных бифенилов, приобретает всё большую актуальность ввиду их высокой токсичности, устойчивости к разложению и способности накапливаться в биосфере (Reddy *et al.*, 2019; Devi *et al.*, 2020). С учётом международных обязательств России по уничтожению ПХБ, особое значение приобретают исследования, направленные на разработку экологически безопасных методов деструкции ПХБ и их производных. Установлено, что микробная трансформация является основным путём их деградации в окружающей среде (Agulló *et al.*, 2019; Negret-Bolagay *et al.*, 2021), а гидроксилированные производные ПХБ, формирующиеся в том числе биотическими путями, обладают большей токсичностью и отличаются лучшей доступностью для микробной деструкции (Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2016). В этой связи исследование бактерий-деструкторов, их ферментативного аппарата и генетических детерминант деградации представляет собой актуальную научную задачу, лежащую в основе современных биотехнологий, ориентированных на ремедиацию загрязнённых территорий.

В рамках настоящего исследования была охарактеризована структура и динамика микробных сообществ, формирующихся под действием коммерческой смеси ПХБ марки Совол и незамещенного бифенила как селективных факторов. Установлено, что в условиях культивирования на Соволе в сообществе преобладали представители классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Chitinophagia*. Замена углеродного источника на бифенил привела к снижению биоразнообразия и выделению стабильных бактериальных ассоциаций, включающих представителей классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Actinomycetia*. Впервые показана способность штаммов родов *Bosea* и *Pseudoxanthomonas* к разложению бифенила.

Из полученных в ходе селекции штаммов наиболее перспективными оказались культуры, продемонстрировавшие высокую степень деструкции моно- и ди-замещенных хлор- и гидроксифенилов. Установлено, что эффективность

деградации достигала 100 % по ряду соединений. Выраженную активность к широкому спектру ПХБ/НО-ПХБ проявлял штамм *Rhodococcus opacus* CH628, способный к трансформации как индивидуальных конгенов ПХБ и НО-ПХБ, так и коммерческих смесей (Совол, Трихлорбифенил) и их производных. Метаболизм всех исследованных штаммов следовал классическому пути окисления бифенила.

Анализ генетических основ деградационного потенциала показал, что ключевой фермент бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA), катализирующий первичную атаку на замещённый бифенил, кодируется у исследованных штаммов генами, формирующими отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Уровень сходства этих последовательностей с генами известных штаммов-деструкторов варьировал от 82,32 % до 99,76 %. На основе полногеномного секвенирования штамма *R. opacus* CH628 были идентифицированы гены и ферменты, участвующие в окислении бифенила и его производных. В результате применения биоинформатических методов была разработана теоретическая модель пространственной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA_{CH628}). Выявлено значительное структурное сходство между BphA_{CH628} и нафталиндиоксигеназой NarA1 (*Rhodococcus* sp. NCIMB12038), что подтверждает деградативный потенциал штамма *R. opacus* CH628 в отношении широкого спектра ароматических ксенобиотиков.

Проведённое исследование позволило выделить и охарактеризовать бактериальные штаммы с высоким деструктивным потенциалом и детально изучить генетические механизмы деградации стойких органических соединений. Полученные данные формируют фундаментальную основу для разработки новых биотехнологий, направленных на ремедиацию загрязнённых территорий, и обогащают современные представления о микробной трансформации ПХБ и их производных.

ВЫВОДЫ

1. В результате изучения сукцессионных изменений в структуре бактериальных сообществ, выделенных из техногенных почв г. Перми и г. Чапаевска, вызванных воздействием коммерческой смеси ПХБ марки Совол и незамещенного бифенила, установлена тенденция к сокращению доминирующих групп аэробных бактерий в сообществе. Филогенетический анализ выделенных штаммов-деструкторов бифенила показал, что смена селективного фактора не влияет на присутствие в составе ассоциаций представителей родов *Pseudomonas* и *Pseudoxanthomonas*, а биodeградативный потенциал обусловлен наличием генов *bphA1* (кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы), формирующих отдельную ветвь на дереве сходства гомологичных последовательностей функциональных генов.

2. Анализ ростовых параметров при культивировании на бифениле как источнике углерода 6 селекционированных бактериальных ассоциаций позволил выделить ассоциацию PN2-B, состоящую из *Achromobacter* sp. PNB6, *Bosea* sp. PNB7, *Brevibacterium* sp. PNB1, *Brevibacterium* sp. PNB5, *Microbacterium* sp. PNB4, *Pseudomonas* sp. PNB3, *Pseudoxanthomonas* sp. PNB2, как наиболее перспективную для исследований и возможных практических приложений. Установлено, что применение суспензии клеток ассоциации PN2-B обуславливает разложение моно- и дихлорированных бифенилов на 86,2–100 % в течение 48 ч, а двух коммерческих смесей ПХБ, отличающихся по составу конгенов, на 38,4 % и 50,9 % за 72 ч.

3. Процесс биотрансформации хлор- и гидроксизамещенных бифенилов штаммами *Achromobacter* sp. PNB6 (ВКМ В-3791), *Brevibacterium* sp. PNB5 (ВКМ Ас-3018), *Microbacterium* sp. PNB4, *Ochrobactrum* sp. PNS5 (ВКМ В-3792), *Pseudomonas* sp. PNB3 и PNS4, *Pseudoxanthomonas* sp. PNS2 и *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029) обеспечивает разложение моно-замещенных конгенов более чем на 90 %. Наибольшим биodeградативным потенциалом обладает штамм *R. opacus* CH628 – эффективность деструкции (моно-тетра)-замещенных хлор/гидроксифенилов, а также их коммерческих и экспериментальных смесей составляет 97,8–100 % за 2–14 суток.

4. В результате полногеномного анализа штамма-деструктора ПХБ *R. opacus* CH628 выявлена группа из 203 генов, кодирующих ферменты метаболизма ароматических соединений. Установлены гены/ферменты, детерминирующие деструкцию хлор- и гидроксифенилов по классическому пути аэробного бактериального окисления, в том числе ключевой фермент – бифенил 2,3-диоксигеназа. Созданы 3D-модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1_{CH628}) выявившие значительное сходство исследуемого фермента с нафталин диоксигеназой (NarA1) штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. Анализ активного центра показал ключевые каталитические аминокислоты — His216, His221 и Asp372, отвечающие за координацию ионов железа и взаимодействие фермента с субстратом.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ПХБ – Полихлорированные бифенилы
- СОЗ – Стойкие органические загрязнители
- ХБК – хлорбензойные кислоты
- ГОФДК – гидрокси-оксо-фенилгексадиеновая кислота
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГХ – газовая хроматография
- ПИД – пламенно-ионизационный детектор
- МС – масс-спектрометрический детектор
- 2-ХБК – 2-хлорбензойная кислота
- 3-ХБК – 3-хлорбензойная кислота
- 4-ХБК – 4-хлорбензойная кислота
- диХБК – дихлорбензойная кислота
- моноХБ – монохлорбифенил
- диХБ – дихлорбифенил
- триХБ – трихлорбифенил
- ПХБ2 – 3-хлорбифенил
- ПХБ3 – 4-хлорбифенил
- ПХБ4 – 2,2'-дихлорбифенил
- ПХБ8 – 2,4'-дихлорбифенил
- ПХБ12 – 3,4-дихлорбифенил
- ПХБ29 – 2,4,5—трихлорбифенил
- ПХБ30 – 2,4,6-трихлорбифенил
- ПХБ70 – 2,5,3',4'-тетрахлоробифенил
- bphA* – бифенил диоксигеназа
- bphB* – бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа
- bphC* – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа
- bphD* – ГОФДК гидролаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронина, А. О. Разнообразие и молекулярно-биологическая характеристика бактерий-деструкторов бифенила (хлорированных бифенилов) техногенных экосистем: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Воронина Анна Олеговна. – Пермь, 2020. – 209 с.
2. Воронина, А. О., Егорова, Д. О., Корсакова, Е. С., Плотникова, Е. Г. Разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе техногеннозагрязненной почвы и выделение новых бактерий рода *Pseudomonas* – деструкторов бифенила/хлорбифенилов // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – №. 4. – С. 438–449.
3. Горбунова, Т.И. Полихлорированные бифенилы в реакциях замещения: дис. ... д-ра. хим. наук: 02.00.03 / Горбунова Татьяна Ивановна. – Екатеринбург, 2015. – 359 с.
4. Горбунова, Т.И., Первова, М.Г., Салоутин, В.И., Чупахин, О.Н. Галогенирование производных бифенила // Журнал органической химии. – 2019. – Т. 55, № 7. – С. 1089–1092.
5. Горбунова, Т.И. Химическая функционализация полихлорированных бифенилов: новые достижения / Т.И. Горбунова, М.Г. Прегова, В.И. Салоутин, О.Н. Чупахин [науч. ред. В.В.Лунин] – Екатеринбург: Издательство Уральского Университета. – 2018. – 728 с.
6. Горбунова Т.И., Егорова Д.О., Салоутин В.И., Чупахин О.Н. Аэробная бактериальная деструкция полихлорбифенилов и их гидрокси- и метоксипроизводных // Успехи химии. – 2024. – Т. 93, № 11 – Статья RCR5138
7. Егорова, Д.О., Максимов, А.С., Шестакова, Е.А., Васянин, А.Н., Плотникова, Е.Г. Бактериальная деструкция смеси, полученной при химической модификации полихлорированных бифенилов полиэтиленгликолями // Биотехнология. – 2013. – Т. 29, № 4. – С. 56–64.
8. Егорова, Д.О., Плотникова, Е.Г., Мехаев, А.В., Ятлук, Ю.Г., Демаков, В.А., Чупахин, О.Н. Утилизация полихлорбифенилов с использованием химических и биологических процессов // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 441, № 3. – С. 328–331.

9. Егорова, Д.О., Фарофонова, В.В., Шестакова, Е.А., Андреев, Д.Н., Максимов, А.С., Васянин, А.Н., Бузмаков, С.А., Плотникова, Е.Г. Биоремедиация почвы, длительное время загрязненной дихлордифенилтрихлорэтаном, с использованием аэробного штамма *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628 // Почвоведение. – 2017. – № 10. – С. 1262–1269.
10. Зайцев, Г.М., Карасевич, Ю.Н. Подготовительный метаболизм 4-хлорбензойной кислоты у *Arthrobacter globiformis* // Микробиология. – 1981. – Т. 50, № 2. – С. 423–428.
11. Маниатис, Т., Фрич, Э., Сэмбрук, Дж. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 390 с.
12. Нетрусов, А. И., Егорова, М. А., Захарчук, Л. М. и др. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений; под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр “Академия”, 2005. – 608 с.
13. Первова, М.Г., Плотникова, К.А., Горбунова, Т.И., Салоутин, В.И., Чупахин, О.Н. Исследование конгенов полихлорированных бифенилов в технической смеси «Трихлорбифенил» // Журнал общей химии. – 2015. – Т. 85, № 8. – С. 1374–1379.
14. Плотникова, Е.Г., Шумкова, Е.С., Соляникова, И.П., Головлева, Л.А. Особенности разложения 4-хлорбифенила и 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Rhodococcus ruber* P25 // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 2. – С. 159–159.
15. Шумкова, Е.С., Егорова, Д.О., Боронникова, С.В., Плотникова, Е.Г. Полиморфизм генов *bphA* бактерий-деструкторов бифенила/хлорированных бифенилов // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 4. – С. 638–638.
16. Adebusoye, S.A., Iori, M.O., Picardal, F.W., Amund, O.O. Metabolism of chlorinated biphenyls: Use of 3,3'- and 3,5-dichlorobiphenyl as sole sources of carbon by natural species of *Ralstonia* and *Pseudomonas* // Chemosphere. – 2008. – Vol. 70. – P. 656–663.
17. Agulló, L. Genetics and Biochemistry of Biphenyl and PCB Biodegradation. In: Rojo F. (eds) Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of

Hydrocarbon and Lipid Microbiology/ L. Agulló, D.H. Pieper, M. Seeger // Springer, Cham. – 2019. – P. 595–622.

18. Aken, B.V., Correa, P.A., Schnoor, J.L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises // Environmental Science and Technology. – 2010. – Vol. 44, № 8. – P. 2767–2776.

19. Alawi, M.A., Al-Tameemi, F.T. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in human adipose tissue from Baghdad, Iraq // Toxin Reviews. – 2016. – Vol. 35. – P. 83–89.

20. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. – 1997. – Vol. 25, № 17. – P. 3389–3402.

21. Ampleman, M.D., Martinez, A., DeWall, J., Rawn, D.F.K., Hornbuckle, K.C., Thorne, P.S. Inhalation and dietary exposure to PCBs in urban and rural cohorts via congener-specific measurements // Environmental Science and Technology. – 2015. – Vol. 49. – P. 1156–1164.

22. Anan'ina, L. N., Yastrebova, O. V., Demakov, V. A., Plotnikova, E. G. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia // Antonie van Leeuwenhoek. – 2011. – Vol. 100. – P. 309–316.

23. Anokhina, T. O., Esikova, T. Z., Gafarov, A. B., Polivtseva, V. N., Baskunov, B. P., Solyanikova, I. P. Alternative naphthalene metabolic pathway includes formation of ortho-phthalic acid and cinnamic acid derivatives in the *Rhodococcus opacus* strain 3D // Biochemistry (Moscow). – 2020. – Vol. 85. – P. 355–368.

24. Arensdorf, J.J., Focht, D.D. Formation of chlorocatechol *meta* cleavage products by a pseudomonad during metabolism of monochlorobiphenyls // Applied and Environmental Microbiology. – 1994. – Vol. 60, № 8. – P. 2884–2889.

25. Aresta, M., Dibenedetto, A., Fragale, C., Giannoccaro, P., Pastore, C., Zammiello, D., Ferragina, C. Thermal desorption of polychlorobiphenyls from contaminated soils and their hydrodechlorination using Pd- and Rh-supported catalysts // Chemosphere. – 2008. – Vol. 70. – P. 1052–1058.

26. Baeten, L., Reumers, J., Tur V., Stricher, F., Serrano, L., Schymkowitz, J., Rousseau, F. Reconstruction of protein backbones from the BriX collection of canonical protein fragments // PLoS Computational Biology. – 2008. – Vol. 4, № 8. – Article e1000083.
27. Baggi, G., Catelani, D., Marchetto, R., Papaleo, M.C. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: effect of the position and number of halo-substituents // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2008. – Vol. 62, № 1. – P. 57–64.
28. Baig, M.S., Manickam, N. Homology modeling and docking studies of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl-2,3-dioxygenase involved in degradation of polychlorinated biphenyls // International Journal of Biological Macromolecules. – 2010. – Vol.46. – P. 47–53
29. Bako, C.M., Mattes, T.E., Marek, R.F., Hornbuckle, K.C., Schnoor, J.L. Biodegradation of PCB congeners by *Paraburkholderia xenovorans* LB400 in presence and absence of sediment during lab bioreactor experiments // Environmental Pollution. – 2021. – Vol. 271. – Article 116364.
30. Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol. 69, № 6. – P. 3350–3358.
31. Barriault D., Plante M. M., Sylvestre M. Family shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase //Journal of bacteriology. – 2002. – Vol. 184. – №. 14. – P. 3794–3800.
32. Bedard, D.L., Brennan, M.J. *Alcaligenes eutrophus* for biodegrading PCBS // US Patent N4843007. – 1989.
33. Bedard, D.L., Brennan, M.J. Method for bioremediation PCBS // US Patent N4876201. – 1989.
34. Berg, M.V., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyaama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R.E. The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic

equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds // *Toxicological Sciences*. – 2006. – Vol. 93. – P. 223–241.

35. Bhalla, R., Tehrani, R., Van Aken, B. Toxicity of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) using the bioluminescent assay Microtox // *Ecotoxicology*. – 2016. – Vol. 25. – P. 1438–1444.

36. Bhatt, P., Kumar, M., Mudliar, S., Chakrabarti, T. Plasmid-mediated catabolism for the removal of xenobiotics from the environment // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 420. – Article 126618.

37. Bhattacharya, A., Khare, S.K. Biodegradation of 4-chlorobiphenyl by using induced cells and cell extract of *Burkholderia xenovorans* // *Bioremediation Journal*. – 2017. – Vol. 21. – P. 109–118.

38. Blanco-Moreno, R., Saez, L.P., Luque-Almagro, V.M., Roldan, M.D., Moreno-Vivian, C. Isolation of bacterial strains able to degrade biphenyl, diphenyl ether and the heat transfer fluid used in thermo-solar plants // *New Biotechnology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 35–41.

39. Bopp, L. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400 // *Journal of Industrial Microbiology*. – 1986. – Vol. 1. – P. 23–29.

40. Bopp, L. *Pseudomonas putida* capable of degrading PCBs // US Patent N 4843009. – 27.06.1989.

41. Bopp, L. Method for biodegrading PCBs // US Patent N 5009999. – 1991.

42. Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure // *Science*. – 1991. – Vol. 253, № 5021. – P. 164–170.

43. Braouezec, C., Enriquez, B., Blanchard, M., Chevreuil, M., Teil, M. J. Cat serum contamination by phthalates, PCBs, and PBDEs versus food and indoor air // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – P. 9574–9584.

44. Bujnicki, J.M. Protein-structure prediction by recombination of fragments // *ChemBiochem*. – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 19-27.

45. Bystroff, C., Simons, K.T., Han, K.F., Baker, D. Local sequence–structure correlations in proteins // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1996. – Vol. 7, № 4. – P. 417–421.
46. Cai, M., Song, G., Li, Y., Du, K. A novel Aroclor 1242-degrading culturable endophytic bacterium isolated from tissue culture seedlings of *Salix matsudana* f. *pendula* Schneid // *Phytochemistry Letters*. – 2018. – Vol. 23. – P. 66–72
47. Camara, B., Herrera, C., Gonzalez, M., Couve, E., Hofer, B., Seeger, M. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway // *Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 6, № 8. – P. 842–850.
48. Cao, Y.M., Xu, L., Jia, L.Y. Analysis of PCBs degradation abilities of biphenyl dioxygenase derived from *Enterobacter* sp. LY402 by molecular simulation // *New Biotechnology*. – 2011. – Vol. 29, № 1. – P. 90–98.
49. Carpenter, D.O. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Routes of exposure and effects on human health // *Reviews on Environmental Health*. – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 1–23.
50. Carro, N., Garcia, I., Ignacio, M., Mouteira, A. Polychlorinated dibenzo-P-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in bivalve mollusk from Galician Rias (N.W., SPAIN) // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 197. – P. 782–792.
51. Cervantes-González, E., Guevara-Garcia, M.A., Garcia-Mena, J., Ovando-Medina, V.M. Microbial diversity assessment of polychlorinated biphenyl-contaminated soils and the biostimulation and bioaugmentation processes // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2019. – Vol. 191, № 3. – Article 118.
52. Chang, Y.C., Takada, K., Choi, D., Toyama, T., Sawada, K., Kikuchi, S. Isolation of biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading bacteria and their degradation pathway // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 170, № 2. – P. 381–398.
53. Chaudhry, G.R., Chapalamadugu, S. Biodegradation of halogenated organic compounds // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1991. – Vol. 55, № 1. – P. 59–79.

54. Chen, J.R., Kim, D., Park, J.S., Gil, K.I., Yen, T.F. Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls (PCBs) by ultrasound-assisted chemical process (UACP) // *Environmental Earth Sciences*. – 2013. – Vol. 69. – P. 1025–1032.
55. Chen, S., Qin, Z.L., Quan, X., Zhang, Y.B., Zhao, H.M. Electrocatalytic dechlorination of 2,4,5-trichlorobiphenyl using an aligned carbon nanotubes electrode deposited with palladium nanoparticles // *Chinese Science Bulletin*. – 2010. – Vol. 55. – P. 358–364.
56. Chen, S.J., Tian, M., Zheng, J., Zhu, Z.C., Luo, Y., Luo, X.J., Mai, B.X. Elevated levels of polychlorinated biphenyls in plants, air, and soils at an e-waste site in southern China and enantioselective biotransformation of chiral PCBs in plants // *Environmental Science and Technology*. – 2014. – Vol. 48. – P. 3847–3855.
57. Christopher, L.C., Nathalie, Y.R.A., Pravindra, K., Mathew, N.C., Sangita, C.S., Justin, B.P., Lindsay, D.E., Jeffrey, T.B. Structural characterization of *Pandoraea pnomenus* B-356 biphenyl dioxygenase reveals features of potent polychlorinated biphenyl-degrading enzymes // *PLoS ONE*. – 2013. – Article e52550.
58. Colovos, C., Yeates, T.O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions // *Protein Science*. – 1993. – Vol. 2, № 9. – P. 1511–1519.
59. Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J., Häggblom, M.M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67, № 6. – P. 2683–2691.
60. Das, N., Basak, L.V.G., Salam, J.A., Abigail, E.A. Application of biofilms on remediation of pollutants-an overview // *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. – 2017. – Vol. 2. – P. 783–790.
61. De Castro, B.R., Korrick, S.A., Spengler, J.D., Soto, A.M. Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment // *Environmental Science and Technology*. – 2006. – Vol. 40, № 9. – P. 2819–2825.
62. Dean, L. E., Wang, H., Bullert, A. J., Wang, H., Adamcakova-Dodd, A., Mangalam, A. K., Thorne, P. S., Ankrum, J. A., Klingelutz, A. J., Lehmler, H.-J. Inhalation of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (PCB52) causes changes to the gut microbiome

throughout the gastrointestinal tract // *Journal of Hazardous Materials*. – 2024. – Vol. 480. – Article 135999.

63. Devi, N.L. Persistent Organic Pollutants (POPs): Environmental risks, toxicological effects, and bioremediation for Environmental Safety and Challenges for Future Research. In: Saxena G., Bharagava R. (eds) *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. – 2020. – Springer, Singapore. – P. 53–76.

64. Dhindwal, S., Gomez-Gil, L., Neau, D.B., Pham, T.T.M., Sylvestre, M., Eltis, L.D., Bolin, J.T., Kumar, P. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase // *Journal of Bacteriology*. – 2016. – Vol. 198, №. 10. – P. 1499–1512.

65. Di Gregorio, S., Azaizeh, H., Lorenzi, R. Biostimulation of the autochthonous microbial community for the depletion of polychlorinated biphenyls (PCBs) in contaminated sediments // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2013. – Vol. 20. – P. 3989–3999.

66. Dong, X.S., Fushinobu, S., Fukuda, E., Terada, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Nojiri, H., Omori, T., Shoun, H., Wakagi, T. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01 // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – Vol. 187, № 7. – P. 2483–2490.

67. Dudasova, H., Derco, J., Sumegova, L., Dercova, K., Laszlova, K. Removal of polychlorinated biphenyl congeners in mixture Delor 103 from wastewater by ozonation vs/and biological method // *Journal of Hazardous Materials*. – 2017. – Vol. 321. – P. 54–61.

68. Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C., Staley, J.T. *Cycloclasticus pugetii* gen. nov. sp. nov. an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1995. – Vol. 45, № 1. – P. 116–123.

69. Eckhardt, S., Breivik, K., Mano, S., Stohl, A. Record high peaks in PCB concentrations in the Arctic atmosphere due to long-range transport of biomass burning emissions // *Atmospheric Chemistry and Physics*. – 2007. – Vol. 7. – P. 4527–4536.

70. Eddy, S.R. Profile hidden Markov models // *Bioinformatics*. – 1998. – Vol. 14, № 9. – P. 755–763.
71. Egorova, D.O., Shumkova, E.S., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G. Degradation of chlorinated biphenyls and products of their bioconversion by *Rhodococcus* sp. B7a strain // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2010. – Vol. 46, № 6. – P. 592–598.
72. 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 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2013. – Vol. 49. – No. 3. – P. 244–255.
73. Egorova D.O., Buzmakov S.A., Nazarova E.A., Andreev D.N., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628 // *Water Air Soil Pollution*. – 2017. – V. 228. – P. 183–199.
74. Egorova, D.O., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G., Pervova, M.G. Specific features of chlorinated biphenyl decomposition by *Rhodococcus wratislaviensis* strain KT112-7 under high salt conditions // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2018. – Vol. 54. – P. 252–261.
75. Egorova, D.O., Buzmakov, S.A., Nazarova, E.A., Andreev, D.N., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – Vol. 400. – Article 123328.
76. Egorova, D., Olsson, B., Kir'yanova, T., Plotnikova, E. An assessment of the degradation potential and genomic insights towards hydroxylated biphenyls by *Rhodococcus opacus* strain KT112-7 // *Current Genomics*. – 2024. – Vol. 25. – Article e13892029319746.
77. Elangovan, S., Anderson, T.A., Pingitore, N.E., Donnelly, K.C., Bonner, J.S. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental Fate, Challenges, and Bioremediation // *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds*. – 2019. – P. 165–188.

78. Emily, E. U.S. Food Still Tainted with Old Chemicals // Environmental Health News. – 2010. – April 22.
79. Falahudin, D., Herandarudewi, S. M. C., Hukom, F. D., Arifin, Z., Wulandari, I., Sudaryanto, A., Hoang, A. Q., Watanabe, I., Takahashi, S. The first full-congener analysis of 209 polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blubber of short-finned pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*) stranded along the coast of Savu Island, Indonesia // Science of The Total Environment. – 2023. – Vol. 879. – Article 163008.
80. Fang, G., Wu, W., Deng, Y., Zhou, D. Homogeneous activation of persulfate by different species of vanadium ions for PCBs degradation // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Vol. 323. – P. 84–95.
81. Fang, G.D., Dionysiou, D.D., Wang, Y., Zhou, D.M. Sulfate radical-based degradation of polychlorinated biphenyls: Effects of chloride ion and reaction kinetics // Journal of Hazardous Materials. – 2012. – Vol. 227-228. – P. 394–401.
82. Fang, Z., Xu, C.C. Near-critical and supercritical water and their applications for biorefineries. – New York: Springer, 2014. – 354 c.
83. Fedi, S., Chirino, B., Zanaroli, G., Zecchini, G., Fava, F. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site // Research in Microbiology. – 2001. – Vol. 152, № 6. – P. 583–592.
84. Ferraro, D.J., Brown, E.N., Yu, C.L., Parales, R.E., Gibson, D.T., Ramaswamy, S. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1 // BMC Structural Biology. – 2007. – Vol. 7. – Article 1.
85. Field, J.A., Sierra-Alvarez, R. Microbial transformation of chlorinated benzoates // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2008. – Vol. 7, № 3. – P. 191-210.
86. Fortin P. D., Fortin, P.D., Lo, A.T.F., Haro, M.A., Kaschabek, S.R., Reineke, W., Eltis, L.D. Evolutionarily divergent extradiol dioxygenases possess higher specificities for polychlorinated biphenyl metabolites // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187. – №. 2. – P. 415-421.

87. Fortin, P. D., Horsman, G. P., Yang, H. M., Eltis, L. D. A glutathione S-transferase catalyzes the dehalogenation of inhibitory metabolites of polychlorinated biphenyls // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – Vol. 188. – No. 12. – P. 4424–4430.
88. Fortin, P.D., Lo, A.T.-F., Kaschabek, S.R., Reineke, W., Eltis, L.D. Directed evolution of a ring-cleaving dioxygenase for polychlorinated biphenyl degradation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 51. – P. 42307–42314.
89. Francisco, P. B. Jr, Ogawa, N., Suzuki, K., Miyashita, K. The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates // *Microbiology*. – 2001. – Vol. 147. – P. 121–133.
90. Francova, K., Belkin, S., Arieli, B., Kulusheva, S., Katz, Y., Friedler, A., Bachrach, S. Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from *Burkholderia* sp. LB400 and *Comamonas testosterone* B-356 to catalyze oxygenation of ortho-hydroxychlorobiphenyls formed from PCBs by plants // *Environmental Pollution*. – 2004. – Vol. 127, № 1. – P. 41–48.
91. Frossard, V., Vagnon, C., Cottin, N., Pin, M., Santoul, F., Naffrechoux, E. The biological invasion of an apex predator (*Silurus glanis*) amplifies PCB transfer in a large lake food web // *Science of the Total Environment*. – 2023. – Vol. 902. – Article 166037.
92. Fukuda, M., Miyazawa, T., Igarashi, T., Nakamura, K., Watanabe, K. Structural alteration of linear plasmids encoding the genes for polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* strain RHA1 // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1998. – Vol. 74, № 1. – P. 169–173.
93. Fukuda, M., Yamaguchi, H., Nagata, Y., Takagi, M. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1994. – Vol. 202, № 2. – P. 850–856.
94. Fukuda, M. *Rhodococcus* Multiple-Enzyme and Parallel-Degradation System for Aromatic Compounds. In: Nojiri H., Tsuda M., Fukuda M., Kamagata Y. (eds) *Biodegradative Bacteria*. Springer, Tokyo. – 2014. – P. 3–18.

95. Furukawa, K., Fujihara, H. Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2008. – Vol. 105, № 5. – P. 433–449.
96. Furusawa, Y., Nagarajan, V., Tanokura, M., Masai, E., Fukuda, M., Senda, T. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 342, № 5. – P. 1041–1052.
97. Gilbert, E.S., Crowley, D.E. Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – Vol. 63, № 5. – P. 1933–1938.
98. Gioia, R., Akindele, A.J., Adebusoye, S.A., Asante, K.A., Tanabe, S., Buekens, A., Sasco, A.J. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in Africa: a review of environmental levels // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – Vol. 21. – P. 6278–6289.
99. Gorbunova, T.I., Pervova, M.G., Saloutin, V.I., Chupakhin, O.N. Synthesis of halogenated biphenyl derivatives for environmental monitoring of pollutants // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2020. – Vol. 90. – P. 2255–2257.
100. Gorbunova, T.I., Egorova, D.O., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus* strains // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 409. – Article 124471.
101. Gorbunova, T.I., Egorova, D.O., Pervova, M.G., Kir'yanova, T.D., Plotnikova, E.G. Degradability of commercial mixtures of polychlorobiphenyls by three *Rhodococcus* strains // *Archives of Microbiology*. – 2022. – Vol. 204, № 8. – P. 534–540.
102. Goto, E., Haga, Y., Kubo, M., Itoh, T., Kasai, C., Shoji, O., Yamamoto, K., Matsumura, C., Nakano, T., Inui, H. Metabolic enhancement of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118) using cytochrome P450 monooxygenase isolated from soil bacterium under the presence of perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and the structural basis of its metabolism // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 210. – P. 376–383.
103. Guo, Z., Yin, H., Wei, X., Zhu, M., Lu, G., Dang, Z. Effects of methanol on the performance of a novel BDE-47 degrading bacterial consortium QY2 in the co-

metabolism process // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 415. – Article 125698.

104. Haddock, J.D., Horton, J.R., Gibson, D.T. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 // Journal of Bacteriology. – 1995. – Vol. 177, № 1. – P. 20–26.

105. Halfadji, A., Touabet, A. Determination of 26 polychlorinated biphenyls congeners in soil samples using microwave-assisted extraction with open vessel and gas chromatography // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2018. – Vol. 11, № 4. – P. 209–216.

106. Han, J.H., You, F., Li, P., Dong, Q., Qin, S.H., Fan, D.D. Properties and reliability evaluation of consecutive pyrolysis and incineration disposal process for FR-4 waste printed circuit boards // Procedia Engineering. – 2018. – Vol. 211. – P. 205–214.

107. Han, Z., Lin, Q., Zhang, S., Zhou, X., Li, S., Sun, F., Shen, C., Su, X. High PCBs mineralization capability of a resuscitated strain *Bacillus* sp. LS1 and its survival in PCB-contaminated soil // Science of the Total Environment. – 2023. – Vol. 856. – Article 159224.

108. Hatamian-Zarmi, A., Shojaosadati, S.A., Vasheghani-Farahani, E., Hosseinkhani, S., Emamzadeh, A. Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – Vol. 63. – P. 788–794.

109. Hauschild, J.E., Watson, G.K., Connors, M., Wong, J.Y. Identification of an alternative 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 and cloning of the gene // Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – Vol. 62, № 8. – P. 2940–2946.

110. Hernandez, B.S., Durrieu, C., Bordenave, S., Casellas, C., Patureau, D. Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil // Biodegradation. – 1997. – Vol. 8, № 3. – P. 153–158.

111. Herrick, R.F., Stewart, J.H., Allen, J.G. Review of PCBs in US schools: A brief history, estimate of the number of impacted schools, and an approach for evaluating indoor air samples // *Environmental Science and Pollution Research International*. – 2016. – Vol. 23. – P. 1975–1985.
112. Hiraoka, Y., Kimbara, K. Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68, № 4. – P. 2031–2035.
113. Hong, X.M., Zhao, L., Dong, Y.H., Chen, H., Zhong, M. Enhanced Fenton degradation of polychlorinated biphenyls in capacitor-oil-contaminated soil by chelating agents // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – Vol. 333. – P. 370–379.
114. Hoostal, M.J., Bouzat, J.L. Spatial patterns of *bphA* gene diversity reveal local adaptation of microbial communities to PCB and PAH contaminants // *Microbial Ecology*. – 2016. – Vol. 72. – P. 559–570.
115. Horvátová, H., Lászlóva, K., Dercová, K. Bioremediation of PCB-contaminated shallow river sediments: the efficacy of biodegradation using individual bacterial strains and their consortia // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 193. – P. 270–277.
116. Horváthová, H., Lászlóva, K., Dercová, K. Bioremediation vs. nanoremediation: Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBS) using integrated remediation approaches // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2019. – Vol. 230. – P. 1–11.
117. Hu, D., Martinez, A., Hornbuckle, K.C. Sedimentary records of non-aro-chlor and aro-chlor PCB mixtures in the Great Lakes // *Journal of Great Lakes Research*. – 2011. – Vol. 37, № 2. – P. 359–364.
118. Huang, J., Matsumura, T., Yu, G., Deng, S., Yamauchi, M., Yamazaki, N., Weber, R. Determination of PCBs, PCDDs and PCDFs in insulating oil samples from stored Chinese electrical capacitors by HRGC/HRMS // *Chemosphere*. – 2011. – Vol. 85. – P. 239–246.
119. Ilori, M.O., Robinson, G.K., Adebuseye, S.A. Aerobic mineralization of 4,4'-dichlorobiphenyl and 4-chlorobenzoic acid by a novel natural bacterial strain that grows poorly on benzoate and biphenyl // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 24. – P. 1259–1265.

120. Ilori, M.O., Robinson, G.K., Adebusoye, S.A. Degradation and mineralization of 2-chloro-, 3-chloro- and 4-chlorobiphenyl by a newly characterized natural bacterial strain isolated from an electrical transformer fluid-contaminated soil // *Journal of Environmental Sciences (China)*. – 2008. – Vol. 20. – No. 10. – P. 1250–1257.
121. Isaac, P., Sánchez, L.A., Bourguignon, N., Cabral, M.E., Ferrero, M.A. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia, Argentina // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – Vol. 82. – P. 207–214.
122. Ivanescu, V. Human health risk assessment posed by PCB exposure in Bucharest Area // *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. – 2015. – Vol. 6. – P. 453–458.
123. Javorska, H., Tlustos, P., Kaliszova, R. Distribution of polychlorinated biphenyl congeners in root vegetables // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2011. – Vol. 20. – P. 93–99.
124. Jayanna, S.K., Gayathri, D. Degradation of 2,4-dichlorobiphenyl via *meta*-cleavage pathway by *Pseudomonas* sp. consortium // *Current Microbiology*. – 2015. – Vol. 70. – P. 871–877
125. Jiang, D., Zeng, G., Huang, D., Chen, M., Zhang, C., Huang, C., Wan, J. Remediation of contaminated soils by enhanced nanoscale zero valent iron // *Environmental Research*. – 2018. – Vol. 163. – P. 217–227.
126. Jones, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 292. – P. 195–202.
127. Jones, D.T., McGuffin, L.J. Assembling novel protein folds from super-secondary structural fragments // *Proteins*. – 2003. – Vol. 53. – P. 480–485.
128. Jones, D.T., Singh, T., Kosciolk, T., Tetchner, S. MetaPSICOV: combining coevolution methods for accurate prediction of contacts and long range hydrogen bonding in proteins // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31. – P. 999–1006.
129. Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. A new approach to protein fold recognition // *Nature*. – 1992. – Vol. 358. – P. 86–89.

130. Jones, T.A., Thirup, S. Using known substructures in protein model building and crystallography // *EMBO Journal*. – 1986. – Vol. 5. – P. 819–822.
131. Jyothi, P., Achari, G.G., Langford, C.H. Reductive dechlorination of PCBs using photocatalyzed UV light // *Clean: Soil, Air, Water*. – 2012. – Vol. 40. – P. 455–460.
132. Kacalkova, L., Tlustos, P. The uptake of persistent organic pollutants by plants // *Central European Journal of Biology*. – 2011. – Vol. 6. – P. 223–235.
133. Kahlon, R.S. Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas* // *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*. – Cham: Springer, 2016. – P. 343–417.
134. Kanteev, M., Bregman-Cohen, A., Deri, B., Shahar, A., Adir, N., Fishman, A. A crystal structure of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with bound substrate provides insights into the enzymatic mechanism // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2015. – Vol. 1854. – No. 12. – P. 1906–1913.
135. Khan, A.A., Fuhs, G.W., Finette, B.A., Boyd, S.A., Fathepure, B.Z., Erickson, B.D. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1996. – Vol. 46, № 2. – P. 466–469.
136. Kikuchi, Y., Yasukochi, Y., Nagata, Y., Fukuda, M., Takagi, M. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102 // *Journal of Bacteriology*. – 1994. – Vol. 176, No. 14. – P. 4269–4276.
137. Kim, C.K., Koh, S.C., Kimbara, K., Fukuda, M., Takagi, M., Furukawa, K. Structure of the *pcbC* gene encoding 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase of *Pseudomonas* sp. P20 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1996. – Vol. 226, № 1. – P. 15–20.
138. Kim, K., Son, S.H., Kim, K.S., Kim, K., Kim, Y.C. Environmental effects of supercritical water oxidation (SCWO) process for treating transformer oil contaminated

with polychlorinated biphenyls // *Chemical Engineering Journal*. – 2010. – Vol. 165. – P. 170–174.

139. Kim, S., Picardal, F.W. Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67. – P. 1953–1955.

140. Kir'yanova, T.D., Egorova, D.O., Gorbunova, T.I., Pervova, M.G. Bacterial degradation of PCB 70 and its hydroxy derivatives is an environmentally friendly way to destroy POPs // *BIO Web of Conferences*. – 2023. – Vol. 57. – Article 09002.

141. Kirichenko, V.E., Pervova, M.G., Promyshlennikova, E.P., Pashkevich, K.I. Identification of isomeric polychlorinated biphenyls in technical product Sovol // *Analitika i Kontrol'*. – 2000. – Vol. 4. – P. 41–44.

142. Kitagawa, W., Miyauchi, K., Masai, E., Fukuda, M. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – Vol. 183, No. 22. – P. 6598–6606.

143. Kolar, A.B., Hršak, D., Fingler, S., Četković, H., Petrić, I., Kolić, N.U. PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2007. – Vol. 60. – P. 16–24.

144. Korrick, S.A., Altshul, L. High breast milk levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) among four women living adjacent to a PCB-contaminated waste site // *Environmental Health Perspectives*. – 1998. – Vol. 106. – P. 513–518.

145. Korwel, I.K., Wu, X., Wang, K., Lehmler, H.J. Identification of lipidomic markers of chronic 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) exposure in the male rat liver // *Toxicology*. – 2017. – Vol. 390. – P. 124–134.

146. Krivov, G.G., Shapovalov, M.V., Dunbrack, R.L. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4 // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 77. – P. 778–795.

147. Kuhlman, B., Bradley, P. Advances in protein structure prediction and design // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20, № 11. – P. 681–697.

148. Kumar, P., Mohammadi, M., Dhindwal, S., Pham, T.T.M., Bolin, J.T., Sylvestre, M. Structural insights into the metabolism of 2-chlorodibenzofuran by an evolved biphenyl dioxygenase // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – Vol. 421. – P. 757–762.

149. Kumar, P., Mohammadi, M., Viger, J.F., Barriault, D., Leticia, G.G., Lindsay, D.E., Jeffrey, B.T., Michel, S. Structural insight into the expanded PCB-degrading abilities of a biphenyl dioxygenase obtained by directed evolution // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 405. – P. 531–547.

150. Kunisue, T., Tanabe, S. Hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the blood of mammals and birds from Japan: lower chlorinated OH-PCBs and profiles // *Chemosphere*. – 2009. – Vol. 74. – No. 7. – P. 950–961.

151. Lavandier, R., Quinete, N., Hauser Davis, R.A., Dias, P.S., Taniguchi, S., Montone, R., Moreira, I. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from an estuary in the southeastern coast of Brazil // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 90. – P. 2435–2443.

152. Leigh, M.B., Petra, P., Martina, M., Macek, T., Nagle, D.P., Fletcher, S.J. Polychlorinated biphenyl (PCB) degrading bacteria associated with trees in a PCB contaminated site // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72. – P. 2331–2342.

153. Leijts, M.M., Linden, L.M.V., Koppe, J.G., Olie, K., van Aalderen, W.M.C., ten Tusscher, G.W. The influence of perinatal and current dioxin and PCB exposure on reproductive parameters (sex-ratio, menstrual cycle characteristics, endometriosis, semen quality, and prematurity): a review // *Biomonitoring*. – 2014. – Vol. 1. – P. 1–15.

154. Letcher R. J., Li H. X., Chu S. G. Determination of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) in blood plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem quadrupole mass spectrometry // *Journal of analytical toxicology*. – 2005. – Vol. 29. – №. 4. – P. 209–216.

155. Li, C., Liu, J., Wu, N., Pan, X., Feng, J., Al-Basher, G., Allam, A. A., Qu, R., Wang, Z. Photochemical formation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-

PCBs) from decachlorobiphenyl (PCB-209) on solids/air interface // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – Vol. 378. – Article 120758.

156. Ling, J., Yan, Z., Liu, X., Men, S., Wei, C., Wang, Z., Zheng, X. Health risk assessment and development of human health ambient water quality criteria for PCBs in Taihu Basin, China // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 920. – Article 170669.

157. Lisa, A.R., Du, S., Fennell, D.E., Cavallo, G.J. Evidence for widespread dechlorination of polychlorinated biphenyls in groundwater landfills and wastewater collection systems // *Environmental Science and Technology*. – 2010. – Vol. 44, № 22. – P. 7534–7540.

158. Liu, C., Wei, B.K., Bao, J.S., Wang, Y., Hu, J.C., Tang, Y.E., Chen, T., Jin, J. Polychlorinated biphenyls in the soil-crop-atmosphere system in e-waste dismantling areas in Taizhou: concentrations, congener profiles, uptake, and translocation // *Environmental Pollution*. – 2020. – Vol. 257. – Article 113622.

159. Liu, J., Schnoor, J.L. Uptake and translocation of lesser-chlorinated polychlorinated biphenyls (PCBs) in whole hybrid poplar plants after hydroponic exposure // *Chemosphere*. – 2008. – Vol. 73. – P. 1608–1616.

160. Liu, X., Yu, G. Combined effect of microwave and activated carbon on the remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 63. – P. 228–235.

161. Liu, Z.Q. Expression of biphenyl dioxygenase and the binding properties with substrates // *Dalian University of Technology*. – Dalian, 2012.

162. Liu T. T. et al. Functional characterization of a gene cluster involved in gentisate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 90. – P. 671–678.

163. Liz, J.A.Z.E., Jan-Roblero, J., de la Serna, J.Z.D., de León, A.V.P., Hernández-Rodríguez, C. Degradation of polychlorinated biphenyl (PCB) by a consortium obtained from a contaminated soil composed of *Brevibacterium*, *Pandora* and *Ochrobactrum* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 25. – P. 165–170.

164. Lu, J.Y., Du, X., Lipscomb, G. Cleaning membranes with focused ultrasound beams for drinking water treatment // IEEE Ultrasonics Symposium (IUS). – 2009. – P. 1195–1198.
165. Luo, A., Wu, Y.-R., Xu, Y., Kan, J., Qiao, J., Liang, L., Huang, T., Hu, Z. Characterization of a cytochrome P450 monooxygenase capable of high molecular weight PAHs oxidation from *Rhodococcus* sp. P14 // Process Biochemistry. – 2016. – Vol. 51, No. 12. – P. 2127–2133.
166. Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles // Nature. – 1992. – Vol. 356, № 6364. – P. 83–85.
167. Macková, M., Dowling, D., Macek, T. Biotransformation of PCBs by plants and bacteria—consequences of plant-microbe interactions // European Journal of Soil Biology. – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 233–241.
168. Mahire, S., Tiwana, A. S., Khan, A., Nalawade, P. M., Bandekar, G., Trehan, N., Mukkannawar, U., Kaur, S., Pandit, V., Kamble, P. N. Accumulation and effects of persistent organic pollutants and biogeographical solutions: appraisal of global environment // Arabian Journal of Geosciences. – 2023. – Vol. 16. – No. 10. – Article 570.
169. Margesin, R., Schinner, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2001. – Vol. 56, № 5-6. – P. 650–663.
170. Marulanda, V., Bolanos, G. Supercritical water oxidation of a heavily PCB-contaminated mineral transformer oil: laboratory-scale data and economic assessment // Journal of Supercritical Fluids. – 2010. – Vol. 54. – P. 258–265.
171. Masai, E., Yamada, A, Healy, JM., Hatta, T., Kimbara, K., Fukuda, M., Yano, K. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Vol. 61. – №. 6. – P. 2079–2085.
172. Master E. R., Mohn W. W. Induction of *bphA*, encoding biphenyl dioxygenase, in two polychlorinated biphenyl-degrading bacteria, psychrotolerant *Pseudomonas* strain Cam-1 and mesophilic *Burkholderia* strain LB400 // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67. – №. 6. – P. 2669–2676.

173. McLachlan, M.S., Undeman, E., Zhao, F., MacLeod, M. Predicting global scale exposure of humans to PCB 153 from historical emissions // *Environmental Science: Processes & Impacts*. – 2018. – Vol. 20. – P. 747–756.
174. Mikolasch, A., Donath, M., Reinhard, A., Herzer, C., Zayadan, B., Urich, T., Schauer, F. Diversity and degradative capabilities of bacteria and fungi isolated from oil-contaminated and hydrocarbon-polluted soils in Kazakhstan // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 103. – P. 7261–7274.
175. Mizukami-Murata, S., Sakakibara, F., Fujita, K., Fukuda, M., Kuramata, M., Takagi, K. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil // *Chemosphere*. – 2016. – Vol. 165. – P. 173–182.
176. Mohammadi, M., Viger, J.F., Kumar, P., Barriault, D., Bolin, J.T., Sylvestre, M. Retuning rieske-type oxygenases to expand substrate range // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – P. 27612–27621.
177. Mondello, F.J., Turcich, M.P., Lobos, J.H., Erickson, B.D. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – Vol. 63, № 8. – P. 3096–3103.
178. Moody, J., Doerge, D., Freeman, J., Cerniglia, C. Degradation of biphenyl by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 58. – P. 364–369.
179. Moon, J., Chun, J., Kang, J.W., Oh, K.H. Characterization of the Gene Encoding Catechol 2,3-Dioxygenase from *Achromobacter xylosoxidans* KF701 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1997. – Vol. 238, № 2. – P. 430–435.
180. Mullin, M.D., Pochini, C.M., McGrindle, M.R., Romkes, M., Safe, S.H., Safe, L.M. High-resolution PCB analysis: synthesis and chromatographic properties of all 209 PCB congeners // *Environmental Science and Technology*. – 1984. – Vol. 18. – P. 468–476.

181. Murinová, S., Dercová, K. Potential Use of newly isolated bacterial strain *Ochrobactrum anthropi* in bioremediation of polychlorinated biphenyls // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2014. – Vol. 225. – Article 1980.
182. Murinová, S., Dercová, K., Dudášová, H. Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2014. – Vol. 91. – P. 52–59.
183. Murugan, K., Vasudevan, N. Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 157. – P. 40–60.
184. Na, K. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., Kato, J. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2005. – Vol. 99, No. 4. – P. 378–382.
185. Nazarov, A.V., Egorova, D.O., Makarenko, A.A., Demakov, V.A., Plotnikova, E.G. Ecological-microbiological assessment of polychlorinated biphenyl-contaminated grounds // *Human Ecology*. – 2016. – № 3. – P. 3–8.
186. Negret-Bolagay, D., Zamora-Ledezma, C., Chuya-Sumba, C., De Sousa, F. B., Whitehead, D., Alexis, F., Guerrero, V. H. Persistent organic pollutants: the trade-off between potential risks and sustainable remediation methods // *Journal of Environmental Management*. – 2021. – Vol. 300. – Article 113737.
187. Nishi, A., Tominaga, K., Furukawa, K. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715 // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – Vol. 182, № 7. – P. 1949–1955.
188. Niu, J.F., Yang, Z.F., Shen, Z.Y., Wang, L.L. QSPRs for the prediction of photo degradation half-life of PCBs in n-hexane // *SAR and QSAR in Environmental Research*. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 173–182.
189. Nogales, B., Moore, E.R., Abraham, W.R., Timmis, K.N. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67, № 4. – P. 1874–1884.

190. Ohtsubo, Y., Delawary, M., Kimbara, K., Takagi, M., Ohta, A., Nagata, Y. BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, No. 39. – P. 36146–36154.
191. Ovchinnikov, S., Park, H., Kim, D.E., DiMaio, F., Baker, D. Protein structure determination using metagenome sequence data // *Science*. – 2017. – Vol. 355. – P. 294–298.
192. Parales, R.E., Resnick, S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases // *Pseudomonas*. – Boston, MA: Springer, 2006. – P. 287-340.
193. Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A.A., Massacci, A. Phytoremediation potential of polychlorinated biphenyls (PCBs): a review // *Journal of Hazardous Materials*. – 2014. – Vol. 278. – P. 189–202.
194. Pathiraja, G., Egodawatta, P., Goonetilleke, A., Te'o, V.S.J. Effective degradation of polychlorinated biphenyls by a facultative anaerobic bacterial consortium using alternating anaerobic aerobic treatments // *Science of the Total Environment*. – 2019. – Vol. 659. – P. 507–514.
195. Pathiraja, G., Egodawatta, P., Goonetilleke, A., Te'o, V.S.J. Solubilization and degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by naturally occurring facultative anaerobic bacteria // *Science of the Total Environment*. – 2019. – Vol. 651. – P. 2197–2207.
196. Paul, C.E., Eggerichs, D., Westphal, A. H., Tischler, D., van Berkel, W. J. H. Flavoprotein monooxygenase: Versatile biocatalysts // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Article 107712.
197. Pellizari, V.H., Seldin, L., Tiedje, J.M. Evaluation of strains isolated by growth on naphthalene and biphenyl for hybridization of genes to dioxygenase probes and polychlorinated biphenyl-degrading ability // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – Vol. 62, № 6. – P. 2053–2058.
198. Perruchon, C., Vasileiadis, S., Rousidou, C., Papadopoulou, E.S., Tanou, G., Samiotaki, M., Garagounis, C., Molassiotis, A., Papadopoulou, K.K., Karpouzas, D.G. Metabolic pathway and cell adaptation mechanisms revealed through genomic, proteomic

and transcription analysis of a *Sphingomonas haloaromaticamans* strain degrading ortho-phenylphenol // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – Article 4599.

199. Petrić, I., Hršak, D., Fingler, S., Udiković-Kolić, N., Bru, D., Martin-Laurent, F. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation // Journal of Soils and Sediments. – 2011. – Vol. 11. – P. 290–300.

200. Pieper, D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2005. – Vol. 67. – P. 170–191.

201. Pieper, D.H., Seeger, M. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 15, № 2-3. – P. 121–138.

202. Plotnikova, E.G., Egorova, D.O., Shumkova, E.S., Solyanikova, I.P., Golovleva, L.A. Degradation of 4-chlorobiphenyl and 4-chlorobenzoic acid by the strain *Rhodococcus ruber* P25 // Microbiology. – 2012. – Vol. 81, № 2. – P. 143–153.

203. Ponce, B.L., Latorre, V.K., González, M., Seeger, M. Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400 // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – Vol. 49. – P. 509–516.

204. Prakash, K., Senthil Kumar, P., Latha, P., Saravanakumar, K., Karuthapandian, S. Design and fabrication of a novel metal-free SiO₂/g-C₃N₄ nanocomposite: A robust photocatalyst for the degradation of organic contaminants // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. – 2018. – Vol. 28. – P. 268–278.

205. Providenti, M.A., Wyndham, R.C. Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the cbaABC-encoded chlorobenzoate catabolism pathway // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 8. – P. 3530–3541.

206. Qiu, L., Wang, H., Wang, X. Isolation and characterization of a cold-resistant PCB209-degrading bacterial strain from river sediment and its application in bioremediation of contaminated soil // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2016. – Vol. 51. – P. 204–210.

207. Qin, W., Fang, G., Wang, Y., Zhou, D. Mechanistic understanding of polychlorinated biphenyls degradation by peroxy monosulfate activated with CuFe₂O₄ nanoparticles: Key role of superoxide radicals // *Chemical Engineering Journal*. – 2018. – Vol. 348. – P. 526–534.
208. Randoll, R., Wondrak, W., Schletz, A. Dielectric strength and thermal performance of PCB-embedded power electronics // *Microelectronics Reliability*. – 2014. – Vol. 54. – P. 1872–1876.
209. Reddy A. V. B., Moniruzzaman M., Aminabhavi T. M. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: Recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis // *Chemical Engineering Journal*. – 2019. – Vol. 358. – P. 1186–1207.
210. Rehmann, L., Daugulis, A.J. Biodegradation of PCBs in two-phase partitioning bioreactors following solid extraction from soil // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2008. – Vol. 99. – P. 1273–1280.
211. Reineke, W. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly // *Annual Review of Microbiology*. – 1998. – Vol. 52. – P. 287–331.
212. Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., Söding, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment // *Nature Methods*. – 2011. – Vol. 9. – P. 173–175.
213. Sadreyev, R., Grishin, N. COMPASS: a tool for comparison of multiple protein alignments with assessment of statistical significance // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 326. – P. 317–336.
214. Saktrakulkla, P., Li, X., Martinez, A., Lehmler, H.-J., Hornbuckle, K. C. Hydroxylated polychlorinated biphenyls are emerging legacy pollutants in contaminated sediments // *Environmental Science & Technology*. – 2022. – Vol. 56. – No. 4. – P. 2269–2278.
215. Sandhu, M., Paul, A.T., Proćków, J., de la Lastra, J.M.P., Jha, P.N. PCB-77 biodegradation potential of biosurfactant producing bacterial isolates recovered from contaminated soil // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – Article 952374.

216. Sandhu, M., Paul, A. T., Jha, P. N. Metagenomic analysis for taxonomic and functional potential of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyl (PCB) degrading bacterial communities in steel industrial soil // PLoS One. – 2022. – Vol. 17. – No. 4. – Article e0266808

217. Sandossi, M., Kuschel, B., Knaut, S., Werner, P., Schmidt, E. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl by biphenyl/chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testosteroni*, strain B-356 // Journal of Industrial Microbiology. – 1991. – Vol. 7. – P. 77–88.

218. Schmid, A., Vereyken, I., Held, M., Witholt, B. Preparative regio- and chemoselective functionalization of hydrocarbons catalyzed by cell free preparations of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2001. – Vol. 11. – No. 4–6. – P. 455–462.

219. Schulz, B., Carlson, L. M., Christensen, K., Weitekamp, C. A., Marek, R. F., Martinez, A., Hornbuckle, K. C., Lehmann, G. M. Comprehensive compilation of congener profiles to support health assessment of environmental exposures to polychlorinated biphenyl mixtures // Environmental Research. – 2024. – Article 120081.

220. Seegal, R.F., Fitzgerald, E.F., Hills, E.A., Wolff, M.S., Haase, R.F., Todd, A.C., Parsons, P., Molho, E.S., Higgins, D.S., Factor, S.A., Marek, K.L., Seibyl, J.P., Jennings, D.L., McCaffrey, R.J. Estimating the half-lives of PCB congeners in former capacitor workers measured over a 28-year interval // Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology. – 2011. – Vol. 21, № 3. – P. 234–246.

221. Seeger, M., Camara, B., Gonzalez, M., Estrella, M., Ponce, B., Meulenberg, C., Pieper, D.H. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400 // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 8. – P. 3614–3621.

222. Seeger, M., Pieper, D.H. Genetics of biphenyl biodegradation and co-metabolism of PCBs // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – 2010. – P. 1179–1200.

223. Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T. Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between NADH-dependent ferredoxin reductase and rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 373. – P. 382–400.
224. Sharma, J.K., Gautam, R.K., Misra, R.R., Kashyap, S.M., Kashyap, S.K., Singh, S.K., Juwarkar, A.A. Degradation of di-through hepta-chlorobiphenyls in clophen oil using microorganisms isolated from long term PCBs contaminated soil // *Indian Journal of Microbiology*. – 2014. – Vol. 54. – P. 337–344.
225. Sharma, J.K., Parmar, P., Parmar, D.K., Sharma, A., Kumar, S., Acharya, C. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – Vol. 25, № 17. – P. 16355–16375.
226. Shi, J., Yang, Y., Zhang, S., Lin, Q., Sun, F., Lin, H., Shen, C., Su, X. New insights into survival strategies and PCB bioremediation potential of resuscitated strain *Achromobacter* sp. HR2 under combined stress conditions // *Journal of Hazardous Materials*. – 2024. – Vol. 465. – Article 133242.
227. Shiki, Y., Kawano, M., Matsuda, M., Morita, M. The characteristic accumulation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) in blood, liver and gallbladder in great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) // *Journal of Environmental Chemistry*. – 2009. – Vol. 19. – Vol. 1. – P. 77–86.
228. Shimizu, S., Kobayashi, H., Masai, E., Fukuda, M. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2001. – Vol. 67, № 5. – P. 2021–2028.
229. Shimura, M., Mukerjee-Dhar, G., Kimbara, K., Nagato, H., Kiyohara, H., Hatta, T. Characterization of biphenyl/chlorobiphenyl-degrading *Pseudomonas* sp. strain KKS102 // *FEMS Microbiology Letters*. – 1999. – Vol. 178. – P. 89–93.
230. Shumkova, E. S., Egorova, D. O., Boronnikova, S. V., Plotnikova, E. G. Polymorphism of the *bphA* genes in bacteria destructing biphenyl/chlorinated biphenyls // *Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 49. – P. 569–580.

231. Shuttleworth, K.L., Uyttebroek, M., Willems, A., Lebbe, L., Logan, N.A., De Vos, P. Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* strains // *Molecules and Cells*. – 2000. – Vol. 10, № 2. – P. 199–205.
232. Simons, K.T., Kooperberg, C., Huang, E., Baker, D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions // *Journal of Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 268. – P. 209–225.
233. Simpson, A. K., Drysdale, M., Gamberg, M., Froese, K., Brammer, J., Dumas, P., Ratelle, M., Skinner, K., Laird, B. D. Human biomonitoring of dioxins, furans, and non-ortho dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in blood plasma from Old Crow, Yukon, Canada (2019) // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 923. – Article 171222.
234. Slater, H., Gouin, T., Leigh, M.B. Assessing the potential for rhizoremediation of PCB contaminated soils in northern regions using native tree species // *Chemosphere*. – 2011. – Vol. 84. – P. 199–206.
235. Söding, J. Protein homology detection by HMM–HMM comparison // *Bioinformatics*. – 2005. – Vol. 21. – P. 951–960.
236. Solyanikova, I.P., Golovleva, L.A., Shumkova, E.S., Baskunov, B.P. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. – Vol. 100. – P. 155–164.
237. Sondossi, M., Sylvestre, M., Ahmad, D., Chishti, Y., Shareck, F. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl by biphenyl/chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testosteroni*, strain B-356 // *Journal of Industrial Microbiology*. – 1991. – Vol. 7. – P. 77–88.
238. Song, Y., DiMaio, F., Wang, R.Y.R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J., Baker, D. High-resolution comparative modeling with RosettaCM // *Structure*. – 2013. – Vol. 21. – P. 1735–1742.

239. Suman, J., Holtzaple, A., Kreps, S., Mergeay, M. Transformation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by bacterial 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase // *Chemosphere*. – 2024. – Vol. 349. – Article 140909.

240. Springael, D., Kreps, S., Mergeay, M. Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5 // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – Vol. 175, № 6. – P. 1674–1681.

241. Šrédlová, K. Recent advances in PCB removal from historically contaminated environmental matrices / K. Šrédlová, T. Cajthaml // *Chemosphere*. – 2022. – V. 287. – Article 132096.

242. Steliga, T., Wojtowicz, K., Kapusta, P., Brzeszcz, J. Assessment of biodegradation efficiency of polychlorinated biphenyls (PCBs) and petroleum hydrocarbons (TPH) in soil using three individual bacterial strains and their mixed culture // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – Article 709.

243. Stope, M., Görisch, H., Zipperle, J., Mau, M. Cometabolic ring fission of dibenzofuran by Gram-negative and Gram-positive biphenyl-utilizing bacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 59, № 1. – P. 62–67.

244. Su, X., Shen, H., Yao, X., Ding, L., Yu, C., Shen, C. A novel approach to stimulate the biphenyl-degrading potential of bacterial community from PCBs-contaminated soil of e-waste recycling sites // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 146. – P. 27–34.

245. Su, X., Zhang, Q., Hu, J., Hashmi, Z., Ding, L., Shen, C. Enhanced degradation of biphenyl from PCB-contaminated sediments: the impact of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99. – P. 1989–2000.

246. Su, X., Li, S., Cai, J., Xiao, Y., Tao, L., Hashmi, M.Z., Lin, H., Chen, J., Mei, R., Sun, F. Aerobic degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by a resuscitated strain *Castellaniella* sp. SPC4: Kinetics model and pathway for biodegradation // *Science of the Total Environment*. – 2019. – Vol. 688. – P. 917–925.

247. Suman, J., Strejcek, M., Zubrova, A., Capek, J., Wald, J., Michalikova, K., Hradilova, M., Sredlova, K., Semerad, J., Cajthaml, T., Uhlik, O. Predominant biphenyl dioxygenase from legacy polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated soil is a part of unusual gene cluster and transforms flavone and flavanone // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 644708.
248. Sun, J., Pan, L., Zhu, L. Formation of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls by *Bacillus subtilis*: new insights into microbial metabolism // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 613–614. – P. 54–61.
249. Sun, J., Zhu, L., Pan, L., Wei, Z., Song, Y., Zhang, Y., Qu, L., Zhan, Y. Detection of methoxylated and hydroxylated polychlorinated biphenyls in sewage sludge in China with evidence for their microbial transformation // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – Article 29782.
250. Suman, J., Sredlova, K., Fraraccio, S., Jerabkova, M., Strejcek, M., Kabickova, H., Cajthaml, T., Uhlik, O. Transformation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by bacterial 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase // *Chemosphere*. – 2024. – Vol. 349. – P. 140909.
251. Suske, W.A., van Berkel, W.J.H., Kohler, H.P.E. Catalytic mechanism of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase, a flavoprotein from *Pseudomonas azelaica* HBP1 // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – No. 47. – P. 33355–33365.
252. Szczybelski, A.S., Heuvel-Greve, M.J., Kampen, T., Wang, C., Brink, N.W., Koelmans, A.A. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene by three Arctic benthic species from Kongsfjorden (Svalbard, Norway) // *Marine Pollution Bulletin*. – 2016. – Vol. 112. – P. 65–74.
253. Tan, H.M. Bacterial catabolic transposons // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – Vol. 51, № 1. – P. 1–12.
254. Tang, X., Hashmi, M.Z., Zeng, B., Yang, J., Shen, C.F. Application of iron-activated persulfate oxidation for the degradation of PCBs in soil // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 279. – P. 673–680.
255. Tehrani, R., Biodegradation of mono-hydroxylated PCBs by *Burkholderia xenovorans* // *Biotechnology Letters*. – 2012. – Vol. 34. – P. 2247–2252.

256. Tehrani, R., Lyv, M.M., Van Aken, B. Transformation of hydroxylated derivatives of 2,5-dichlorobiphenyl and 2,4,6-trichlorobiphenyl by *Burkholderia xenovorans* LB400 // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – Vol. 21, № 10. – P. 6346–6353.

257. Tehrani, R., Van Aken, B. Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: sources, fate, and toxicities // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – Vol. 21, № 10. – P. 6334–6345.

258. Tehrani, R., Van Aken, B. Phytoremediation potential of poplars for PCB contamination // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – Vol. 21. – P. 6334–6345.

259. Teng, Y., Li, X., Chen, T., Zhang, M., Wang, X., Li, Z., Luo, Y. Isolation of the PCB-degrading bacteria *Mesorhizobium* sp. ZY1 and its combined remediation with *Astragalus sinicus* L. for contaminated soil // International Journal of Phytoremediation. – 2016. – Vol. 18. – P. 141–147.

260. Terzaghi, E., Vergani, L., Mapelli, F., Borin, S., Raspa, G., Zanardini, E., Morosini, C., Anelli, S., Nastasio, P., Sale, V. M., Armiraglio, S., Di Guardo, A. Rhizoremediation of weathered PCBs in a heavily contaminated agricultural soil: results of a biostimulation trial in semi-field conditions // Science of the Total Environment. – 2019. – Vol. 686. – P. 484–496.

261. Terzaghi, E., Vitale, C. M., Salina, G., Di Guardo, A. Plants radically change the mobility of PCBs in soil: Role of different species and soil conditions // Journal of Hazardous Materials. – 2020. – Vol. 388. – Article 121786.

262. Thathola P., Haldar S. Optimizing biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) using bacteria isolated from common effluent treatment plant (CETP) sludge: Integration of machine learning, kinetic studies, and metabolomic analysis // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2025. – T. 198. – Article 105992

263. Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., Liang, J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W363–W367.

264. Tirola, M.A., Busse, H.J., Kampfer, P., Mannisto, M.K. *Novosphingobium lentum* sp. Nov., a psychrotolerant bacterium from a polychlorophenol bioremediation process // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2005. – Vol. 55. – P. 583–588.
265. Ueno, D., Darling, C., Alae, M., Campbell, L., Pacepavicius, G., Teixeira, C., Muir, D. Detection of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the abiotic environment: surface water and precipitation from Ontario, Canada // *Environmental Science & Technology*. – 2007. – Vol. 41. – No. 6. – P. 1841–1848.
266. Ulanova, E., Martí Ibáñez, R., Domínguez-García, P., Díaz-Ferrero, J., Gomez-Canela, C., Ortiz Almirall, X. Impact of legacy and unintentionally produced polychlorinated biphenyls (PCBs) in effluents from two wastewater treatment plants in rivers near Barcelona, Spain // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 951. – Article 175095.
267. Unterman, R. A history of PCB biodegradation // *Bioremediation: Principles and Applications*. – Eds. Crawford, R.L., Crawford, D.L. – Cambridge University Press, 1996. – P. 209–253.
268. US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). – Atlanta: ATSDR, 2000.
269. Valizadeh, S., Lee, S. S., Baek, K., Choi, Y. J., Jeon, B. H., Rhee, G. H., Lin, K. Y. A., Park, Y. K. Bioremediation strategies with biochar for polychlorinated biphenyls (PCBs)-contaminated soils: A review // *Environmental Research*. – 2021. – Vol. 200. – Article 111757.
270. van Duuren, J.B.J.H., Nelisse, P.N., Hidding, B., Wouters, E. Generation of a catR deficient mutant of *Pseudomonas putida* KT2440 that produces cis,cis-muconate from benzoate at high rate and yield // *Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 156. – P. 163–172.
271. Vergani, L., Mapelli, F., Zanardini, E., Terzaghi, E., Di Guardo, A., Morosini, C., Raspa, G., Borin, S. Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl

contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions // Science of the Total Environment. – 2017. – Vol. 575. – P. 1395–1406.

272. Versalovic, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction // Methods in Molecular and Cellular Biology. – 1994. – Vol. 5. – P. 25–40.

273. Viisimaa, M., Karpenko, O., Novikov, V., Trapido, M., Goi, A. Influence of biosurfactant on combined chemical–biological treatment of PCB-contaminated soil // Chemical Engineering Journal. – 2013. – Vol. 220. – P. 352–359.

274. Voronina, A.O., Egorova, D.O., Korsakova, E.S., Plotnikova, E.G. Diversity of the *bphA1* genes in a microbial community from anthropogenically contaminated soil and isolation of new *Pseudomonads* degrading biphenyl/chlorinated biphenyls // Microbiology. – 2019. – Vol. 88, № 4. – P. 433–443.

275. Wang, J., Wang, S. Activation of persulfate (PS) and peroxymonosulfate (PMS) and application for the degradation of emerging contaminants // Chemical Engineering Journal. – 2018. – Vol. 334. – P. 1502–1517.

276. Wang, S., Sun, S., Li, Z., Zhang, R., Xu, J. Accurate de novo prediction of protein contact map by ultra-deep learning model // PLoS Computational Biology. – 2017. – Vol. 13. – Article e1005324.

277. Wang, X., Teng, Y., Luo, Y., Dick, R.P. Biodegradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by *Sinorhizobium meliloti* NM // Bioresource Technology. – 2016. – Vol. 201.

278. Wang, Y., Sun, C., Min, J., Li, B., Li, J., Chen, W., Kong, Y., Hu, X. The engineered biphenyl dioxygenases enhanced the metabolism of dibenzofuran // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2021. – Vol. 161. – Article 105228.

279. Watanabe, T., Kikuchi, T., Ogawa, N., Harayama, S. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, № 40. – P. 31016–31023.

280. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede,

T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – P. W296–W303.

281. Webb, B., Sali, A. Protein structure modeling with MODELLER // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1654. – P. 39–54.

282. Weidemann, E., Lundin, L. Behavior of PCDF, PCDD, PCN and PCB during low temperature thermal treatment of MSW incineration fly ash // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 279. – P. 180–187.

283. Weidemann, E., Lundin, L. Behavior of PCDF, PCDD, PCN, and PCB during low-temperature thermal treatment of MSW incineration fly ash // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 279. – P. 180-187.

284. Whitehead, T.P., Ward, M.H., Colt, J.S., Nishioka, M.G., Buffler, P.A., Rappaport, S.M., Metayer, C. Determinants of polychlorinated biphenyls in dust from homes in California, USA // *Environmental Science: Processes & Impacts*. – 2010. – Vol. 15. – P. 339–346.

285. Wiegel, J., Wu, Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2000. – Vol. 32, № 1. – P. 1–15.

286. Williams, W.A., Lobos, J.H., Cheetham, W.E. Phylogenetic analysis of aerobic polychlorinated biphenyl-degrading bacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1997. – Vol. 47, № 1. – P. 207–210.

287. Windham, G.C., Pinney, S.M., Sjodin, A., Lum, R., Jones, L.L., Needham, L.L., Biro, F.M. Body burdens of brominated flame retardants and other persistent organo-halogenated compounds and their descriptors in U.S. girls // *Environmental Research*. – 2010. – Vol. 110, № 3. – P. 251–257.

288. Wolska, L., Mechlinska, A., Rogowska, J., Namiesnik, J. Sources and fate of PAHs and PCBs in the marine environment // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2012. – Vol. 42. – P. 1172–1189.

289. Wu, B., Zhang, Y., Kong, J., Zhang, X.X., Cheng, S.P. *In silico* prediction of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking // *Toxicology Letters*. – 2009. – Vol. 191. – P. 69–73.

290. Wu, C., Du, X., Liu, H., Chen, X., Ge, K., Meng, R., Zhang, Z., Zhang, H. Advances in polychlorinated biphenyls-induced female reproductive toxicity // *Science of The Total Environment*. – 2024. – Vol. 918. – Article 170543.
291. Wu, J., Hu, J.C., Wang, S.J., Jin, J.X., Wang, R., Wang, Y., Jin, J. Levels, sources, and potential human health risks of PCNs, PCDD/Fs, and PCBs in an industrial area of Shandong Province, China // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 199. – P. 382–389.
292. Wu, M., Chen, L., Tian, Y., Ding, Y., Dick, W.A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media // *Environmental Pollution*. – 2013. – Vol. 178. – P. 152–158.
293. Wu, Y., Zhu, M., Ouyang, X., Qi, X., Guo, Z., Yuan, Y., Dang, Z., Yin, H. Integrated transcriptomics and metabolomics analyses reveal the aerobic biodegradation and molecular mechanisms of 2, 3', 4, 4', 5-pentachlorodiphenyl (PCB 118) in *Methylobacterium* sp. ZY-1 // *Chemosphere*. – 2024. – Vol. 356. – Article 141921.
294. Wyrwicka, A., Steffani, S., Urbaniak, M. The effect of PCB-contaminated sewage sludge and sediment on metabolism of cucumber plants (*Cucumis sativus*) // *Ecology and Hydrobiology*. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 75–82.
295. Xing, Z., Hu, T., Xiang, Y., Qi, P., Huang, X. Degradation mechanism of 4-chlorobiphenyl by consortium of *Pseudomonas* sp. strain CB-3 and *Comamonas* sp. strain CD-2 // *Current Microbiology*. – 2020. – Vol. 77. – P. 15–23.
296. Xu, D., Zhang, Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 80. – P. 1715–1735.
297. Xu, C., Zang, X., Hang, X., Liu, X., Yang, H., Liu, X., Jiang, J. Degradation of three monochlorobenzoate isomers by different bacteria isolated from a contaminated soil // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2017. – Vol. 120. – P. 192–202.
298. Xu, L., Hu, T., Xiang, Y., Qi, P., Huan Characterization of the biosorption and biodegradation properties of *Ensifer adhaerens*: A potential agent to remove polychlorinated biphenyls from contaminated water // *Journal of Hazardous Materials*. – 2016. – Vol. 302. – P. 314–322.

299. Yaghmaeian, K., Jaafarzadeh, N., Nabizadeh, R., Dastforoushan, G., Jaafari, J. CFD modeling of incinerator to increase PCBs removal from outlet gas // *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. – 2015. – Vol. 13. – P. 1–6.
300. Yamada, T., Taguchi, K., Matsumoto, A., Suzuki, M., Hosoda, A., Yamaguchi, Y., Masai, E., Fukuda, M. Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – Vol. 73. – P. 452–457.
301. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12. – P. 7–8.
302. Yang, Y., Zhang, Q., Lin, Q., Sun, F., Shen, C., Lin, H., Su, X. Unveiling the PCB biodegradation potential and stress survival strategies of resuscitated strain *Pseudomonas* sp. HR1 // *Environmental Pollution*. – 2024. – Vol. 344. – Article 123320.
303. Ye, Z., Li, H., Jia, Y., Fan, J., Wan, J., Guo, L., Su, X., Zhang, Y., Wu, W.M., Shen, C. Supplementing resuscitation-promoting factor (Rpf) enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Rhodococcus biphenylivorans* strain TG9T // *Environmental Pollution*. – 2020. – Vol. 263. – Article 114488.
304. Zeng, S., Gan, N., Mera, R.W., Cao, Y., Li, T., Sang, W. Enrichment of polychlorinated biphenyl 28 from aqueous solutions using Fe₃O₄ grafted graphene oxide // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – Vol. 218. – P. 108–115.
305. Zhai, G., Lehmler, H. J., Schnoor, J. L. Identification of hydroxylated metabolites of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and metabolic pathway in whole poplar plants // *Chemosphere*. – 2010. – Vol. 81. – No. 4. – P. 523–528.
306. Zhan, Y., Sun, Z., Chen, Z., Lu, Z., Zhao, X. Genes involved in the benzoate catabolic pathway in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 // *Current Microbiology*. – 2008. – Vol. 57, № 6. – P. 609–614.
307. Zhang, Y., Qiu, X., Bian, Y., Ma, J., Feng, X. S., He, Z.-W., Tan, Y. Polychlorinated Biphenyls in Food: Updates on Occurrence, Toxic Effects, Pretreatment and Analysis Techniques // *Food Bioscience*. – 2024. – Article 104083.
308. Zhang, R., Kang, Y., Yu, K., Han, M., Wang, Y., Huang, X., Ding, Y., Wang, R., Pei, J. Occurrence, distribution, and fate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in multiple coral reef regions from the South China Sea: A case study in spring-summer // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 777. – Article 146106.

309. Zhang, C., Feng, Y.W., Liu, H., Chang, Z.J., Li, J.M., Xue, J.H. Uptake and translocation of organic pollutants in plants: a review // *Journal of Integrative Agriculture*. – 2017. – Vol. 16, № 8. – P. 1659–1668.
310. Zhang, Q., Guo, Y., Mengyu, H., Hui, L., Cheng, G. Degradation of selected polychlorinated biphenyls by montmorillonite clay-templated Fe⁰/Ni⁰ bimetallic system // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 276. – P. 122–129.
311. Zhang, Z., Zhong, Q., Qian, Z., Zeng, X., Zhang, J., Xu, X., Huo, X. Alterations of gut microbiota and its metabolomics in children with 6PPDQ, PBDE, PCB, and metal (loid) exposure // *Journal of Hazardous Materials*. – 2024. – Vol. 475. – Article 134862.
312. Zhao, Q., Bai, J., Lu, Q., Gao, Z., Jia, J., Cui, B., Liu, X. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments/soils of different wetlands along 100-year coastal reclamation chronosequence in the Pearl River Estuary, China // *Environmental Pollution*. – 2016. – Vol. 213. – P. 860–869.
313. Zhao, X.H., Wang, X.L., Li, Y. Relationship between the binding free energy and PCBs' migration, persistence, toxicity and bioaccumulation using a combination of the molecular docking method and 3D-QSAR // *Chemistry Central Journal*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1–12.
314. Zhu, N.M., Li, Y., Zhang, F.S. Catalytic dechlorination of polychlorinated biphenyls in subcritical water by Ni/Fe nanoparticles // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – Vol. 171. – P. 919–925.
315. Zhu, N.M., Wang, C.F., Zhang, F.S. An integrated two-stage process for effective dechlorination of polychlorinated biphenyls in subcritical water in the presence of hydrogen donors // *Chemical Engineering Journal*. – 2012. – Vol. 197. – P. 135–142.
316. Zhu, X., Zhou, D., Wang, Y., Cang, L., Fang, G., Fan, J. Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by soil washing and subsequent TiO₂ photocatalytic degradation // *Journal of Soils and Sediments*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1371–1379.
317. Zhu, L., Zhou, J., Zhang, R., Tang, X., Wang, J., Li, Y., Zhang, Q., Wang, W. Degradation mechanism of biphenyl and 4,4'-dichlorobiphenyl *cis*-dihydroxylation by non-heme 2,3-dioxygenases BphA: A QM/MM approach // *Chemosphere*. – 2020. – Vol. 247. – Article125844