

*На правах рукописи*

Егорова Дарья Олеговна

**АЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ  
БИФЕНИЛОВ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ  
РАЗНООБРАЗИЕ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Пермь – 2022

Работа выполнена на базе лаборатории микробиологии техногенных экосистем «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь

**Научный консультант:**

доктор биологических наук

**Плотникова Елена Генриховна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, доцент кафедры генетики, руководитель лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета **Каюмов Айрат Рашитович**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологий Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

**Коршунова Татьяна Юрьевна**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

**Позднякова Наталия Николаевна**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского (117312 Российская Федерация г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2)

Защита диссертации состоится 17 июня 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: [info@iegm.ru](mailto:info@iegm.ru).

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «ИЭГМ УрО РАН» и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Максимова Юлия Геннадьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Одной из центральных проблем в сфере реализации мировой концепции устойчивого развития, в части, посвящённой окружающей среде и экологии, является выведение из природных сред и техногенных образований «стойких органических загрязнителей» (СОЗ). Согласно Стокгольмской конвенции «О стойких органических загрязнителях» (2001г), полихлорированные бифенилы (ПХБ) включены в список СОЗ и запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены до 2028 г (<http://chm.pops.int>). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г (ФЗ от 27.06.2011 № 164-ФЗ). По химической структуре ПХБ входят в класс ароматических соединений, содержащих в молекуле два ароматических кольца, на которых в качестве заместителей расположены атомы хлора в количестве от 1 до 10 (Erickson, Kaley, 2011). Всего в группу хлорированных бифенилов входят 209 конгенов. За период их производства (1930-1980 гг) по разным подсчетам было выпущено более 1.5 млн тонн, из которых не менее 10% находятся в окружающей среде. В коммерческих целях ПХБ производились в виде смесей, содержащих от 40 до 70 конгенов, под различными торговыми марками. Так, в России смеси ПХБ носили торговое название Совол и Трихлорбифенил (ТХБ), в США – Aroclor, в Германии – Klorphen, в Чехословакии – Delor, в Японии – Kaneclor (Murinová, Dercová, 2014; Reddy *et al.*, 2019; Devi, 2020).

ПХБ несут угрозу нормальному существованию экосистем, вызывают тяжелые заболевания живых организмов и аккумулируются в пищевой цепи к верхним звеньям в значительном количестве. При этом часть конгенов ПХБ по своей токсичности превосходят такие опасные СОЗ как полихлорированные дибензофураны и дибензодиоксины (Reddy *et al.*, 2019; Devi, 2020). ПХБ устойчивы к воздействию физико-химических факторов, что обуславливает их длительное присутствие в природных объектах. Несмотря на то, что проблеме уничтожения ПХБ посвящено значительное количество исследований в области физики, химии и биологии, до сих пор остаются открытыми фундаментальные вопросы, связанные с поиском оптимальных экологически безопасных и экономически целесообразных механизмов удаления ПХБ из природных и техногенных объектов. Одним из перспективных направлений в решении данных вопросов является изучение деградационного потенциала природных аэробных бактерий.

ПХБ, являясь новым субстратом для бактериальных штаммов, спровоцировали эволюцию метаболических процессов в клетке в направлении адаптации к использованию новой химической структуры в качестве источника питания. Известно, что разложение ПХБ у аэробных бактерий идет с использованием метаболического пути трансформации незамещенного бифенила, состоящего из двух частей: «верхней» и «нижней» (Pieper, 2005; Chang *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2014; Agulló *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2019). В «верхнем» пути происходит окисление молекулы бифенила под действием комплекса ферментов до образования бензойной и пентадиеновой кислот (Chang *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017; Agulló *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2019). Данный путь кодируется *bph*-генами, которые могут иметь как плазмидную, так и хромосомальную локализацию (Pieper, 2005; Parales, Resnick, 2006; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Su *et al.*, 2019). Первичная атака, в большинстве случаев, обусловлена активностью ферментов класса диоксигеназ. Ведущую роль в определении субстратной специфичности бифенил 2,3-диоксигеназы в отношении конгенов ПХБ играет строение  $\alpha$ -субъединицы и, соответственно, кодирующего ее гена *bphA1* (Furukawa *et al.*, 2004; Viger *et al.*, 2012;

Hoostal, Bouzat, 2016). На настоящий момент отсутствуют систематизированные данные о взаимосвязи строения  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы и ее способности к окислению различных конгенов ПХБ. «Нижний» путь – окисление пентадиеновой кислоты с участием различных групп ферментов (Chang *et al.*, 2013; Murinová *et al.*, 2014; Agulló *et al.*, 2019). В большинстве случаев в штаммах-деструкторах ПХБ отсутствуют ферменты разложения бензойной/хлорбензойных кислот (Pieper, 2005; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Aken *et al.*, 2010). Полная утилизация бифенила/ПХБ возможна при наличии в микробиоценозе нескольких штаммов, находящихся в синтрофных взаимодействиях (Zhang *et al.*, 2016). Известно незначительное количество штаммов, осуществляющих разложение полихлорированных бифенилов до соединений основного обмена клетки (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal, 2000; Park *et al.*, 2001; Pori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

В настоящее время существенный вклад в понимание молекулярных процессов трансформации/утилизации ПХБ и их производных в бактериальной клетке вносят стремительно развивающиеся геномные и биоинформационные технологии. Так, секвенированы и описаны геномы у более чем 30 штаммов-деструкторов ПХБ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), уточнены структуры оперонов и генов, контролирующих разложение ПХБ (McLeod *et al.*, 2006; Chain *et al.*, 2006; Ohtsubo *et al.*, 2012; Pori *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018; Hirose *et al.*, 2019), а также на основании полученных нуклеотидных последовательностей предложены модели третичных структур ферментов деструкции ПХБ (Furusawa *et al.*, 2004; Gakhar *et al.*, 2005; Frieman *et al.*, 2009; Baig, Manickam, 2010; Goto *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

Известно, что гидрокси-ПХБ могут образовываться в окружающей среде как промежуточный продукт бактериальной деструкции ПХБ, как конечный продукт трансформации ПХБ растениями, а также под действием природных окислителей (Pieper, 2005; Tehrani, Van Aken, 2014). Появились сведения о формировании метоксилированных производных ПХБ в осадках сточных вод химических предприятий (Sun *et al.*, 2016). В литературе присутствует ограниченное количество публикаций, рассматривающих особенности трансформации гидрокси-ПХБ бактериями. Показано, что штаммы *Comamonas testosteroni* В-356, *Burkholderia xenovorans* LB400 и *Sphingomonas* sp. N-9 осуществляют разложение моно-гидрокси-(моно-три)-хлорированных бифенилов в аэробных условиях (Francova *et al.*, 2004; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Высокохлорированные гидрокси-ПХБ подвергаются восстановительному дегалогенированию штаммами *Desulfitobacterium dehalogenas* JW/IUDC1 и *Desulfitobacterium dehalogenas* XZ-1 (Tehrani, Van Aken, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Сведения о возможности бактериальной трансформации ПХБ, содержащих в молекуле заместители другой химической природы, в частности метокси-группы, отсутствуют.

Помимо этого, биоразложение ПХБ осложнено количеством и расположением атомов хлора в молекуле. Большинство аэробных бактерий-деструкторов высокоактивны по отношению к моно- и ди-хлорбифенилам (Kim, Picardal, 2000; Adebusoye *et al.*, 2008). Описано несколько штаммов родов *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Rhodococcus*, которые проявляют деградативную активность к средне- и высокохлорированным бифенилам (Pieper, 2005; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009; Petrić *et al.*, 2011). Наиболее изученными среди них являются штаммы *Burkholderia xenovorans* LB400 и *Rhodococcus jostii* RHA1 (Pieper, 2005). Известно, что биодоступность ПХБ зависит не только от количества заместителей, но и от их расположения в молекуле бифенила (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Следует отметить, что в коммерческих смесях

ПХБ представлены несколько десятков конгенов, в основном с количеством заместителей больше 3 (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erickson, Kaley, 2011). Теории, построенные на данных об активности отдельных штаммов к различным конгенам ПХБ, не позволяют достоверно спрогнозировать возможно ли применение данных штаммов для уничтожения смесей ПХБ. Получить необходимые данные возможно при детальном изучении особенностей бактериальной деструкции коммерческих и экспериментальных смесей ПХБ.

Проведение всесторонних исследований с применением комплекса физиолого-биохимических, генетических методов, а также методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) и биоинформатики, используемых для изучения изолированных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ, внесет существенный вклад в развитие фундаментальных знаний в области микробной экологии, филогенетики, структурной геномики, а также послужит основой для разработки эффективных экобиотехнологий, направленных на восстановление ПХБ-загрязненных почв и уничтожение не востребуемых смесей ПХБ.

**Цель исследования** – комплексная оценка таксономического, функционального и генетического разнообразия аэробных бактерий-деструкторов полихлорированных бифенилов, а также выделение индивидуальных бактерий и ассоциаций, перспективных для применения в экобиотехнологиях, направленных на уничтожение ПХБ, находящихся в окружающей среде и местах складирования.

#### **Основные задачи исследования**

1. Изучить таксономическое разнообразие бактерий-деструкторов бифенила/хлорированных бифенилов в почвах с различным уровнем техногенного загрязнения.
2. Исследовать особенности утилизации/трансформации различных конгенов ПХБ у изолированных бактериальных штаммов: на уровне анализа функциональных генов (ключевых генов, контролирующих разложение бифенила/ПХБ) и метаболического профиля деструкции хлорбифенилов.
3. Выявить и всесторонне охарактеризовать активные штаммы-деструкторы, способные осуществлять разложение ПХБ до соединений основного обмена клетки.
4. Исследовать деградативный потенциал активных штаммов-деструкторов по отношению к модельным, коммерческим (Delor 103/Трихлорбифенил, Совол) и химически модифицированным смесям ПХБ.
5. Оценить возможность применения охарактеризованных бактерий-деструкторов в экобиотехнологиях, направленных на ремедиацию ПХБ-загрязненных почв и уничтожение не востребуемых смесей ПХБ.

**Научная новизна.** Получены новые сведения о филогенетическом разнообразии аэробных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ, обитающих в почвах с различным уровнем загрязнения отходами химических производств (территории Пермского края, Самарской и Московской обл., Россия; территория Ивано-Франковской обл., Украина). В рабочую коллекцию собраны 313 штаммов аэробных бактерий, проявляющих деградативную активность к бифенилу/ПХБ, бензойной и хлорбензойным кислотам, относящихся к филумам *Proteobacteria* (роды *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Mezorhizobium*, *Ohrobactrum*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*), *Actinobacteria* (роды *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*) и *Firmicutes* (роды *Bacillus*, *Planococcus*).

Выявлена уникальная способность штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* СН625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* СН628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. В7а, *R. erythropolis* G12а, *M. oxydans* B51, осуществлять окисление как *ortho*-, так и *para*-замещенного кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1} с последующей деструкцией образовавшихся хлорбензойных кислот (ХБК) до соединений основного обмена клетки. Разложение ХБК происходит как в результате диоксигенирования с образованием катехола/хлоркатехолов, так и в результате гидроксирования с образованием *para*-гидроксибензойной и протокатеховой кислот, разлагаемых далее до соединений, поступающих в цикл трикарбоновых кислот.

В результате молекулярно-генетических исследований показано, что гены *bphA1*, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (2,3-ДО) бактерий рода *Rhodococcus* имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами фенилпропионат 2,3-ДО (97.7–100%) у 2 штаммов, бифенил 2,3-ДО (99.5–100%) у 4 штаммов и бифенил/толуол 2,3-ДО грамположительных бактерий (87.1–99.6%) у 14 штаммов.

Впервые на основании нуклеотидной последовательности генов *bphA1*, с применением методов биоинформатического анализа и 3D-моделирования, получены вторичная и третичная структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (VphA1) штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* КТ112-7. Установлено, что VphA1 штамма *R. ruber* P25 характеризуется уникальной структурой и не имеет достоверного уровня сходства с известными  $\alpha$ -субъединицами бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-ДО. Напротив, VphA1<sub>КТ112-7</sub> (ген которой локализован на плазмиде), имеет высокий процент сходства с  $\alpha$ -субъединицей бифенил 2,3-ДО известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1.

Впервые установлено, что геном штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 представлен хромосомой (7587912 пн, GenBank CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (281912 пн, GenBank CP072194.1), pRHWK2 (130937 пн, GenBank CP072195.1). В результате анализа генома показано, что гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме (имеют высокую степень сходства с генами деструкции нафталина), так и на плазмидах (высокий уровень сходства с классическими *bph*-генами). Также в геноме штамма КТ112-7 выявлены гены, обуславливающие его способность разлагать хлор- и гидрокси-бензойные кислоты до соединений основного обмена клетки.

Выявлена способность штаммов родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* эффективно разлагать коммерческие и модельные смеси ПХБ, содержащие от 20 до 50 конгенов. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации смесей химически модифицированных ПХБ, содержащих в молекуле гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтокси-группы.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты позволили сформулировать концепцию, дополняющую существующую теорию о роли аэробных бактерий в разложении полихлорированных бифенилов. В ранее не исследованных биоценозах, расположенных на территории Российской Федерации и загрязненных различными галогенорганическими, в том числе и галогенароматическими соединениями, осуществляется селекция, в результате которой преимущественное развитие получают штаммы, обладающие биодеградативным потенциалом в отношении химических соединений, структура которых подобна/идентична представленным в биотопе загрязнителям. Длительная многолетняя селекция приводит к существенным

изменениям на молекулярно-генетическом уровне, что обуславливает появление аэробных бактериальных штаммов с уникальными свойствами в отношении труднодоступных и токсичных поллютантов, таких как полихлорированные бифенилы. Выявление и всестороннее исследование данных штаммов вносит существенный вклад в развитие теоретических представлений о функциональных основах биотрансформации ПХБ, а также позволяет находить новые подходы к разработке экобиотехнологий, направленных на восстановление окружающей среды и удаление неустойчивых ПХБ с учетом требований экологической безопасности.

Создана рабочая коллекция штаммов, проявляющих деградационную активность к ПХБ и их возможным метаболитам, представители которой депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, ИБФМ, г. Пущино) и Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов («ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь), а данные о последовательностях генов 16S рРНК и функциональных генов (*bph*, *ben*, *ohb*, *fcg*) включены в международную базу GenBank (Национальный центр биологической информации США: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Детальное изучение метаболических особенностей и генетического потенциала штаммов-деструкторов, выделенных из различных биотопов, позволило выявить наиболее перспективные штаммы аэробных бактерий для применения в экобиотехнологиях, направленных на очистку природных сред (почв) от ПХБ и схожих по химической структуре поллютантов, и разработать на их основе средства и способы ремедиации (патенты РФ № 2562156 и № 2563660). В качестве потенциальных агентов предложены штаммы *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25 (патент РФ № 2262531), *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7 (патент РФ № 2548804), CH625 (патент РФ № 2585537), CH628, *Rhodococcus* sp. B7a. На основе штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH625 разработан микробный препарат «Полихлорокс», предназначенный для очистки ПХБ-загрязненных почв (<http://eco-emt.ru>).

Впервые получены сведения о бактериальной деструкции смесей химически модифицированных ПХБ, в состав молекулы которых введены дополнительные заместители (гидрокси-, метокси-, аминоэтокси-, полиэтиленгликолюкси-группы). На основании уникальных междисциплинарных исследований разработан научно-практический подход, позволяющий решать проблему уничтожения ПХБ, находящихся в местах складирования: на первом этапе осуществляется химическая модификация ПХБ с внедрением гидрокси/метокси/аминоэтокси/полиэтиленгликолюкси-групп, а на втором этапе – разложение под действием штаммов *R. ruber* P25 или *R. wratislaviensis* KT112-7 до соединений, безопасных для окружающей среды.

С использованием методов полногеномного анализа получены данные об уникальном сочетании генов в геноме штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D), полногеномная нуклеотидная последовательность размещена в международной базе GenBank (CP072193.1, CP072194.1, CP072195.1). Применение молекулярно-генетических методов и современных биоинформационных ресурсов позволило визуализировать третичную структуру  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, фермента первичной атаки молекулы ПХБ, штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7, а также установить полиморфизм гена *bphA1* у штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*.

Материалы диссертации используются в лекционных курсах Биологического и Географического факультетов Пермского государственного национального исследовательского университета.

### Положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы родов *Microbacterium*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, обладающие высоким деградационным потенциалом в отношении ПХБ, выделены из почв, загрязненных хлорорганическими соединениями. Уникальное строение и сочетание генов/ферментов у изолированных природных штаммов обуславливает их способность к глубокой трансформации ПХБ и разложению образующихся при этом метаболитов до соединений основного обмена клетки, а наличие плазмид большой молекулярной массы создает основу для горизонтального переноса *bph*-генов.

2. Разложение коммерческих смесей ПХБ торговых марок Трихлорбифенил/Delor 103 и Совол (начальная концентрация 100–600 мг/л, время деструкции 8–14 сут), а также модельной смеси ПХБ (начальная концентрация 32 мг/л, время деструкции 3 сут) на 95–100% осуществляют штаммы рода *Rhodococcus* (*Rhodococcus* sp. MD1, MD2, B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* KT112-7), а также штаммы *Microbacterium oxydans* B51 и *Pseudomonas* sp. MD8. Бактериальные ассоциации, изолированные из ПХБ-загрязненных почв, разлагают Трихлорбифенил/Delor 103 (начальная концентрация 13.8 мг/л, время деструкции 8 сут) и Совол (начальная концентрация 55 мг/л, время деструкции 8 сут) на 99.38–99.97%.

3. Штаммы *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7 проявляют деградационную активность по отношению к химически модифицированным смесям ПХБ, содержащим гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси-, аминоэтокси-хлорированные бифенилы. Выявленная активность может быть использована для решения проблемы утилизации ПХБ в рамках междисциплинарного подхода, сочетающего в себе этапы химической трансформации ПХБ (внедрение дополнительных заместителей в молекулу) и бактериальной деструкции полученных производных.

4. Выявлены бактериальные культуры, перспективные для использования в биотехнологиях восстановления ПХБ-загрязненных почв. Штаммы *Microbacterium oxydans* B51 и *R. ruber* P25 в условиях искусственно загрязненной почвы разлагают модельные и коммерческие смеси ПХБ в концентрации 1667–16667 ПДК (100–1000 мг/кг почвы), штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a – 4667 ПДК (280 мг/кг почвы) ПХБ. Внесение штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CP628 в почву, длительное время загрязненных коммерческими смесями ПХБ в концентрации 14–8083 ПДК (0.84–485 мг/кг почвы), приводило к снижению содержания загрязнителя до 0.8–25 ПДК (0.048–1.5 мг/кг почвы) за три месяца.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования представлены на региональной конференции «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии» (Пермь, 1999), на VII Коми республиканской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2000), на Межвузовской конференции «Экология: проблемы и пути решения» (Пермь, 1999, 2000), на V международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Волгоград-Пермь, 2001), Пушкинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2002, 2004, 2005, 2006, 2010, 2012, 2013, 2014, 2016, 2017, 2020), на международной конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2004), на международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2004, 2008, 2010), на международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005), на международной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал» (Пермь, 2005), International scientific conference «Microbial Biotechnology» (Chisinau, Moldova, 2009, 2011, 2016), на

международной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии (Улан-Уде, 2011), на международной школе-семинаре «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2012, 2014, 2015, 2018), на международной конференции «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал» (Пермь, 2016), на Российском микробиологическом конгрессе (Москва, 2017), на международной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), на международной конференции «Отходы, причины образования и перспективы использования» (Краснодар, 2019), на международной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 2020).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 134 печатных работы, включая 1 обзорную и 54 экспериментальных статьи, из которых 29 статей опубликованы в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science (Journal of Hazardous Materials (Q1), International Biodeterioration and Biodegradation (Q1), Environmental Geochemistry and Health (Q1), Journal of Environmental Science and Health. Part B (Q2), Water Air and Soil Pollution (Q2), Микробиология, Прикладная биохимия и микробиология, Экология, Биотехнология, Доклады Академии Наук, Молекулярная биология, Экология человека, Почвоведение, Экологическая генетика), 8 статей в журналах списка ВАК, 17 статей в других журналах, 74 публикации в материалах российских и международных конференций, 5 патентов.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 358 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы, 84 рисунка, 5 приложений. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 450 литературных источников, в том числе 60 на русском и 390 на английском языках. В Приложениях приведены полный перечень штаммов, использованных в работе, карты-схемы районов отбора почвенных образцов, состав коммерческих и экспериментальных смесей полихлорированных бифенилов, состав смесей химически модифицированных полихлорбифенилов.

**Связь работы с крупными научными программами.** Работа выполнена в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН в рамках тем «Биохимические и генетические системы трансформации сложных органических соединений у бактерий, перспективных для биотехнологии» (ГР № 0120.0406511), «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). Исследования проведены в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы междисциплинарных проектов фундаментальных исследований УрО РАН (№ 12-М-34-2036), Комплексной программы УрО РАН (№ 18-3-8-19). Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-96028, № 13-04-96049, № 14-04-96021, № 18-29-05016), молодежного гранта УрО РАН (№ 10-4-ИП-161).

Работа выполнена 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.** Автору принадлежит выбор проблемы, постановка цели и задач исследования, выбор объектов и методов исследования, участие в разработке методик исследования, 90%-ное участие в лабораторных экспериментах, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций, научное руководство студентами и аспирантами.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, зав. лаб. микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН, д.б.н. Плотниковой Елене Генриховне за многолетнюю поддержку и внимание к проводимым исследованиям. Автор выражает благодарность д.м.н., профессору, чл.-корр. РАН **В. А. Демакову** за многолетнюю помощь в организации исследований; вед. научн. сотруднику ИОС УрО РАН, д.х.н. Т. И. Горбуновой и с.н.с. ИОС УрО РАН, к.х.н. М. Г. Первой за помощь в совместных исследованиях по биодеструкции химически модифицированных ПХБ; вед. научн. сотруднику лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Пушкино, д.б.н. И. П. Соляниковой за помощь в совместных экспериментах по изучению ферментов активных штаммов-деструкторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн проведенного исследования

**Образцы почв** и техногенно-минеральных образований были отобраны в период 1998–2018 гг с девяти удаленных друг от друга территорий в соответствии с государственной нормативной документацией (ГОСТ 17.4.4.02-84, ГОСТ 12071-2014, ГОСТ 17.4.3.01-83, ПНД Ф 2.1:2:2.2:2.3.2-03) из верхнего аэрируемого слоя (5–20 см), по методу «конверта», для исследований брали усредненную пробу (рисунок 2).



**Рисунок 2 – Общая схема результатов выделения штаммов-деструкторов (галоген)ароматических соединений из почв, отличающихся экологическими условиями и спектром загрязняющих веществ**

**Рабочая коллекция бактериальных штаммов, среды и условия культивирования.** В работе использовано 313 штаммов аэробных бактерий, изолированных в процессе проводимых исследований из образцов почв с различным уровнем загрязнения (рисунок 2). Для длительного хранения штаммов применяли криоконсервацию (криопротектор – глицерин, температурный режим  $-80^{\circ}\text{C}$ , период хранения до 10 лет с последующим пересевом и повторным замораживанием).

Для выделения и культивирования микроорганизмов-деструкторов были использованы: минеральная среда К1 (Зайцев, Карасевич, 1981), минеральная среда Раймонда (Raymond, 1961), модифицированная среда Раймонда (БСР): к основной среде Раймонда добавляли 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта; среда Luria-Bertani (LB) (Ausbel *et al.*, 1995), минеральная среда АММ (Заварзина и др., 2006). Для получения плотных сред вносили агар до 1.5 %.

В работе использованы аналитически чистые (>98%): бензол, толуол, фенол, бифенил, нафталин, фенантрен, бензойная кислота (БК) и ее хлор- и гидроксипроизводные, гентизат, *орто*-фталат, индивидуальные конгенеры хлорбифенилов, Трихлорбифенил (ТХБ) (ОСТ 6-01-24-85, Россия), Совол (ОСТ 6-01-24-75, Россия), Delor 103 (Chemko Strážske, Чехословакия). Экспериментальные смеси химически модифицированных полихлорбифенилов синтезированы в ИОС УрО РАН в рамках совместно выполняемых проектов (Горбунова и др., 2014, 2019; Егорова и др., 2013, 2019; Egorova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021).

Минеральные соли и органические соединения, использованные в работе, произведены «Sigma-Aldrich» (США, Германия), «Acros-organics» (США), ЗАО «НПО Экрос» (Россия), ЗАО «НПК Криохром» (Россия).

**Выделение ассоциаций и чистых культур бактерий.** Накопительное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 100 мл минеральной среды, 10 г почвенного образца и один из субстратов, перечисленных выше. Инкубацию осуществляли 2–4 недели на термокачалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) (100 об/мин.) или в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при +28°C. Индивидуальные культуры выделяли на плотных полноценных и/или минеральных средах с применением метода разведений до получения единичных колоний. Культуры поддерживали на плотных питательных средах, инкубацию осуществляли в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при +28°C.

**Анализ ростовых параметров бактериальных ассоциаций и индивидуальных штаммов** осуществляли в условиях периодического культивирования в минеральной среде с одним из вышеперечисленных субстратов на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C. Оптическую плотность культуры контролировали каждые 24 ч на спектрофотометре BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) и количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) определяли по классическим методикам (Методы..., 1983, 1991).

**Идентификацию бактериальных штаммов** осуществляли на основе анализа морфологических, физиолого-биохимических и хемотаксономических признаков (Методы..., 1983; Becker *et al.*, 1964; Goodfellow, Minnikin, 1985), а также на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (Tirola *et al.*, 2002). Секвенирование генома штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществлено на базе ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия) на приборе Illumina HiSeq 1500 (США). Для более точного установления филогенетического положения штамма был проведен тест «средней идентичности нуклеотидов (ANI)» (Richter *et al.*, 2016) с применением программного обеспечения базы данных NCBI.

**Модельные системы для изучения бактериальной деструкции ПХБ.** Для изучения эффективности деструкции ПХБ и их модифицированных производных в минеральной среде К1/Раймонда использовали метод с «отмытыми» клетками (Maltseva *et al.*, 1999). Для модельных систем использовали почвы, отобранные в загрязненных районах (г. Пермь, г. Чапаевск, Россия; г. Калуш, Украина), и незагрязненные почвы (заказник Предуралье, Россия) (рисунок 3). Если эксперимент осуществляли с ПХБ-загрязненной почвой (образцы, отобранные в г. Калуш и г. Чапаевск), то дополнительно ПХБ не вносили.

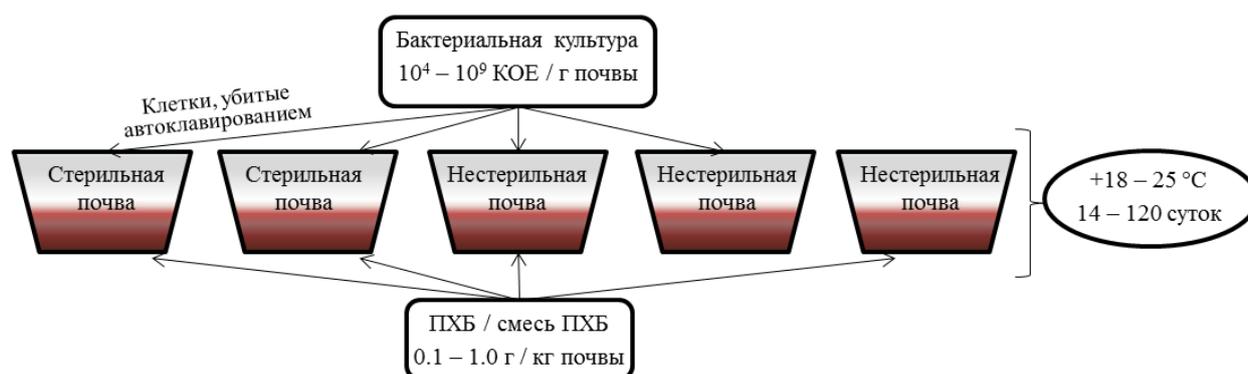


Рисунок 3 – Схема модельного почвенного эксперимента

**Аналитические методы. Концентрацию ПХБ** определяли газохроматографическими методами с применением пламенно-ионизационного (ГХ-ПИД) (хроматограф «Shimadzu GC 2010», Япония), электронно-захватного (ГХ-ЭЗД) (хроматограф «Shimadzu GC 17A», Япония) и масс-спектрометрического (ГХ-МС) (хроматографы «Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI» и «Agilent GC6890N», США) детекторов в экстрактах (Egorova *et al.*, 2013, 2020). Экстракцию ПХБ из культуральной среды осуществляли 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, экстракты обезвоживали  $Na_2SO_4$ ; либо гексаном в кислой среде (0.1 мл  $HCl_{конц}$ ) с разделением фаз центрифугированием (центрифуга Sigma 3-16P («Sigma», Германия), 10000 об/мин, 5 мин). Экстракцию ПХБ из почв проводили по «Методике выполнения измерений массовой концентрации полихлорбифенилов в воздухе рабочей зоны, промвыбросах, природных и сточных водах и почвах методом газожидкостной хроматографии» № 88-16358-25-2000. Расчет содержания ПХБ/модифицированных ПХБ в каждом исследуемом образце проводили методом внутренней нормализации, рассчитывая вклад отдельных соединений в суммарную площадь пиков. На основании полученных расчетных площадей пиков оценивали содержание исходных ПХБ/модифицированных ПХБ после процесса биодеструкции. **Анализ продуктов мета-расщепления ПХБ** (2-гидрокси-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты – ((хлор)ГОФДК) осуществляли как описано (Maltseva *et al.*, 1999). Количественное определение проводили согласно формулы с учетом известных значений коэффициента экстинкции ( $8Cl$ -ГОФДК = 28100  $l/(M \times cm)$ ,  $9Cl$ -ГОФДК = 17500  $l/(M \times cm)$ ) (Fortin *et al.*, 2005):

$$A = \varepsilon \times c \times l,$$

где  $A$  – значение оптической плотности при длине волны с максимальным поглощением,  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции,  $l/(M \times cm)$ ,  $c$  – концентрация,  $M$ ,  $l$  – длина оптического пути кюветы, см. **Метаболиты, образующиеся после расщепления (хлор)ГОФДК, определяли** в культуральной жидкости, освобожденной от клеток центрифугированием (описано выше), методом ВЭЖХ с использованием хроматографа LC-10ADvp («Shimadzu», Япония) с колонкой Lichrosorb RP-18 10U (250 x 4.6 мм) («Alltech», США) и УФ-детектором, а также хроматографа LC-20AD Prominace («Shimadzu», Япония) с колонкой (C-18 150x4.6 мм; «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором SPD-20A в системе ацетонитрил–0.1%-ная  $H_3PO_4$  (70:30 или 60:40). Идентификацию продуктов метаболизма проводили при сравнении времени удержания на колонке образовавшихся и стандартных соединений (Maltseva *et al.*, 1999). Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений. Концентрацию выделившихся ионов хлора рассчитывали согласно (Maltseva *et al.*, 1999).

**Определение активности ферментов разложения основных метаболитов ПХБ** проводили спектрофотометрически, используя спектрофотометр UV-160 («Shimadzu», Япония), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при 25°C в бесклеточных экстрактах культур штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51, предварительно выращенных на БК / 2-ХБК / 4-ХБК, полученных методом экструзионной дезинтеграции на прессе типа Хьюза как описано (Суворова и др., 2006). Определяли активность *пара*-гидроксibenзоат гидроксилазы (ПГБГ, КФ 1.14.13.33), протокатехоат 4,5-диоксигеназы (ПКК 4,5-ДО, КФ 1.13.11.8), протокатехоат 3,4-диоксигеназы (ПКК 3,4-ДО, КФ 1.13.11.3), катехол 1,2-диоксигеназы (ПК 1,2-ДО, КФ 1.13.11.1), катехол 2,3-диоксигеназы (ПК 2,3-ДО, КФ 1.13.11.2) как описано ранее (Stanier *et al.*, 1954; Ono *et al.*, 1970; Haddad *et al.*, 2001; Jadan *et al.*, 2004). Единицу

активности определяли как количество фермента, катализирующее превращение 1 мкМ субстрата или образование 1 мкМ продукта в минуту. Очистку ферментов проводили, как описано (Moiseeva *et al.*, 2001). Все процедуры по оценке чистоты и количеству белков, определения их состава и массы проводили, как описано (Суворова и др., 2006). Кажущиеся константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и значения  $V_{max}$  определяли методом двойных обратных величин в координатах  $1/V_0$  от  $1/S$ , где  $S$  – концентрация субстрата.

**Генетические и биоинформационные методы.** *Тотальную ДНК* выделяли из образцов почв с использованием коммерческого набора реактивов FastDNA Spin Kit («MP Biomedicals», США), из индивидуальных культур бактерий и бактериальных ассоциаций стандартными методами (Ausbel *et al.*, 1995). Концентрацию полученной ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer («Invitrogen», США) с использованием реактивов производителя. *Анализ структуры микробного сообщества* проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) с использованием праймеров 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост на 5'-конце, и 518R для амплификации фрагмента гена 16S рРНК, составляющего 566 п.н. (Muyzer *et al.*, 1993). *Плазмиды большой молекулярной массы* анализировали методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II («Bio-Rad Laboratories», США) согласно рекомендациям производителя. Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad Laboratories», США). *Амплификацию функциональных генов* (*bphA*, *benA*, *ohbA*, *phbB*, *fcba*, *fcbb*, *C23O*, *clcA*, *phaH*) проводили на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США) с использованием праймеров и согласно протоколов, представленных в (Шумкова, Плотникова, 2013; Mesarch *et al.*, 2000; Hickey, Sabat, 2001; Baldwin *et al.*, 2003; García *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Baggi *et al.*, 2008; Iwai *et al.*, 2011). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле (концентрация агарозы 0.8 – 1.5%) в 1x Трис-боратном буфере («Thermo Scientific», Литва) при напряжении 10V/см. **Определение нуклеотидных последовательностей** амплифицированных фрагментов функциональных генов проводили по методу Сэнгера с применением наборов SEQ Cyler Sequencing kit («JSC GE Healthcare», США) и Big Dye Terminator Ready Reaction kit 3.1 («Applied Biosystems», США) на приборах MegaBACE 1000 («JSC GE Healthcare», США) и Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ CLUSTAL W/X 1.83, TREECON v. 1.3b, CLC Sequence Viewer 6.5.3, MEGA 6.0/7.0/X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей производили по базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *Анализ нуклеотидной последовательности генома штамма-деструктора* осуществляли с использованием платформ PATRIC 3.6.6. (<https://patricbr.org>) и SEED Viewer 2.0. (<https://rast.nmpdr.org/>), а также пакета программ CONTIGuator\_v2.7. и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Полученные нуклеотидные последовательности функциональных генов и генома штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 депонировали в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Моделирование метаболических путей** проводили, основываясь на базах данных Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info>), KEGG (<http://www.genome.jp>), ExplorEnz (<http://www.enzyme-database.org>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с учетом экспериментальных результатов по метаболическому профилю, активности ферментов и исследованию функциональных генов.

**Моделирование структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы** проводили на основе экспериментально определенной нуклеотидной последовательности с использованием программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net>), UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>), SwissDock (<https://www.swissdock.ch>), SwissModel (<https://www.swissmodel.expasy.org>).

**Кинетические параметры деструкции** – эффективность деструкции хлорбифенилов (1), скорость деструкции субстрата (2), удельную скорость деструкции субстрата (3) рассчитывали согласно формул:

$$D(\%)=100-((C_i \times 100)/C_0) \quad (1), \quad V=(C_0 - C_i)/((t_i - t_0) \cdot C_{\text{клет}}) \quad (2), \quad V_{\text{уд}}=(\ln C_0 - \ln C_i)/(t_i - t_0) \quad (3),$$

где D – эффективность деструкции (%);  $C_0$  – концентрация субстрата/смеси ПХБ в начальный момент времени,  $C_i$  – концентрация субстрата/смеси ПХБ 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  $OP_{600} = 1.0$  о.е.

**Безопасность штаммов-деструкторов для животных и человека оценивали по показателям** антибиотикочувствительности и токсичности бактериальных штаммов (Методич. указ..., 2004; Частная медицинская микробиология ..., 2005).

**Статистическая обработка данных.** Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Анализ количественных показателей проводили с использованием пакетов программ MS Office Excel, Statistica 6.0 (<http://statsoft.ru>) и SAKE (<https://www.tessella.com>). Для описания результатов исследования применяли стандартные методы параметрической статистики: рассчитывали среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD). Сравнение двух групп проводили при помощи двустороннего критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимался в данном исследовании 0.05. Корреляционный коэффициент Пирсона ( $r$ ) вычисляли, используя MS Office Excel, оценку проводили согласно шкале Чеддока.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Разнообразие бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ

В работе использованы образцы почв девяти территорий (Россия, Украина), отличающихся экологическими условиями, количеством и качеством загрязнителей (рисунок 2). Используя метод накопительного культивирования, где в качестве селективного фактора применяли бифенил, ПХБ, БК, ХБК, выделено и описано 313 штаммов, обладающих активностью к (хлор)ароматическим соединениям. Наибольшее филогенетическое разнообразие представлено среди штаммов-деструкторов, выделенных из почв с территории г. Перми (125 штаммов, 15 родов), наименьшее – среди штаммов, выделенных из почв г. Серпухов (9 штаммов, 1 род). Статистический анализ показал, что существует прямая корреляционная зависимость между разнообразием химических загрязнителей в почве и филогенетическим разнообразием изолированных штаммов-деструкторов бифенила (коэффициент корреляции Пирсона – 0.924). Доминирующую позицию среди штаммов-деструкторов исследованных образцов почв занимали представители филумов *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*, что согласуется с литературными данными (Kolar *et al.*, 2007; Liz *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010; Matturo *et al.*, 2015; Stella *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015; Tu *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018).

### Метаболические пути аэробной бактериальной трансформации низкохлорированных бифенилов

Особенности бактериальной трансформации конгенов ПХБ, содержащих заместителей в одном кольце молекулы были изучены у бактерий родов *Bacillus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*. Установлено, что 114 штаммов осуществляют разложение 2-ХБ на 96–100%, 3-ХБ – 95–100%, 4-ХБ – 82–100%, 3,4-диХБ – 75–100%, 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ – 69–99% (начальная концентрация ХБ – 94.25 мг/л). Выявлено, что эффективность деструкции убывала в ряду моно-замещенный > ди-замещенный > три-замещенный хлорбифенил. Аналогичная закономерность описана для известных бактерий-деструкторов ПХБ (Shimura *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Gioia *et al.*, 2014). Следует отметить, что штаммы *Bacillus* sp. BD, MD7, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a, P2m, P2kr, P2(51), P23a, *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ас-2631D), CH628, EK7, KT112-7 (=ВКМ АС-2623D), MD1, MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, BBL12-2, BP9-1, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, KBB16, более эффективно разлагали моно- и ди-хлорбифенилы с заместителями в одном кольце, чем описанные ранее штаммы родов *Aquamicrobium*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Burkholderia* (Shimura *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Gioia *et al.*, 2014). Анализ метаболического профиля показал, что все исследованные штаммы осуществляли разложение данных ПХБ по «верхнему» пути с начальным диоксигенированием незамещенного кольца и последующим образованием соответствующей хлорбензойной кислоты (рисунок 4).

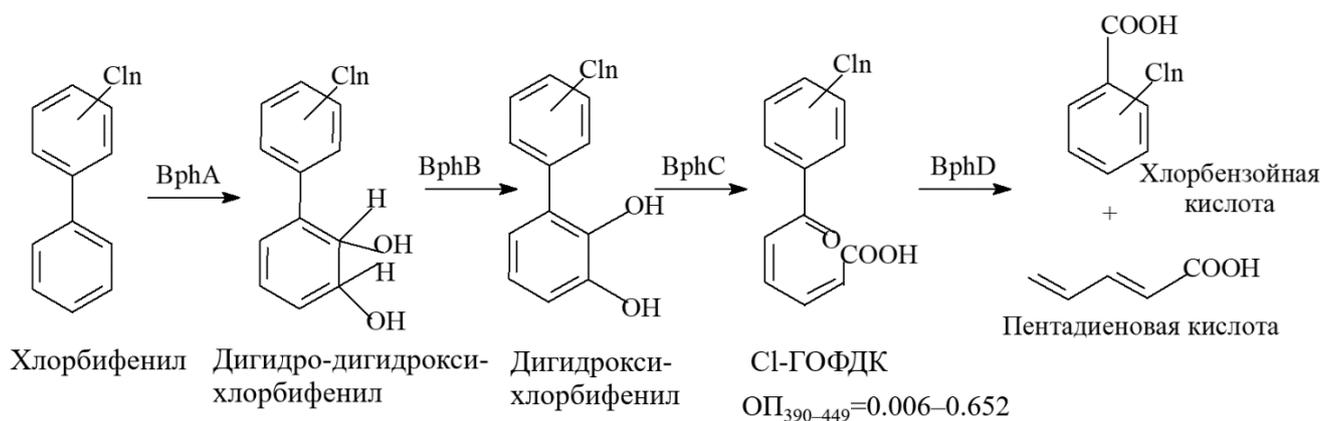


Рисунок 4 – Схема разложения хлорбифенилов с заместителями в одном кольце молекулы. n – количество атомов хлора в молекуле бифенила

Известно, что основными продуктами восстановительного дегалогенирования смесей полихлорбифенилов являются конгенеры, содержащие заместителей в *орто*- и *пара*-положениях (Maltseva *et al.*, 1999). В настоящем исследовании установлено, что штаммы родов *Microbacterium* (4 штамма), *Rhodococcus* (28 штаммов) и *Pseudomonas* (15 штаммов) осуществляют разложение 2,2'-диХБ и 2,4'-диХБ на 98–100%, 4,4'-диХБ – 76–100% (начальная концентрация 22.3 мг/л) (рисунки 5, 6).

Бифенил диоксигеназы исследуемых штаммов активнее окисляют *орто*-замещенное кольцо в молекуле ди(*орто*-)хлорированного бифенила (2,2'-диХБ), чем *пара*-замещенное кольцо в молекуле ди(*пара*-)хлорбифенила (4,4'-диХБ). При этом в случае окисления 2,2'-диХБ бифенил 2,3-ДО окисляет *орто*-замещенное кольцо дихлорбифенила по 2 и 3 углеродным атомам с последующим образованием 8Cl-ГОФДК и продукта ее гидролиза – 2-ХБК (Seach *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2005). Эффективность деструкции 2,2'-диХБ в 2–4 раза превышает аналогичный показатель

для известных штаммов рода *Pseudomonas* (Fedi *et al.*, 2001). Окисление 4,4'-диХБ происходило по «верхнему» пути с диоксигенированием по 2 и 3 углеродным атомам молекулы, основным конечным метаболитом являлась 4-ХБК. Анализ метаболического пути и активности деструкции 4,4'-диХБ показал, что ферменты «верхнего» пути представленных в настоящей главе штаммов отличаются спектром разлагаемых конгенов ПХБ от Vph-ферментов описанных штаммов родов *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* и *Pseudomonas* (Mondello *et al.*, 1997; Shimura *et al.*, 1999; Seach *et al.*, 2000; Iori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

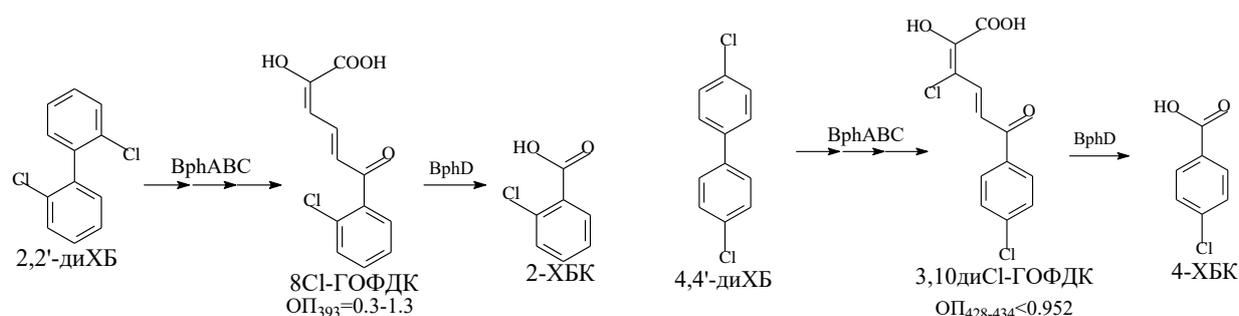


Рисунок 5 – Общая схема разложения ди(*орто*)- и ди(*пара*)-хлорированных бифенилов штаммами *Microbacterium* sp. P26, EK24, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, EK7, KT112-7, MD1, MD2, P12, P13, P20, *Rhodococcus* sp. B7a, BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, EK12, G10, SN31, DB11, *R. opacus* EK9, *R. jostii* EK8, *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a, P2kr, P23a, *Pseudomonas* sp. P24, S210, B106, G13, G11, G12, S212, B2, B7, B8, P22, P23, S211, VRP2-6, MD8

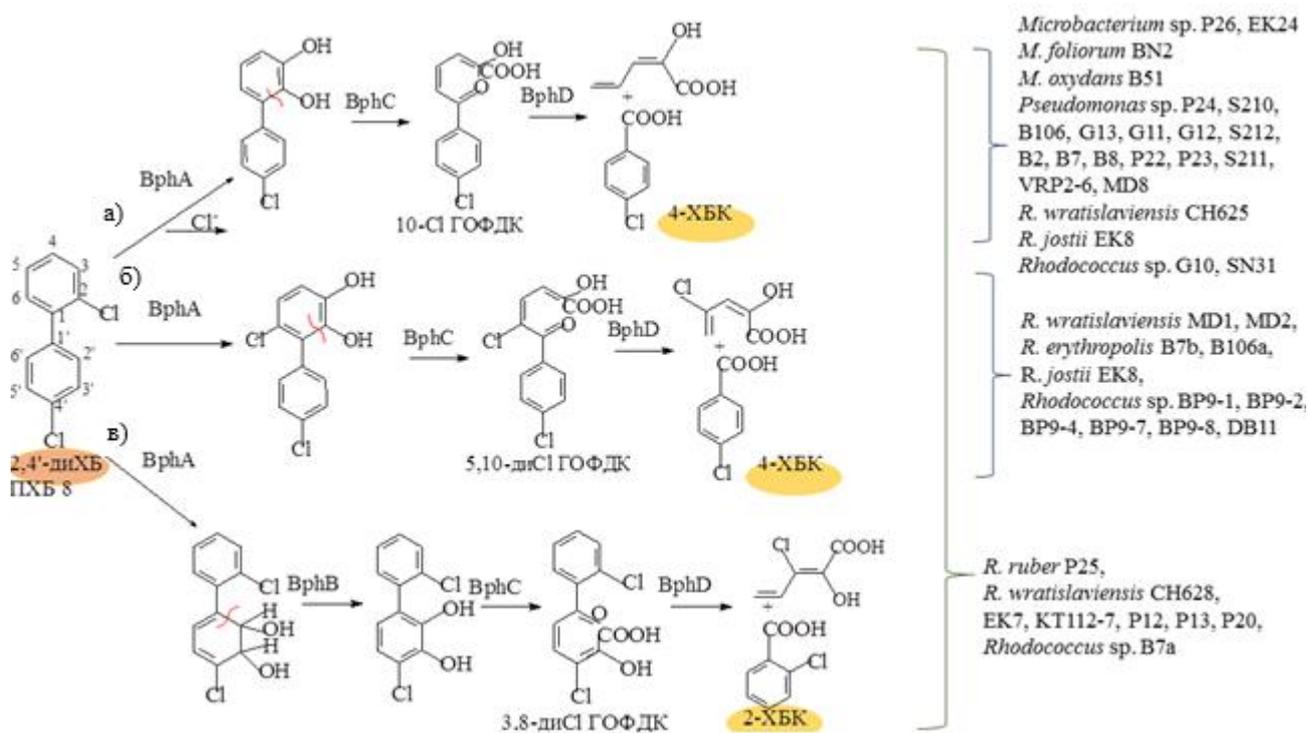


Рисунок 6 – Схема аэробного бактериального разложения 2,4'-диХБ, построенная на основании экспериментальных данных и сведений из международных баз данных (KEGG, NCBI). Описание приведено в тексте

Интересные результаты получены при анализе наиболее вероятных метаболических путей разложения 2,4'-диХБ исследуемыми штаммами (рисунок 6). Среди основных метаболитов, образующихся при расщеплении 2,4'-диХБ, у 35 штаммов выявлена 4-ХБК, а у 8 штаммов – 2-ХБК и 4-ХБК (рисунок 6). Основываясь на экспериментальных и литературных данных можно сделать вывод, что бифенил 2,3-ДО штаммов *R. wratislaviensis* MD1, MD2, *R. erythropolis* B7b, B106a, *R. jostii* EK8, *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11 осуществляет окисление *ortho*-замещенного кольца 2,4'-диХБ по 5 и 6 углеродным атомам (рисунок 6, путь б), а у остальных 24 штаммов – по 2 и 3 углеродным атомам *ortho*-замещенного кольца 2,4'-диХБ (рисунок 6, путь а). В случае, когда среди основных метаболитов 2,4'-диХБ зафиксирована 2-ХБК, бифенил 2,3-ДО осуществляет окисление *para*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ (рисунок 6, путь в). Присутствие в культуральной среде в качестве основных метаболитов и 2-ХБК и 4-ХБК свидетельствует, что бифенил 2,3-ДО осуществляет окисление как *ortho*-, так и *para*-замещенных колец 2,4'-диХБ.

Установлено, что штаммы *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *Rhodococcus* sp. B7a (класс *Actinobacteria*) осуществляют разложение конгенов ПХБ, с расположением заместителей по типу {2+1}: 2,4,2'-триХБ на 40–89% и 2,4,4'-триХБ на 10–67% (начальная концентрация 12.8 мг/л) (рисунок 7).

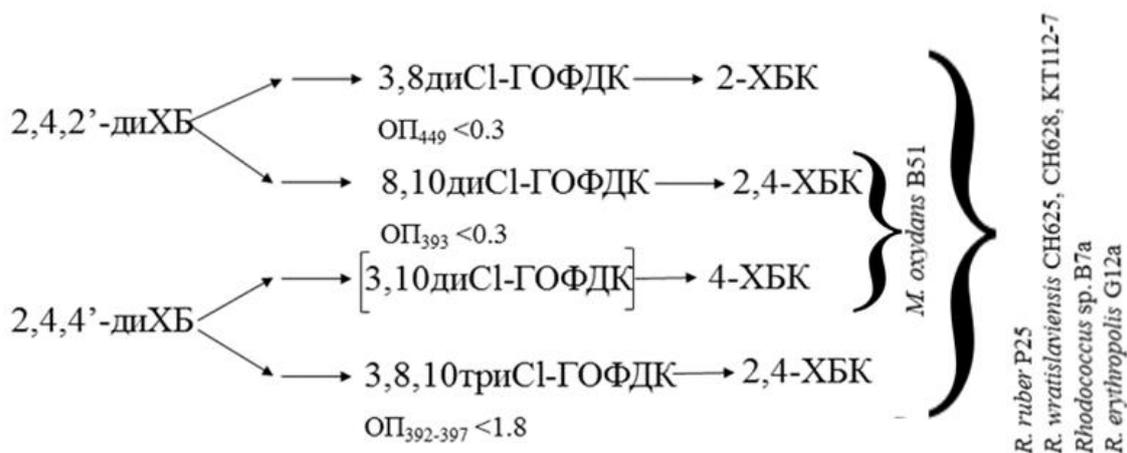


Рисунок 7 – Общая схема разложения трихлорированных бифенилов исследуемыми штаммами

Анализ основных метаболитов при разложении 2,4,2'-триХБ показал, что бифенил 2,3-ДО данных штаммов осуществляют окисление как моно-, так и дизамещенного кольца молекулы трихлорбифенила, о чем свидетельствует образование 2-ХБК/4-ХБК и 2,4-ХБК в качестве основных метаболитов.

Таким образом, проведенные скрининговые исследования позволили выделить группу наиболее активных штаммов-деструкторов ПХБ: *Microbacterium oxydans* B51, *Rhodococcus ruber* P25 (=ИЭГМ 896; GenBank LDUF01000000), *R. wratislaviensis* P1, G10, KT112-7 (=ВКМ Ac-2623D; GenBank CP072193), CH625 (=ВКМ Ac-2631D), CH628, *R. erythropolis* G12a, *Rhodococcus* sp. MD1, MD2, B7a, *Pseudomonas* sp. MD8, VRP2-2, VRP2-6. Данные штаммы были подробно изучены на генетическом и метаболическом уровнях, а также проведена оценка перспективности их применения в качестве агентов для биоремедиационных препаратов.

## Молекулярно-генетическая характеристика активных штаммов-деструкторов ПХБ

**Внехромосомные элементы.** Одной из особенностей строения геномов активных штаммов-деструкторов ароматических соединений является наличие плазмид большой молекулярной массы, на которых могут располагаться гены, кодирующие ферменты деструкции (Nagata *et al.*, 2010; Ghosal, Kimura *et al.*, 2018; Willetts, 2019; Bhatt *et al.*, 2021). Анализ геномной ДНК методом пульс-электрофореза позволил установить в рамках настоящего исследования наличие высокомолекулярных плазмид у 31 штамма из 82 штаммов-деструкторов ПХБ и ХБК (рисунки 8, 9).

Размеры выявленных плазмид (110–1100 т.п.н) сопоставимы с плазмидными ДНК, несущими гены деструкции бифенила/ПХБ у известных штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, что позволяет предположить возможность плазмидной локализации *bph*-генов у исследуемых штаммов (Shimizu *et al.*, 2001; Suenaga *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2010; Ilori *et al.*, 2015 Kimura *et al.*, 2018).

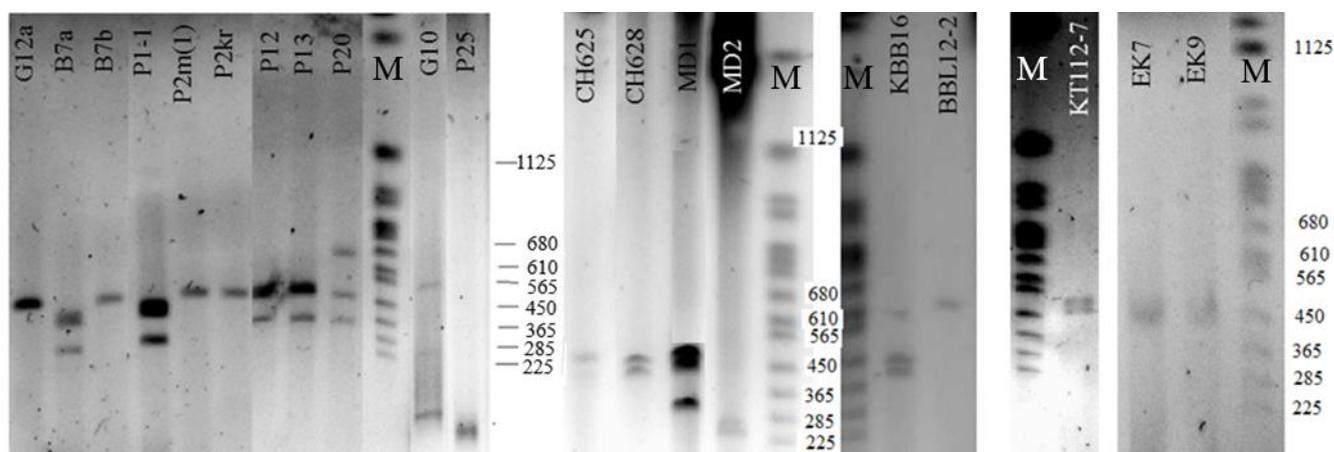


Рисунок 8 – Электрофореграммы нативной ДНК штаммов рода *Rhodococcus*: названия штаммов обозначены на «дорожках», М – маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США)

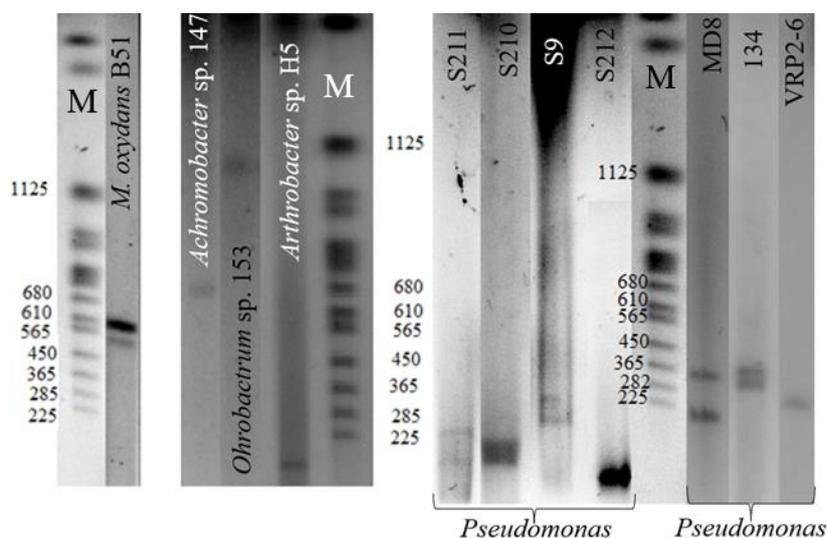


Рисунок 9 – Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов: названия штаммов обозначены на «дорожках», М – маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США)

**Разнообразие  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы.** Бифенил 2,3-ДО является первым ферментом окисления ПХБ и состоит из трех  $\alpha$ - и трех  $\beta$ -субъединиц, активный центр фермента располагается на  $\alpha$ -субъединице (Gibson, Parales, 2000; Pieper, 2005). В результате использования праймеров (Шумкова, Плотникова, 2013; Baldwin *et al.*, 2003; Iwai *et al.*, 2011) у 7 штаммов рода *Pseudomonas* и 24 штаммов рода *Rhodococcus* был амплифицирован ген *bphA1*, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу бифенил 2,3-ДО. Секвенирование и последующий анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных участков генов с ДНК штаммов *Pseudomonas* sp. S9, S13, S210, S211, S212, выявил высокий уровень сходства (99.1–100%) с гомологичными генами штаммов-деструкторов ПХБ *Pseudomonas* sp. B4 и *Achromobacter* sp. BP3 (Rodarie, Jouanneau, 2001; Hong *et al.*, 2009). *bphA1*-Гены штаммов *Pseudomonas* sp. VRP2-2 и *Pseudomonas* sp. VRP2-6 сходны на 97.3% с таковым геном штамма *P. putida* B6-2, в геноме которого выявлен «классический» кластер *bph*-генов (*bphABCKHJID*) (Li *et al.*, 2009). При этом *bphA1* исследованных штаммов рода *Pseudomonas* характеризуются наибольшим сходством с генами бифенил/толуол диоксигеназ (Б/Т ДО) грамтрицательных штаммов (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ дедуктивных аминокислотных последовательностей, полученных на основе нуклеотидной последовательности генов *bphA1* исследуемых штаммов

Штамм	Семейство диоксигеназ, сходство, %	Штамм	Семейство диоксигеназ, сходство, %
<b>P25*</b> , S9a	ФПДО 97.7-100%	<b>B7b</b> , B106a, <b>G12a</b> , <b>P2kr</b>	БДО 99.5-100%
<b>S9</b> , S13, <b>S210</b> , <b>S211</b> , <b>S212</b> , VRP2-2, VRP2-6	Б/Т ДО (грам- отрицательные бактерии) 97.3-100%	<b>G10</b> , P1, <b>P12</b> , <b>P13</b> , <b>P20</b> , <b>KT112-7</b> , <b>EK7</b> , EK10, EK11, <b>CH625</b> , BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-8	Б/Т ДО (грам-положительные бактерии) 87.1-99.6%

\*Жирным шрифтом выделены штаммы, у которых выявлены плазмиды большой молекулярной массы (рисунки 8, 9).

*bphA1*-Гены штаммов *Pseudomonas* sp. S13 и *Pseudomonas* sp. VRP2-2, вероятно, локализованы на хромосоме, так как у данных штаммов не выявлено плазмид. Интересным представляется тот факт, что штаммы *Pseudomonas* sp. S9, *Pseudomonas* sp. S210, *Pseudomonas* sp. S211 и *Pseudomonas* sp. S212, выделенные из почв г. Серпухов, содержат плазмиды большой молекулярной массы (рисунок 9) и характеризуются наличием *bphA1*-генов с высоким уровнем гомологии. Полученные данные позволяют предположить, что *bphA1*-гены распространялись среди штаммов рода *Pseudomonas* данного микробиоценоза в результате горизонтального переноса.

Установлено, что гены *bphA1* штаммов *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a и P2kr имеют высокий уровень сходства (99.5–100%) с гомологичными генами *bphA* штаммов-деструкторов бифенила *R. erythropolis* TA431, *R. rhodochrous* K37, *Rhodococcus* sp. R04 и HA99, кодирующих ферменты семейства бифенил ДО (БДО), существенно отличающихся от представителей семейства Б/Т ДО (таблица 1) (Taguchi *et al.* 2007;

Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Можно предположить, что хромосомальная локализация генов характерна только для штамма *R. erithropolis* B106a, так как у остальных выявлены плазмиды (рисунок 8).

Классические гены семейства Б/Т ДО выявлены у штаммов *R. wratislaviensis* P1, P12, P13, P20, KT112-7, EK7, EK10, EK11 и CH625, *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, уровень сходства с *bphA1* генами известных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ (*R. jostii* RHA1, *R. opacus* ВЕ-20, *R. erythropolis* BD2) составлял 83.1–99.4%. Штаммы, вошедшие в данную группу, выделены из трех разных экотопов: почвы промышленных предприятий г. Перми – штаммы *R. wratislaviensis* P1, P12, P13, P20, почвы лесопарковых зон г. Перми – штаммы *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, почвы г. Чапаевск – штамм *R. wratislaviensis* CH625. Присутствие генов *bphA1* с высоким уровнем гомологии может быть обусловлено наличием плазмид в геноме рассматриваемых штаммов (рисунки 8, 9).

У штамма *R. wratislaviensis* G10 амплифицирован ген, показавший наибольший уровень сходства (99.6%) с диоксигеназой штамма-деструктора толуола *Arthrobacter* sp. ЗУСЗ (таблица 1) (Witzig *et al.*, 2006).

Анализ аминокислотных последовательностей, полученных на основе нуклеотидных последовательностей генов *bphA1*, выявленных у штаммов *R. ruber* P25 и S9a, показал, что данные ферменты принадлежат семейству фенил пропионат диоксигеназ (ФПДО) (таблица 1). Для выявленных последовательностей максимальный уровень сходства с  $\alpha$ -субъединицами ФПДО штаммов *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 и *R. eruthropolis* TA421 составил 68.7–76.9%, что свидетельствует о высокой вероятности уникальности выявленных генов/ферментов.

Для моделирования структуры  $\alpha$ -субъединицы БДО штаммов-деструкторов ПХБ *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25 были использованы нуклеотидные последовательности генов *bphA1*<sub>KT112-7</sub> (GenBank MW070531, плазмида pRHWK1) и *bphA1*<sub>P25</sub> (GenBank KP985699.1). В результате дедуктивной трансляции и моделирования установлены вторичная и третичная структуры BphA1<sub>KT112-7</sub> и BphA1<sub>P25</sub> (рисунок 10). Анализ параметров показал, что для BphA1<sub>KT112-7</sub> получена достоверная модель (93–99%), которая на 98.65% сходна с BphA1<sub>RHA1</sub> (Furusawa *et al.*, 2004). BphA1<sub>P25</sub> характеризуется уникальной третичной структурой, так как в международных базах данных отсутствует модель 3D-структуры диоксигеназы с высоким уровнем сходства.

#### Вторичная структура

*R. wratislaviensis* KT112-7

$\alpha$ -спирали :  $\beta$ -тяжи  
1 : 0.89

*R. ruber* P25

$\alpha$ -спирали :  $\beta$ -тяжи  
1 : 1.38

#### Третичная структура

*R. wratislaviensis* KT112-7

$S=17.84 \times 10^3 \text{ \AA}^2$   
 $V=55.63 \times 10^3 \text{ \AA}^3$

*R. ruber* P25

$S=15.20 \times 10^3 \text{ \AA}^2$   
 $V=32.40 \times 10^3 \text{ \AA}^3$

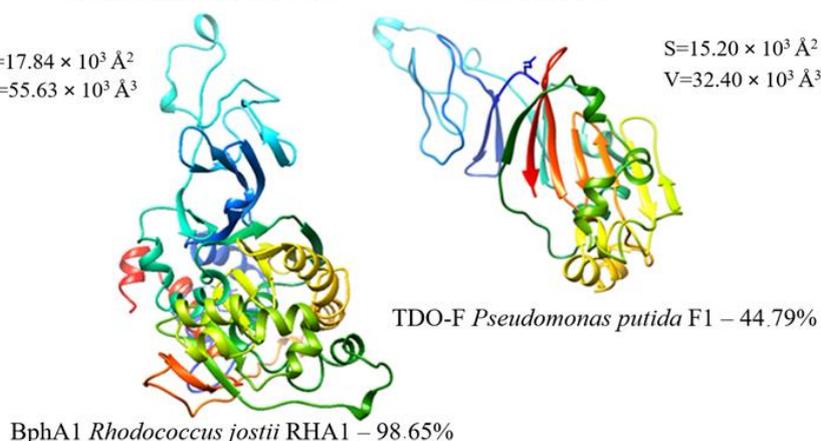


Рисунок 10 – Вторичная и третичная структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25

Геном штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 представлен хромосомой, размером 7587912 п.н. (GenBank CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 – 281912 п.н. (GenBank CP072194.1) и pRHWK2 – 130937 п.н. (GenBank CP072195.1). Содержание GC-оснований в хромосоме составило 67.5%, тогда как в плазмидах – 64.3 и 64.1%, соответственно. При анализе генома выявлено 7931 белок-кодирующих последовательностей, основная часть которых локализована на хромосоме – 7554. При аннотации генома в базу данных GenBank штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 был реклассифицирован как *R. opacus* KT112-7 с использованием средней идентичности нуклеотидов (ANI) (степень идентичности 99.294% при охвате генома 88.9%). В результате анализа генома штамма KT112-7 установлено, что гены бифенильного пути располагаются в трех оперонах на хромосоме (*bphEGFC*, *bphCDFAD*-монооксигеназа, *bphAB*), оперон *bphA1A2A3A4CBE* – на плазмиде pRHWK1, а гены *bphA1A2* – на плазмиде pRHWK2 (рисунок 11).

Установлено, что аминокислотные последовательности ферментов, кодируемые *bph*-генами, расположенными на плазмиде pRHWK1, имеют наибольший уровень сходства (91–100%) с аминокислотными последовательностями гомологичных ферментов известных штаммов-деструкторов *R. jostii* RHA1 и *R. opacus* B4 (Suenaga *et al.*, 2002; Zielinski *et al.*, 2003; Furusava *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2007).

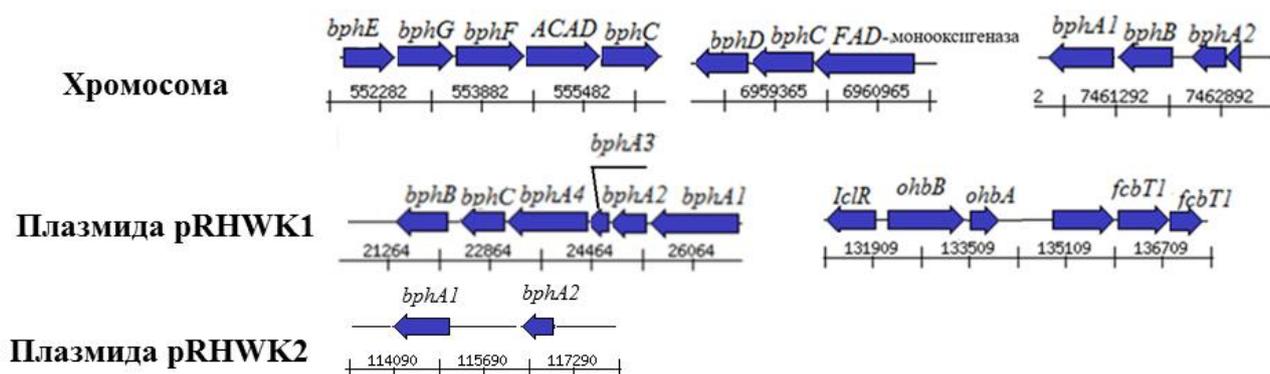


Рисунок 11 – Расположение генов деструкции бифенила/ПХБ и ХБК на хромосоме и на плазмидах штамма KT112-7. *bphA1* – ген  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA2* – ген  $\beta$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA3* – ген ферредоксина, *bphA4* – ген ферредоксин редуктазы; *bphC* – ген 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназы; *bphD* – ген ГОФДК-гидролазы; *bphH(E)* – ген 2-кето-4-пентеноат гидратазы; *bphI(F)* – ген 4-гидрокси-2-оксвалерат альдолазы, *ACAD* – ген Ацил-КоА-дегидрогеназы, *lclR* – ген регуляторного белка, *ohbB* – ген  $\alpha$ -субъединицы орто-галобензоат 1,2-диоксигеназы, *ohbA* – ген  $\beta$  субъединицы орто-галобензоат 1,2-диоксигеназы, *fcbT1* – ген транспортного белка

Известно, что *bph*-гены штамма *R. jostii* RHA1 и *bnz*-гены штамма *R. opacus* B4, гомологичные *bph*-генам штамма KT112-7 располагаются на плазмидах: pRHL1 и pROB02, соответственно. Порядок расположения генов в оперонах данных штаммов также совпадает: у штаммов KT112-7 и RHA1 - *bphA1A2A3A4CB*, у штамма B4 – *bnzA1A2A3A4CB* (Na *et al.*, 2005, Pieper, 2005). 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.*, 1997). Анализ нуклеотидных последовательностей гена *bphA1* штамма KT112-7, полученных в

результате амплификации и в результате полногеномного анализа, свидетельствуют о том, что использованные в настоящем исследовании праймеры позволили выявить ген *bphA1*, локализованный на плазмиде pRHWK1 штамма KT112-7.

Аминокислотные последовательности, кодируемые генами «*bphA1bphA2*», расположенными на хромосоме и на плазмиде pRHWK2 (рисунок 11), имеют наибольший процент сходства с нафталин диоксигеназой (97–100%) штаммов рода *Rhodococcus*. Подобное сочетание генов деструкции бифенила в одном штамме (плазмидная локализация оперона с высоким уровнем сходства с «классическими» *bph*-генами и хромосомная локализация оперона с высоким уровнем сходства с генами деструкции нафталина) ранее не описана.

В результате анализа генома штамма KT112-7 на плазмиде pRHWK1 выявлен оперон *lclRohbBAfcbT1*, при этом на хромосоме также выявлены гены *ohbBA* (4804486–4805746 н.) (рисунок 11). Наличие генов *ohbAB* (Tsoi et al., 1999; Hickey et al., 2001, Hickey, Sabat, 2001) в геноме штамма KT112-7 обуславливает способность разлагать 2-ХБК. Напротив, проведенный анализ генома штамма не позволил выявить гены, кодирующие ферменты разложения 4-ХБК. Можно предположить, что утилизация 4-ХБК происходит под действием ферментов, кодируемых уникальными генами, либо за счет широкой субстратной специфичности других ферментов деструкции ароматических соединений. Так, в геноме штамма KT112-7 выявлен ген *robA* (хромосома 3273258–3272080 н.), кодирующий фермент 4-гидроксибензоат 3-монооксигеназу/4-гидроксибензоат гидроксилазу (КФ 1.14.13.2) (Kuatsjah et al., 2022). Гомологичные гены с высоким уровнем сходства (97–98%) присутствуют в геномах штаммов *R. opacus* 1CP (GenBank ANS30736.1) и *R. jostii* RHA1 (GenBank ABG94344.1). Можно предположить, что данный фермент осуществляет гидроксилирование 4-ХБК. В геноме штамма KT112-7 (GenBank CP072193.1) выявлены гены, осуществляющие окисление 3-гидрокси-, 4-гидрокси- и 3,4-дигидрокси БК, а также все гены, осуществляющие разложение катехола и хлоркатехолов до соединений цикла Кребса.

Таким образом, анализ генома штамма KT112-7 выявил уникальное сочетание генов деструкции бифенила/ПХБ и соединений, образующихся при аэробной бактериальной трансформации бифенила/ПХБ, что свидетельствует о перспективности данного штамма для дальнейшего изучения и применения в технологиях разложения бифенила и его производных.

**Характеристика генов/ферментов, участвующих в метаболизме (хлор)/(гидрокси)бензойных кислот и (хлор)катехолов, активных бактерий-деструкторов ПХБ.** Установлено, что штаммы *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51 используют в качестве единственного источника углерода БК, а также моно- и ди-гидрокси-, моно- и ди-хлорбензойные кислоты, являющиеся основными метаболитами ПХБ/гидрокси-ПХБ. Разложение БК осуществляется по двум метаболическим путям: а) окисление БК до катехола под действием бензоат ДО (*benA*) с последующим расщеплением под действием катехол 1,2-ДО (активность 0.07–2.297 мкМ/мин·мг) и далее муконатциклоизомеразы (активность 0.007–0.05 мкМ/мин·мг) или катехол 2,3-ДО (активность 0.003 мкМ/мин·мг у штамма G10) с последующей трансформацией интермедиатов до соединений цикла Кребса (рисунок 12); б) выявленная активность ПКК 3,4-ДО (0.04–0.17 мкМ/мин·мг) свидетельствует о возможном разложении БК штаммами рода *Rhodococcus* через стадию 3,4-дигидрокси-БК с последующей ее трансформацией до соединений основного обмена клетки (рисунок 12).

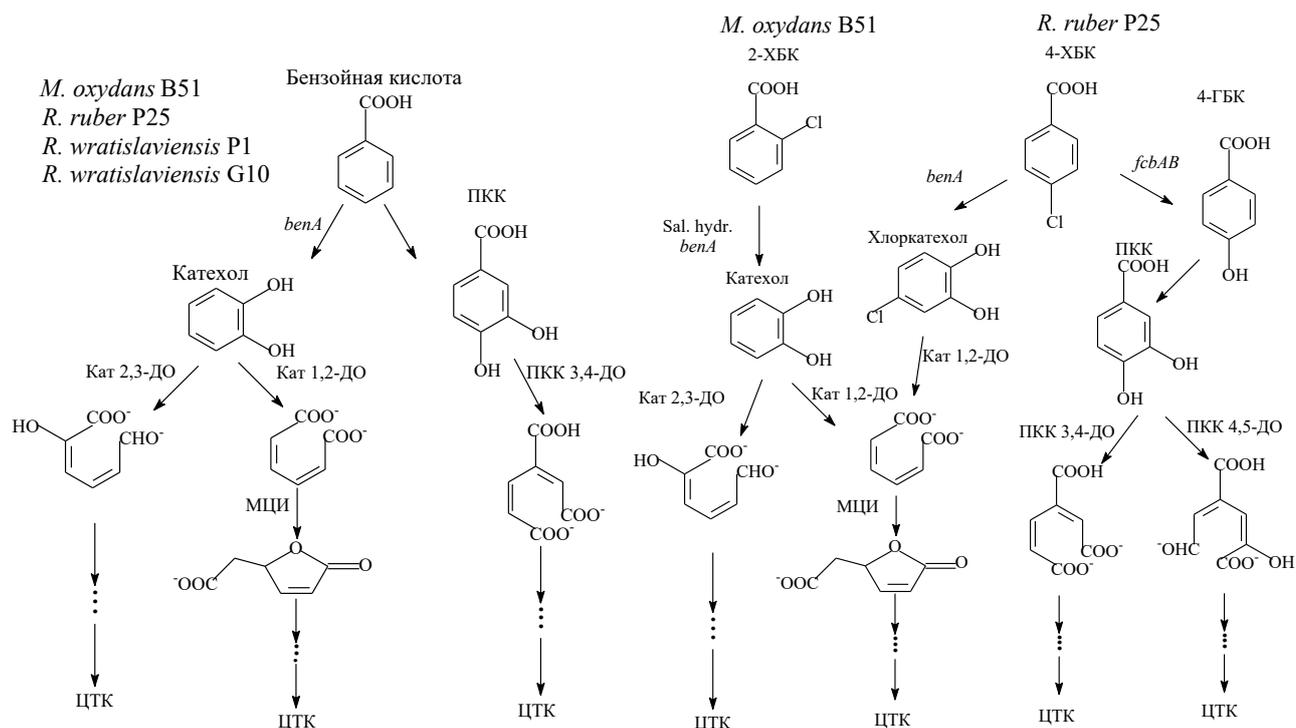


Рисунок 12 – Схема бактериальной деструкции БК, 2-ХБК, 4-ХБК, построенная на основании субстратной специфичности, генетического и ферментного профиля штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51

*benA*-Ген, кодирующий  $\alpha$ -субъединицу бензоат ДО, штаммов P1 и G10 обладает наибольшим сходством (97–99%) с гомологичным геном штаммов *R. jostii* RHA1 и *Rhodococcus* sp. DK17, тогда как *benA*<sub>P25</sub> только на 88% схож с данными генами, *benA*<sub>B51</sub> обладает наибольшим сходством (97%) с *benA* штамма *A. crystallopoietes* DSM20117 (рисунок 13).

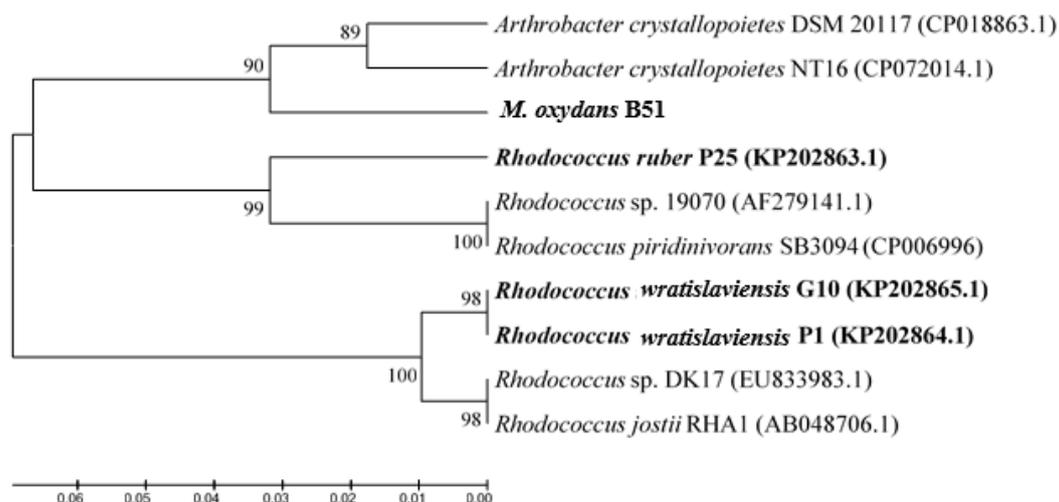


Рисунок 13 – Дерево сходства нуклеотидных последовательностей, гомологичных исследуемым участкам генов  $\alpha$ -субъединицы бензоат 1,2-ДО

Известно, что бензоат 1,2-ДО обуславливает деградативную активность штаммов не только к бензойной кислоте, но и к ее хлорпроизводным, при этом образуются хлоркатехолы (Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017). У исследуемых

штаммов выявлена катехол 1,2-ДО, проявляющая активность к 4-хлоркатехолу (метаболит 4-ХБК при окислении бензоат 1,2-ДО) (относительная активность 1–11%) и к дихлоркатехолам (относительная активность 4–119%). Таким образом, способность разлагать ХБК у штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51 обусловлена, вероятно, деградативной активностью бензоат 1,2-ДО.

У штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 выявлено уникальное сочетание ферментов при культивировании на ХБК (рисунок 12). Культивирование штамма *M. oxydans* B51 на 2-ХБК приводит к экспрессии НАДФН-зависимой салицилат гидроксилазы (5.46 мкМ/мин·мг). При этом активность данного фермента сопоставима с активностью катехол 2,3-ДО (5.15 мкМ/мин·мг). Полученные результаты позволяют предположить, что салицилат гидроксилаза штамма B51 осуществляет не типичную реакцию гидролиза 2-ХБК до катехола, с последующим его *мета*-расщеплением до 2-гидроксимуконат полуальдегида (рисунок 10). При культивировании штамма *R. ruber* P25 на 4-ХБК, наряду с катехол 2,3-ДО (0.02 мкМ/мин·мг) экспрессируются ПГБГ (11.67 мкМ/мин·мг) и ПКК 4,5-ДО (15.0 мкМ/мин·мг) (рисунок 10). Ранее было показано, что а штамме P25 присутствуют *fcf*-гены, кодирующие ферменты трансформации 4-ХБК до 4-гидроксиБК (Плотникова и др., 2012). В случае культивирования штамма *R. ruber* P25 на 4-гидрокси-БК в качестве ростового субстрата, выявлена экспрессия ПКК 3,4-ДО, но не ПКК 4,5-ДО (как и в случае культивирования на незамещенной бензойной кислоте). Однако, ПКК 3,4-ДО была представлена двумя изоформами, характеризующимися разными значениями каталитических показателей: а)  $K_m$  для ПКК – 7.7 мкМ,  $V_{max}$  – 143 мкМ/ мин · мг белка; б)  $K_m$  для ПКК – 83 мкМ,  $V_{max}$  – 85 мкМ/ мин · мг белка. Присутствие нескольких изоформ одного фермента может являться адаптивным механизмом, позволяющим приспособиться штамму к химическому загрязнению (Ornston, Parke, 1976). Анализ полученных результатов позволяет предположить, что штамм *R. ruber* P25 обладает уникальным набором ферментов, позволяющих осуществлять трансформацию хлор- и гидрокси-бензойных кислот как через стадию образования (хлор)катехола с его последующим *орто*- или *мета*-расщеплением, так и через стадию образования *пара*-гидроксибензойной кислоты, с последующим ее окислением до протокатеховой кислоты. В свою очередь, образующаяся ПКК является субстратом как для интрадиольных, так и для экстрадиольных диоксигеназ, представленных в данном штамме (рисунок 12).

Таким образом, установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 и *Microbacterium* sp. B51, выделенные из химически-загрязненных почв (территории предприятий Перми и Пермского края), обладают уникальным сочетанием генов/ферментов деструкции основных метаболитов бифенила/ПХБ.

### **Бактериальная деструкция коммерческих и экспериментальных смесей полихлорированных бифенилов**

Так как в объектах окружающей среды ПХБ находятся преимущественно в виде смесей, то необходимо исследовать активность бактериальных штаммов-деструкторов не только по отношению к отдельным конгенерам ПХБ, но и к их смесям. Известно, что коммерческие смеси содержат от 40 до 70 конгенов ПХБ (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erickson, Kaley, 2011).

**Бактериальная деструкция экспериментальной смеси ПХБ (смесь А) (88.3% тетрахлорированных конгенов, состав – 20 конгенов ПХБ).** В экспериментах с «отмытыми» клетками установлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a и *M. oxydans* B51 за трое суток осуществляют деструкцию смеси А при начальной концентрации 32 мг/л на 78–100%. Наибольшую активность проявлял

штамм *M. oxydans* B51. Установлено, что в культуральной жидкости штаммов *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 при деструкции смеси А присутствуют (хлор)ГОФДК, ХБК, гидрокси-БК, что характерно для разложения ПХБ по «верхнему» бифенильному пути. Отсутствие зависимости концентрации данных метаболитов от времени деструкции смеси А, а также присутствие в культуральной жидкости ионов хлора (83.8% от максимально возможного при полном дехлорировании исходной смеси) свидетельствует об утилизации смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 без накопления значительных количеств токсичных хлорированных метаболитов, что обуславливает перспективность их использования в технологиях утилизации смесей полихлорбифенилов.

**Бактериальная деструкция коммерческих смесей ПХБ (Delor 103/ТХБ, Совол).** Коммерческие смеси ПХБ торговых марок Delor 103 (Чехословакия) и ТХБ (СССР) идентичны по набору конгенов ПХБ, и характеризуются преимущественным содержанием три- и тетра-замещенных бифенилов (Первова и др., 2015; Erikson, Kaley II, 2011). В смеси Совол основную долю составляют пента- и гекса-хлорбифенилы (Кириченко и др., 2000; Erikson, Kaley II, 2011). Среди всего спектра коммерческих смесей ПХБ, наиболее близкими по составу к Delor 103/ТХБ являются Aroclor 1242 (США), Kaneclor 300 (Япония), а к составу Совола – Aroclor 1248 и Aroclor 1254 (США).

Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25 (Пермский край, Россия), *Rhodococcus* sp. MD1 и *Pseudomonas* sp. MD8 (г. Калуш, Украина) осуществляют 100%-ное разложение смеси Delor 103/ТХБ за 14 сут (рисунок 14). Степень утилизации смеси Delor 103/ТХБ штаммом *Rhodococcus* sp. MD2 (г. Калуш, Украина) к 14 сут составила 92.7%. Известные штаммы-деструкторы ПХБ *P. aeruginosa* TMU56, *Pseudomonas* sp. SA-6, *Burkholderia* sp. TSN101, *Enterobacter* sp. SA-2 и *Ralstonia* sp. SA-5 осуществляют разложение Aroclor 1242 (100–200 мг/л) /Kaneclor 300 (50–150 мг/л) на 37–91% (Mukerjee-Dhar *et al.*, 1998; Adebusoeye *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

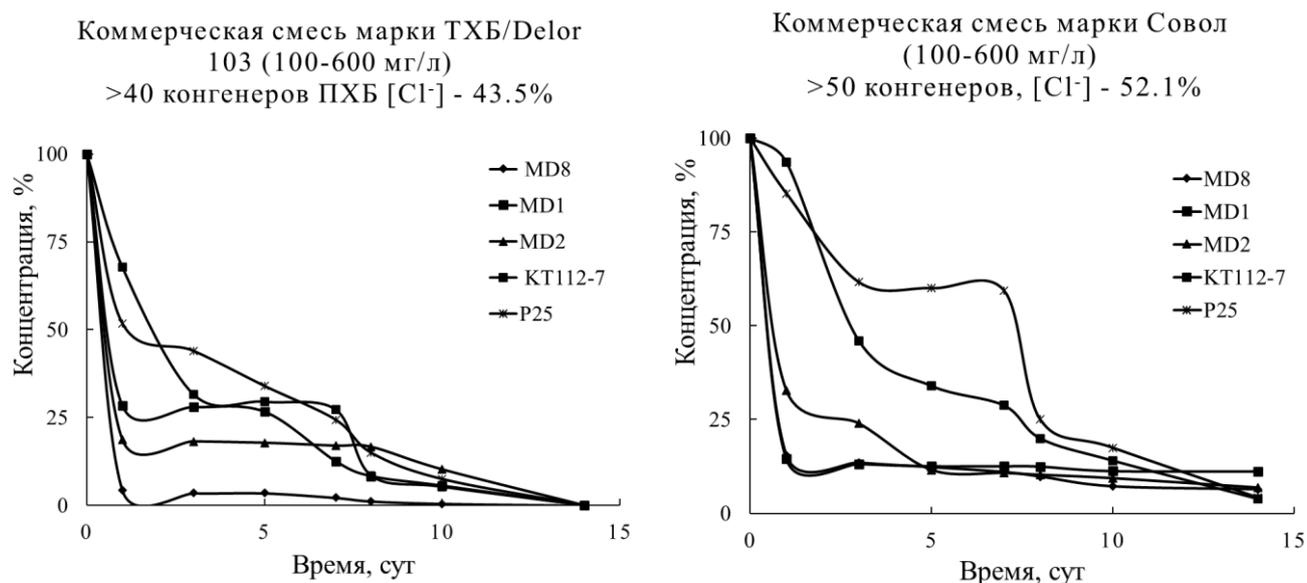


Рисунок 14 - Разложение Delor 103/ТХБ и Совола (%) штаммами *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2 и *Pseudomonas* sp. MD8 (начальная концентрация ТХБ и Совола 600 мг/л), *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25 (начальная концентрация ТХБ и Совола 100 мг/л)

Установлено, что за 14 сут штаммы *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25 и *Pseudomonas* sp. MD8 осуществляют разложение 88.8–96.1% смеси ПХБ марки Совол (рисунок 14). За исключением штамма MD2, удельная скорость деструкции Совола у исследуемых штаммов ниже аналогичного показателя при разложении Delor 103/ТХБ в 1.2–2.8 раза (таблица 2). Активный штамм-деструктор ПХБ *P. xenovorans* LB400 осуществляет разложение 25 мг/л Aroclor 1248 на 76% за 7 сут (Bako *et al.*, 2021). При сравнении аналогичного периода деструкции в настоящем исследовании установлено, что штамм KT112-7 разлагает за 7 сут 71.2% Совола, что близко к деградативной активности штамма LB400, а штамм P25 – 40.6% Совола, что ниже показателя штамма LB400. Штаммы MD1, MD2 и MD8 за 8 сут осуществляют разложение 87.5, 89.7 и 90.2% Совола соответственно, что превышает аналогичный показатель штамма LB400 (рисунок 14).

Таблица 2 – Удельная скорость деструкции коммерческих смесей ПХБ, сут<sup>-1</sup>

Смесь ПХБ	Штаммы				
	<i>Pseudomonas</i> sp. MD8	<i>Rhodococcus</i> sp. MD1	<i>Rhodococcus</i> sp. MD2	<i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	<i>R. ruber</i> P25
ТХБ/Delor 103	0.556	0.311	0.283	0.293	0.259
Совол	0.290	0.259	0.284	0.195	0.174

Анализ полученных результатов показал, что исследуемые штаммы эффективно разрушают смеси ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол. Однако деградативные показатели в случае разложения Совола ниже, чем при трансформации Delor 103/ТХБ. Причина такого результата, очевидно, кроется в конгенерном составе смесей ПХБ и в особенностях ферментных систем самих штаммов. Известно, что чем выше степень хлорирования молекулы ПХБ, тем больше времени необходимо для адаптации активного центра и преобразования молекулы БДО в оптимальную конформацию для взаимодействия с молекулой ПХБ и тем ниже скорость биоразложения (Сао *et al.*, 2011). Наиболее труднодоступными для диоксигенирования являются конгенеры ПХБ, содержащие заместители в *para*-положении (Сао *et al.*, 2011). В смеси Delor 103/ТХБ количество конгенов, содержащих *para*-атомы хлора, составляет менее 50%, в смеси Совол таких конгенов более 80%. Очевидно, что данные факторы приводят к снижению скорости бактериальной деструкции при разложении Совола.

Таким образом, проведенные исследования показали, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2 и *Pseudomonas* sp. MD8 эффективно разлагают коммерческие смеси ПХБ марки Delor 103/ТХБ и Совол, что позволяет их рассматривать как потенциальные объекты для создания биопрепаратов, направленных на утилизацию коммерческих смесей ПХБ.

#### **Разложение химически-модифицированных смесей хлорбифенилов штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25**

Несмотря на физико-химическую стабильность и токсичность, ПХБ могут трансформироваться в окружающей среде до гидроксипроизводных (НО-ПХБ) и метоксипроизводных ПХБ (Ме-ПХБ) как под действием абиотических факторов, так и в результате ферментативных процессов в живых организмах (Bedard, 2003; Kasai *et al.*, 2003; Camara *et al.*, 2004; Buckman *et al.*, 2006; Rezek *et al.*, 2007; Passatore *et al.*, 2014;

Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2016, 2018; Li *et al.*, 2019). Кроме того, к изменению структуры ПХБ в результате внедрения новых заместителей может приводить химический синтез, направленный на снижение устойчивости молекулы ПХБ к внешним воздействиям. В настоящем исследовании изучены вопросы бактериальной трансформации модифицированных ПХБ.

Впервые показана возможность **бактериальной трансформации смеси, содержащей в своем составе гидроксилированные и метоксилированные производные ПХБ** (смесь GM). Эффективность деструкции смеси GM штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7 составила 73–93% при исходной концентрации 0.1–1.50 г/л (таблица 3, рисунок 15а). Классическая экспоненциальная кривая убыли субстрата выявлена только при высоких начальных концентрациях смеси (рисунок 15а) (Saavedra *et al.*, 2010). Установлено, что скорость деструкции смеси GM штаммом KT112-7 находится в прямой корреляционной зависимости от исходной концентрации смеси (коэффициент корреляции – 0.99). Методом ВЭЖХ установлено, что в процессе биоразложения смеси GM происходит образование замещенных катехолов, а также гидрокси-БК, что подтверждает разложение компонентов смеси до безопасных соединений (Егорова и др., 2013; Tehrani, Van Aken, 2014).

Таблица 3 – Разложение смесей модифицированных ПХБ штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25

Смесь модифицированных ПХБ (концентрация, г/л)	Основные группы соединений в смеси (%)*	Эффективность деструкции, % (Время деструкции, сут)		Удельная скорость деструкции, сут <sup>-1</sup>	
		KT112-7	P25	KT112-7	P25
Смеси, полученные при модификации индивидуальных конгенов					
M1 (0.1)	НО-диХБ (100)	100 (10)	100 (10)	0.461	0.328
M2 (0.1)	НО-диХБ (100)	100 (14)	100 (14)	0.462	0.327
Смесь, полученная при модификации Трихлорбифенила					
M3 (0.1)	диХБ (12.8), триХБ (7.7), НО-диХБ (48.6), НО-триХБ (30.9)	100 (14)	98 (14)	0.427	0.271
Смеси, полученные при модификации Совола					
C1 (0.3)	ПХБ (30), НО-ПХБ (28), ПХБ-ПЭГ-4 (42)	97.1 (5)	н/о**	0.235	н/о
C2 (0.6)	ПХБ (10), НО-ПХБ (16), ПХБ-ПЭГ-22 (74)	93.8 (5)	н/о	0.289	н/о
GM (0.1–1.5)	НО-ПХБ (36.4), Me-ПХБ (24.8), Me,НО-ПХБ (38.8)	73–93 (10)	н/о	0.265	н/о
GA (0.48)	ПХБ (17.9), НО-ПХБ (63), АЭ-ПХБ (15), НО,АЭ-ПХБ (4.1)	100 (14)	н/о	0.441	н/о
G1 (0.1)	ПХБ (4.2), НО-ПХБ (63.8), (НО) <sub>2</sub> -ПХБ (32)	99.8 (14)	97.4 (14)	0.329	0.229
G2 (0.1)	ПХБ (16.8), НО-ПХБ (73.8), (НО) <sub>2</sub> -ПХБ (9.4)	100 (14)	98.1 (14)	0.361	0.230
G3 (0.1)	ПХБ (12.8), НО-ПХБ (77.7), (НО) <sub>2</sub> -ПХБ (9.5)	99.8 (14)	100 (14)	0.379	0.215

\*обозначения соединений приведены в Списке сокращений, \*\* н/о – не определяли

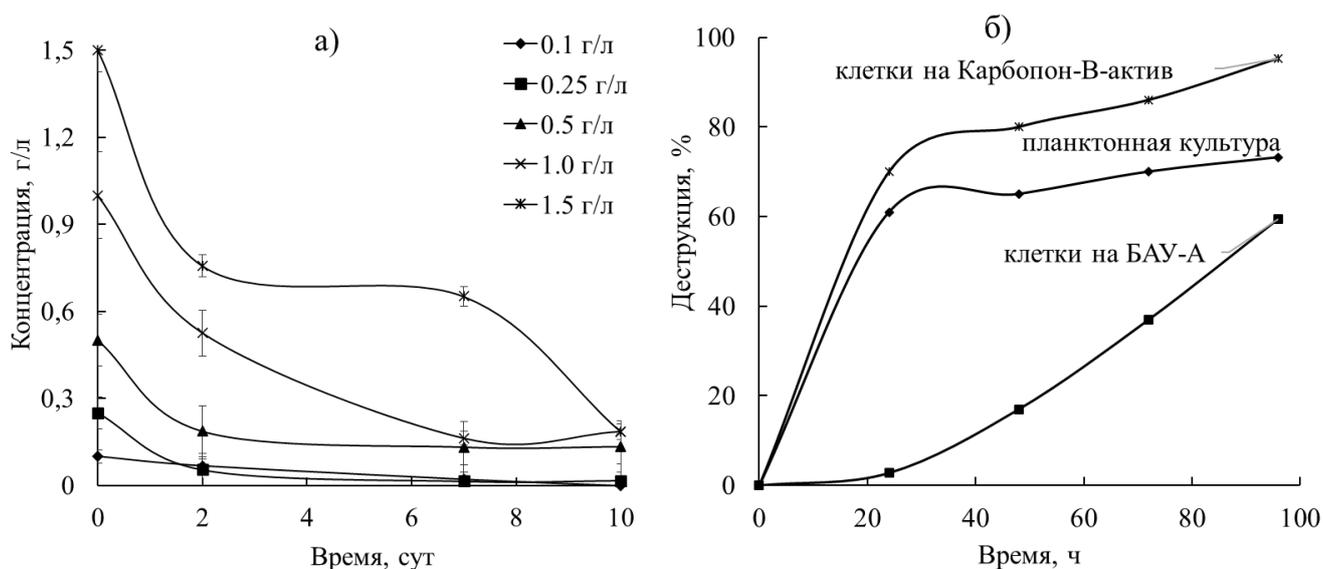


Рисунок 15 – Деструкция смеси GM штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7

Изучена способность иммобилизованных и планктонных клеток штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 разлагать смесь GM в концентрации 0.5 г/л (рисунок 15б). Установлено, что за 96 ч, эффективность деструкции смеси GM планктонной культурой составляла 73.2%, клетками, иммобилизованными на углеродном волокне Карбопон-В-актив – 95.3%, а клетками, иммобилизованными на угле марки БАУ-А – 59.5%. Известно, что внесение в среду активированного угля приводит к уменьшению уровня токсичности и биоаккумуляции ПХБ для ряда организмов (Weber, Mrozek, 1979; Wang *et al.*, 2016), что может обуславливать повышение деградативной активности штамма KT112-7. Расчеты эффективности биодеструкции смеси GM при использовании иммобилизованных на углеродном волокне Карбопон-В-Актив клеток штамма KT112-7 показали, что при кратковременном культивировании (24 ч) убыль субстрата описывается уравнением (1), а при длительном (96ч) – уравнением (2):

$$y = 0.725 * x / 43, R^2 = 1 \quad (1);$$

$$y = 0,777 * x^{0,84} / 43, R^2 = 0.998 \quad (2)$$

где,  $y$  – количество смеси модифицированных ПХБ, разложенное за единицу времени 1 г бактериальной культуры, г;  $x$  – время деструкции, ч.

Сопоставление эффективности обоих режимов культивирования в пересчете на убыль субстрата за 1 ч показывает, что первый вариант является более перспективным для уничтожения смеси GM: в первом случае за 1 ч 1 г клеток разлагает 17 мг смеси GM, во втором случае – 8 мг смеси GM. Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 эффективно разлагает смесь гидрокси- и метокси-производных ПХБ как в состоянии планктонной культуры, так и в виде иммобилизованных на инертном носителе клеток.

**Деструкция смесей С1 и С2, полученных при химической модификации коммерческой смеси ПХБ Совол полиэтиленгликолями.** Анализ методом ГХ-МС показал, что штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 эффективно разлагает смеси С1 и С2, при этом осуществляет деструкцию всех компонентов данных смесей (таблица 3). Через 24 ч инкубации отмечалась 100%-ая деструкция ПХБ-ПЭГ-4 и НО-пентаХБ, но не двух конгенов ПХБ и НО-тетраХБ. К концу пятых суток культивирования в смеси С1 НО-ПХБ не регистрировались, а деструкция конгенов ПХБ составляла 90%. По уровню деструкции 2,4,2',5'-тетраХБ и 2,5,2',5'-тетраХБ штамм *R. wratislaviensis*

KT112-7 превосходит известные штаммы-деструкторы (Seto *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1999; Bedard, 2003; Pieper, 2005). В результате анализа культуральной жидкости наличие основных метаболитов (ГОФДК и ХБК) не установлено, но отмечено накопление ионов хлора ( $0.39 \pm 0.02$  мМ на 3 сутки эксперимента,  $0.83 \pm 0.03$  мМ – на 5 сутки). Аналогичные закономерности выявлены при разложении смеси С2. В литературе нет сведений о бактериальной деструкции смесей, содержащих в своем составе ПХБ, НО-ПХБ и ПХБ-ПЭГ. Таким образом, полученные данные о высокой деградационной активности штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 к данным смесям представляют значительный интерес.

**Штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 осуществляет 100%-ную деструкцию 480 мг/л смеси ГА, полученной при взаимодействии Совола с 2-аминоэтанолом за 14 сут (таблица 3, рисунок 16).**

Методом ГХ-ПИД показано, что штамм KT112-7 в первую очередь разрушает производные с аминоэтоксигруппой, а разложение тетра-/пента-ХБ и НО-ПХБ происходит позже. Динамика убыли смеси ГА имела вид классической вогнутой кривой с величиной достоверности аппроксимации 0.99, а скорость деструкции составляла  $0.033 \text{ мг} \cdot \text{мл} \cdot \text{сут}^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2010). Методом ВЭЖХ и спектрофотометрии установлено, что в продуктах бактериальной деструкции смеси ГА присутствуют хлор- и гидроксид-БК, а также катехол, что позволяет предположить глубокую трансформацию соединений смеси ГА без накопления опасных соединений (рисунок 17). Примеры микробиологической деструкции смесей веществ, подобных смеси ГА, в литературе не найдены.

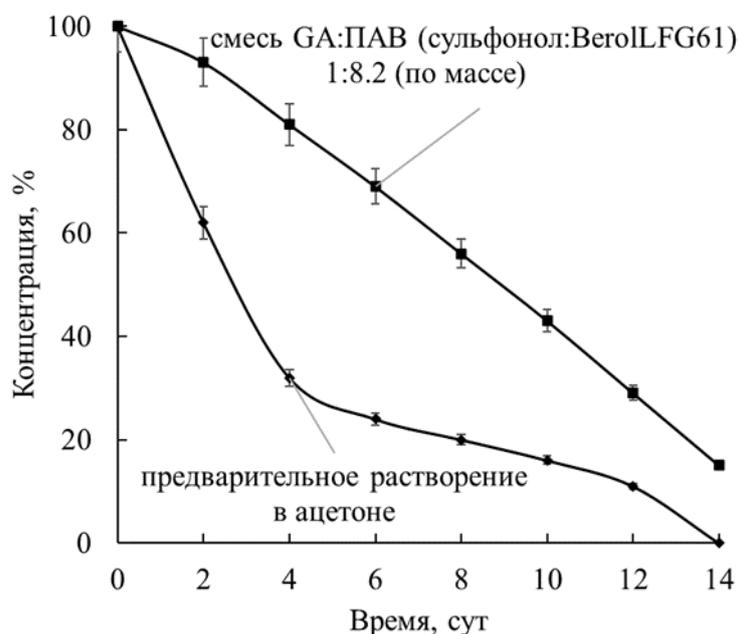


Рисунок 16 – Разложение смеси ГА штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7

Перевод смеси ГА в состояние эмульсии в результате применения коммерческих ПАВ привел к снижению эффективности деструкции до 85%, при этом динамика убыли носила вид прямой (рисунок 16). Вероятно, изменение тенденции убыли исследуемых соединений связано с появлением дополнительного источника углерода для бактериальных клеток в виде представленных в эмульсии ПАВ. При этом скорость деструкции ПАВ штаммом KT112-7 составляла  $0.09 \text{ мг} \cdot \text{мл} \cdot \text{сут}^{-1}$ , что на порядок выше скорости деструкции смеси ГА в составе эмульсии ( $0.009 \text{ мг} \cdot \text{мл} \cdot \text{сут}^{-1}$ ). Таким образом,

перевод смеси ГА в состояние эмульсии не является целесообразным для повышения эффективности ее разложения штаммом КТ112-7.

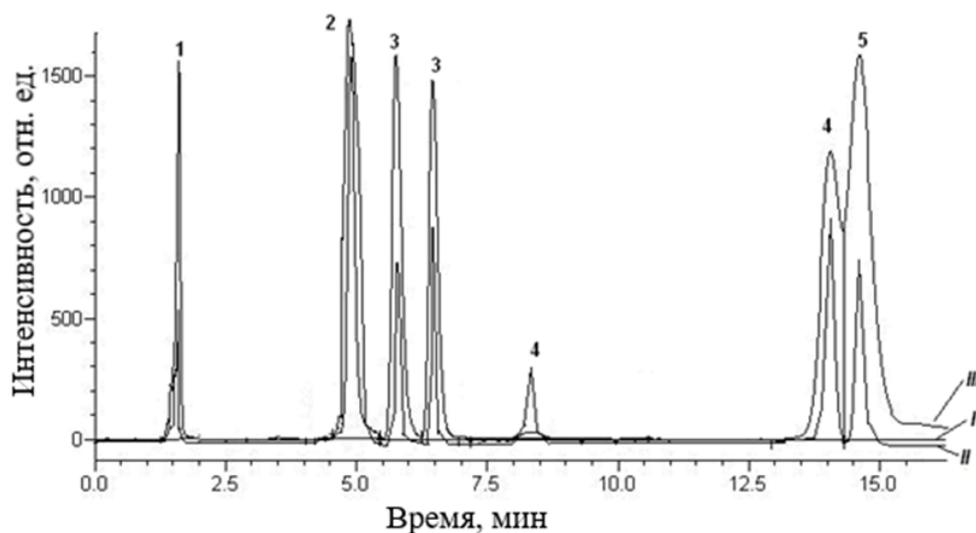


Рисунок 17 – Хроматограмма (условия ВЭЖХ) смеси промежуточных продуктов, образовавшихся в результате бактериальной деструкции смеси ГА штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления и в изотонической среде: 0 сут (I), 2 сут (II), 6 сут (III): 1 – катехол, 2 – гидроксибензойная кислота, 3 – монохлорбензойные кислоты, 4 – ди-хлорбензойные кислоты, 5 – три-хлорбензойные кислоты

Установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет трансформацию смеси ГА в присутствии в среде 60 г/л NaCl за 6 суток на 73.8%, что на 5% ниже, чем аналогичный показатель в условиях отсутствия засоления среды. При этом основные метаболиты не отличались от выявленных в изотонических условиях (рисунок 17). Рядом работ показано, что повышение уровня засоленности среды негативно сказывается на деградационной активности аэробных штаммов (Плотникова и др., 2006; Егорова и др., 2018; Margesin, 2001).

**Особенности разложения смесей гидрокси-ПХБ, полученных на основе 2,4,5-триХБ (М1) и 2,4,6-триХБ (М2).** В результате химической модификации из 2,4,5-триХБ получена смесь М1, представленная 2-гидрокси-4,5-дихлорбифенилом, 4-гидрокси-2,5-дихлорбифенилом и 3-гидрокси-4,6-дихлорбифенилом, а из 2,4,6-триХБ – смесь М2, содержащая 2-гидрокси-4,6-дихлорбифенил и 4-гидрокси-2,6-дихлорбифенил. Таким образом, у всех компонентов смесей М1 и М2 одно из ароматических колец молекулы бифенила не содержит заместители. При исследовании биодеструкции смесей М1 и М2 установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 осуществляют их 100%-ное разложение (таблица 3, рисунок 18).

Разложение компонентов смесей происходит в результате окисления по незамещенному кольцу, с дальнейшей трансформацией по «верхнему» пути деструкции ПХБ и образованием гидроксированных ХБК. Анализ динамики изменения концентрации продуктов разложения смесей М1 и М2 свидетельствует, что штаммы КТ112-7 и P25 способны осуществлять деструкцию моногидрокси-дихлорбензойных кислот, что согласуется с данными, полученными при анализе генетического и ферментного профиля данных штаммов (результаты приведены выше). Следует отметить, что эффективность деструкции смесей М1 и М2 выше, чем исходных

хлорбифенилов. Можно предположить, что замена одного атома хлора на гидроксигруппу приводит к повышению биодоступности данных соединений.

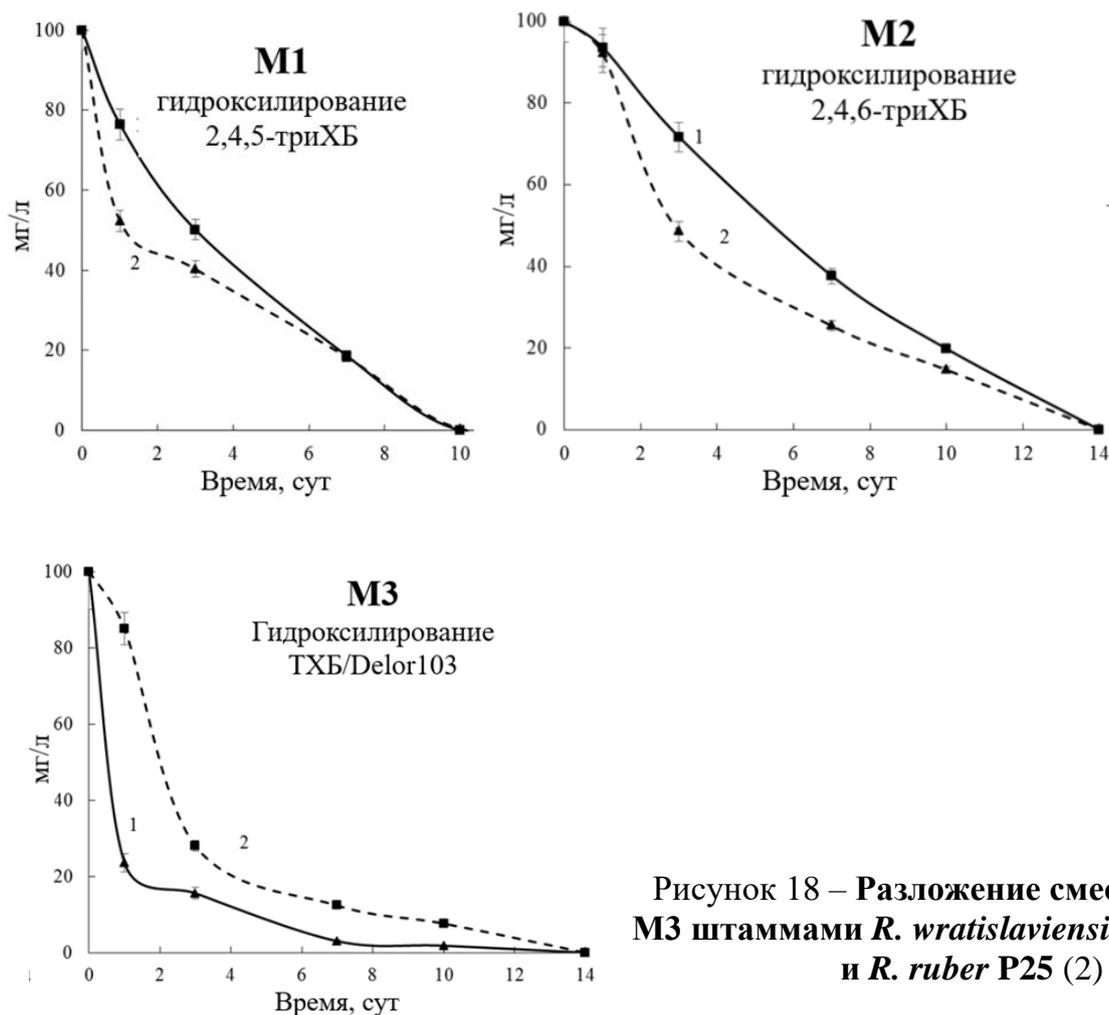


Рисунок 18 – Разложение смесей M1, M2, M3 штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 (1) и *R. ruber* P25 (2)

**Разложение смеси НО-ПХБ (M3), полученной на основе коммерческой смеси ПХБ марки Трихлорбифенил.** Штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 осуществлял 100%-ную деструкцию смеси M3 за 14 сут (таблица 3, рисунок 18). Напротив, в аналогичных условиях штамм P25 проявлял более низкий деградативный потенциал, оставляя через 14 сут 2% смеси M3. При анализе методом ВЭЖХ установлено, что основными продуктами разложения смеси M3 являлись (ди-три)хлор- и гидрокси-(ди-три)хлор-БК. При этом процесс разложения смеси M3 сопровождался выделением в среду ионов хлора: в случае штамма KT112-7 до 6.8% от максимально возможного, а в случае штамма P25 до 22.1% от максимально возможного. Следует отметить, что штаммы KT112-7 и P25 использовали смесь M3 в качестве единственного источника углерода. Учитывая полученные в ходе данного исследования результаты, а также известные ранее (Плотникова и др., 2012; Tehrani *et al.*, 2012; Mizukami-Murata *et al.*, 2016), можно сделать вывод, что штаммы KT112-7 и P25 эффективно разлагают смесь НО-ПХБ без накопления промежуточных продуктов.

**Разложение смесей НО-ПХБ (G1, G2, G3), полученных при химической модификации коммерческой смеси ПХБ марки Совол.** Установлено, что штамм KT112-7 разлагал смесь G1 на 99.8%, смесь G2 - на 100%, смесь G3 - на 99.8% (таблица 3, рисунок 19).

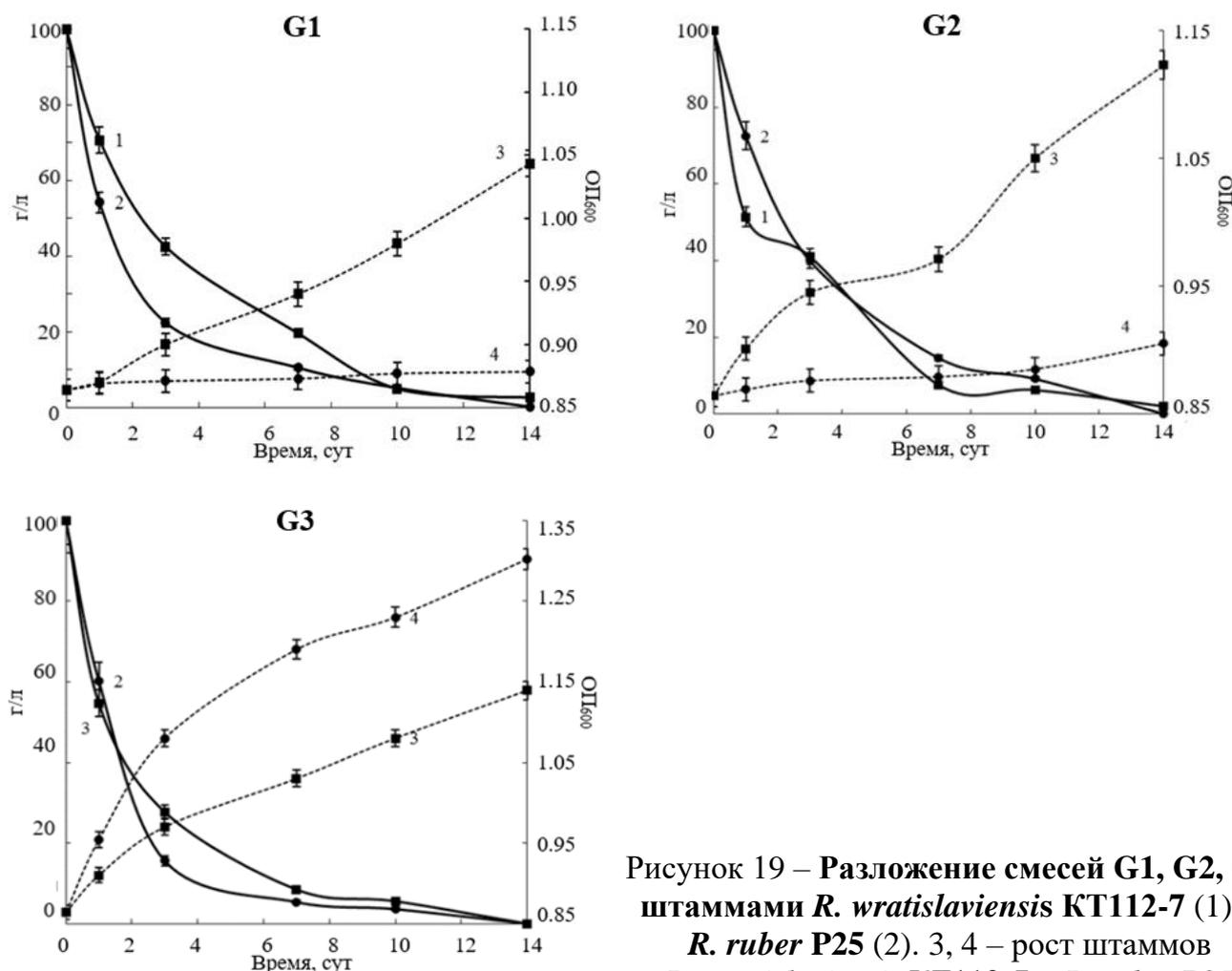


Рисунок 19 – Разложение смесей G1, G2, G3 штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 (1) и *R. ruber* P25 (2). 3, 4 – рост штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25

Штамм P25 проявлял большую активность к смеси G3, но менее активно разлагал смеси G1 и G2 (97.4% и 98.1% соответственно). Следует отметить, что для смеси G1 с максимальным содержанием НО-ПХБ за изученный отрезок времени не отмечено полное разложение данными штаммами. Коэффициент корреляции Пирсона роста бактериальной культуры и убыли концентрации смесей G1, G2 и G3 составил 0.85–0.94, что свидетельствует об использовании смесей G1-G3 в качестве источника углерода. Способность расти на смесях НО-ПХБ как единственном источнике углерода без ко-субстрата для аэробных бактериальных штаммов описана впервые. Ранее сообщалось, что штаммы способны эффективно разлагать НО-ПХБ и расти в присутствии в среде дополнительного источника углерода (Tehrani *et al.*, 2012; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). При исследовании трансформации индивидуальных НО-ПХБ установлена закономерность, что при наличии одной гидроксигруппы в молекуле ПХБ эффективность бактериальной трансформации будет зависеть от количества атомов хлора (Sondossi *et al.*, 1991; Tehrani *et al.*, 2012, 2014, Mizukami-Murata *et al.*, 2016). В смесях G1, G2 и G3 присутствуют как моно-, так и дигидрокси-хлорбифенилы, содержащие от 3 до 6 атомов хлора в молекуле. Полученные результаты позволяют предположить, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 обладают более высокой деградационной активностью по отношению к НО-ПХБ, чем описанные ранее штаммы-деструкторы.

В результате анализа культуральной среды при деструкции смесей G штаммами КТ112-7 и P25 установлено, что разложение всех компонентов смесей происходит по

«верхнему» бифенильному пути, а в среде в качестве основных метаболитов зафиксированы ГОФДК, хлор- и гидрокси-БК, (хлор)катехолы, свободные ионы хлора. Так как изменение концентрации метаболитов не коррелировало с динамикой деструкции исходных смесей, а штаммы КТ112-7 и P25 обладают деградационным потенциалом к выявленным в качестве метаболитов соединениям, можно предположить, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 осуществляют разложение смесей гидрокси-ПХБ без накопления соединений, опасных для окружающей среды.

Таким образом, на основании данных, полученных при проведении исследований по разложению химически модифицированных ПХБ аэробными бактериальными штаммами, установлено, что химическая модификация может быть использована как первая стадия для подготовки ПХБ к эффективной бактериальной трансформации. Введение в молекулу ПХБ дополнительных групп в качестве заместителей приводило к повышению удельной скорости деструкции смесей модифицированных ПХБ, по сравнению с данным показателем для коммерческих смесей ПХБ (таблица 3).

Полученные результаты позволяют предложить комплексный междисциплинарный (химико-биологический) метод, направленный на уничтожение запасов ПХБ, находящихся в местах складирования. Данный метод предполагает две стадии: на первой стадии в молекулы ПХБ вводятся дополнительные группы (гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси-, аминоэтокси-), что приводит к уменьшению степени хлорирования и повышению гидрофильности ПХБ; на второй стадии активные бактериальные штаммы, в частности *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25, осуществляют разложение модифицированных ПХБ до соединений основного обмена клетки. Предложенный метод позволяет осуществить полную деструкцию ПХБ, без выделения в среду токсичных веществ.

### **Бактерии-деструкторы ПХБ как основные агенты восстановления загрязненных почв**

**Очистка искусственно загрязненных почв в модельных системах.** Установлено, что штаммы *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 активно разлагали монохлорированные бифенилы в модельных почвенных системах (таблица 4).

Утилизация хлорбифенилов сопровождалась ростом штаммов (коэффициент корреляции 0.94 – 0.98). Следует отметить, что в литературе описано несколько штаммов-деструкторов, осуществляющих разложение 2-хлор- и 4-хлорбифенилов при культивировании в минеральной среде (Arensdorf *et al.*, 1994; Fava *et al.*, 1994; Arensdorf, Focht, 1995; Hrywna *et al.*, 1999; Kim, Picardal, 2000; Rodrigues *et al.*, 2006). Однако в условиях модельной почвенной системы существуют дополнительные источники углерода, которые могут снижать деградационную активность штаммов (Васильева, Стрижакова, 2007, Barriault, Sylvestre, 1993). Анализ полученных результатов и литературных данных показал, что штаммы *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25, даже в присутствии неконтролируемых ростовых субстратов, содержащихся в почве, разлагали 2-хлор- и 4-хлорбифенилы активнее, чем известные штаммы-деструкторы.

Установлено, что штамм *R. ruber* P25 эффективно разлагает высокие концентрации смеси ВР, при этом процесс деструкции носил линейный характер и сопровождался ростом бактериальной культуры (таблица 4). Анализ изменения концентрации каждого конгенера в смеси показал, что хлорированные производные бифенила разлагались штаммом в 1.8 раза медленнее, чем не замещенный бифенил.

Установлено, что внесение бактериального консорциума штаммов *Rhodococcus* sp. B7a и *R. erythropolis* G12a (начальная концентрация клеток  $1 \times 10^6$  КОЕ/г сух. почвы) приводит к значительному, статистически достоверному по отношению к контролю,

снижению уровня загрязненности почвы ПХБ, входящими в смесь А (таблица 4), как в случае стерильной почвы, так и в случае почвы с аборигенной микрофлорой. К концу второго месяца инкубирования в почве обнаруживалось около 1.0% смеси А от начальной концентрации. В модельных системах, не аугментированных штаммами В7а и G12а, концентрация ПХБ составляла 99.5% от внесенной.

Таблица 4 – Деструкция ПХБ в модельных системах с искусственно загрязненной почвой

ПХБ	Начальная концентрация, мг/кг (количество ПДК)	Штаммы, внесенные в почву	Время ремедиации, сут	Эффективность деструкции ПХБ, % (остаточное количество в ПДК)
2-хлорбифенил	100 (1667)	<i>M. oxydans</i> В51	2	100 (0)
4-хлорбифенил	100 (1667)	<i>R. ruber</i> P25	2	100 (0)
Смесь ВР (бифенил+6 конгенов ПХБ)	1000 (16667)	<i>R. ruber</i> P25	110	100 (0)
Смесь А (20 конгенов ПХБ)	280 (4667)	<i>Rhodococcus</i> sp. В7а <i>R. erythropolis</i> G12а	60	99 (46)
Совол (лесная почва)	100 (1667)	<i>M. oxydans</i> В51 <i>R. ruber</i> P25	90	72.2 (463)
Совол (техногенно измененная почва)	100 (1667)	<i>M. oxydans</i> В51 <i>R. ruber</i> P25	90	96.4 (60)

Исследована способность штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* В51 осуществлять восстановление лесных и техногенно измененных почв, искусственно загрязненных смесью ПХБ торговой марки Совол (таблица 4, рисунок 20).

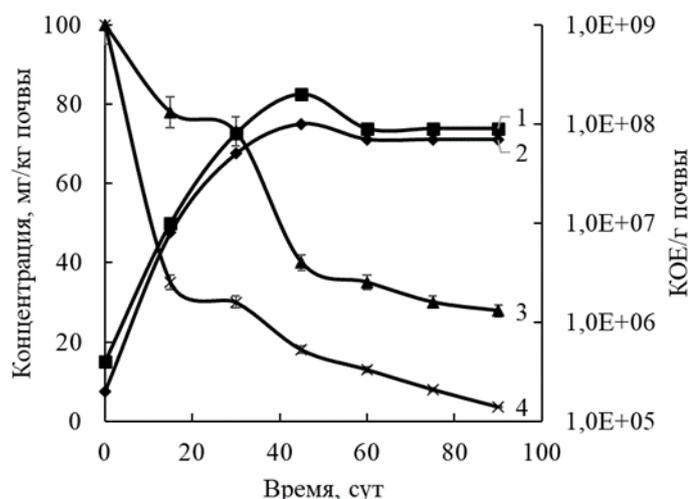


Рисунок 20 – Разложение Совола в лесной (3) и техногенно измененной почве (4) штаммами *R. ruber* P25 (1) и *M. oxydans* В51 (2)

Внесение штаммов привело к снижению уровня загрязненности лесной почвы в 3.6 раза, а техногенно измененной почвы – в 27.8 раза (в пересчете на ПДК). Известно, что чем выше концентрация хлора в смеси ПХБ, тем ниже уровень биодоступности

таких смесей. Степень удаления Совола (52.1% Cl<sup>-</sup>) в модельных почвенных системах, содержащих штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51, выше, чем соответствующий показатель для Aroclor 1248 (48% Cl<sup>-</sup>), и сопоставима с уровнем деструкции Aroclor 1242 (40–42% Cl<sup>-</sup>) (Bedard *et al.*, 1987; Quensen *et al.*, 1990; Hernandez *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2002; Pieper, 2005; Borjia *et al.*, 2005; Patureau, Trably, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2007; Adebuseye *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2010; Tartakovsky *et al.*, 2010). Для ремедиации ПХБ-загрязненных участков важно использовать штаммы, способные выживать в различных почвах и в присутствии аборигенной микрофлоры. Количество жизнеспособных клеток штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 не уменьшалось в присутствии аборигенной микрофлоры и в отсутствии такого селективного фактора как Совол. Внесение Совола обеспечивало рост бактериальных штаммов-деструкторов (рисунок 20). Аналогичное изменение количества бактерий-деструкторов бифенила отмечено Di Togo с коллегами (2006) при разложении ПХБ в S3 биореакторе. Стоит отметить, что выявленная линейная отрицательная корреляция между показателями роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 в биоаугментированных системах и изменением концентрации Совола в процессе биоремедиации (коэффициент корреляции 0.87–0.96) свидетельствует об эффективном использовании Совола штаммами-деструкторами в качестве источника углерода и энергии.

Таким образом, бактериальные штаммы рода *Rhodococcus* эффективно разлагают смеси хлорбифенилов в условиях модельного почвенного эксперимента и могут служить основой для разработки биопрепаратов, направленных на ремедиацию ПХБ-загрязненных почв.

**Биоремедиация почв, длительно загрязненных промышленными смесями полихлорбифенилов.** Почвы, отобранные на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск длительное время были подвержены загрязнению рядом хлорорганических соединений, в том числе ПХБ. Установлено, что через 3 месяца после внесения штаммов *R. wratislaviensis* Ch625 (=ВКМ Ас 2631D) и *R. wratislaviensis* Ch628, выделенных ранее из данных почв, и бактериальной ассоциации Ch6 приводило к снижению концентрации ПХБ в почве с 0.85 мг/кг (14 ПДК) до 0.09 мг/кг (1.5 ПДК), 0.0048 мг/кг (0.8 ПДК) и 0.16 мг/кг (2.7 ПДК), соответственно (рисунок 21а). Снижение концентрации ПХБ в почве сопровождалось снижением уровня фитотоксичности почвы. Так, через три месяца биоремедиации индекс фитотоксичности снизился до 3–18%, что делает возможным рост растений на данной почве. Отмечена прямая корреляционная зависимость между снижением концентрации ПХБ в почве и увеличением численности внесенных штаммов и аборигенной бактериальной флоры (коэффициент корреляции составил 0.98 и 0.98 соответственно). Таким образом, в результате внесения штамма *R. wratislaviensis* Ch628 достигнуто снижение уровня загрязнения почвы до предельно допустимых значений (ПДК = 0.06 мг/кг почвы), что позволяет рассматривать данный штамм как перспективный для технологий очистки ПХБ-загрязненных почв.

Изучена возможность биоремедиации почвы, отобранной на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск, в результате биоаугментации штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, а также исследована эффективность сочетания методов биоаугментации (штамм КТ112-7) и биостимуляции (препарат «Гумиком») (рисунок 21б). Показано, что внесение культуры штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в концентрации 10<sup>6</sup> и 10<sup>7</sup> КОЕ/г почвы приводит к снижению концентрации ПХБ в почве в 1.4 и 1.2 раза, соответственно, за 14 сут (начальная концентрация 0.941–1.333 мг ПХБ/кг почвы). В качестве биостимулятора был использован препарат «Гумиком», представляющий собой гумино-

минеральный комплекс (ТУ 2186-002-13787869-2009, ТР 013-13787869-2009). Внесение препарата «Гумиком» в концентрации 0.01–1% от массы почвы приводило к снижению концентрации ПХБ 1.2–1.4 раза через 3 месяца после биостимуляции. Совместное внесение бактериальной культуры штамма КТ112-7 и препарата «Гумиком» позволило достичь снижения концентрации ПХБ в почве в 1.3–1.6 раза за 14 сут. Наилучший результат получен при внесении в почву бактериальной культурой в концентрации  $10^6$  КОЕ/г почвы и 1% «Гумиком» – концентрация ПХБ снизилась с 22.2 ПДК до 8.2 ПДК. Таким образом, сочетание внесения активного штамма-деструктора с биостимуляцией аборигенной микрофлоры препаратом «Гумиком», позволило добиться существенного снижения загрязнителя в почве за период (14 сут), позволяющий проводить подобную обработку почвы несколько раз в теплый период года.

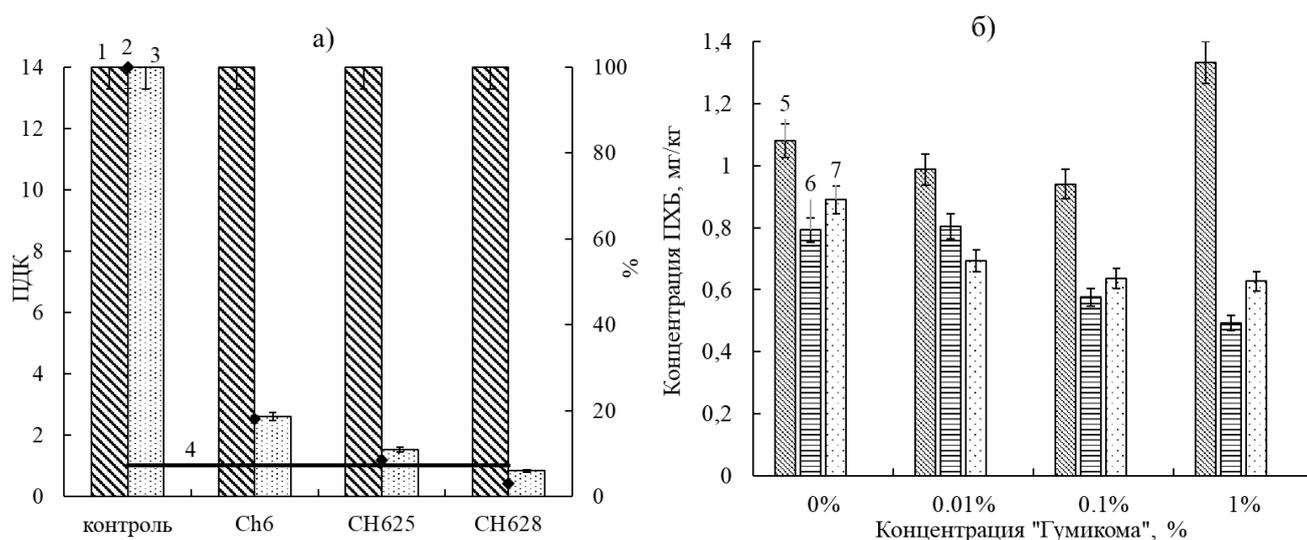


Рисунок 21 – Изменение концентрации ПХБ в почве в результате внесения штаммов (а) и сочетанного использования штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 и препарата «Гумиком» (б): 1 – концентрация ПХБ в начале эксперимента, 2 – индекс фитотоксичности почвы через 90 сут, 3 – концентрация ПХБ в почве через 90 сут, 4 – ПДК для ПХБ в почве, 5 – без внесения КТ112-7, 6 – внесено  $10^6$  КОЕ КТ112-7 /г почвы, 7 – внесено  $10^7$  КОЕ КТ112-7 /г почвы

На основе штаммов *R. wratislaviensis* Ch625 и *R. wratislaviensis* КТ112-7 разработан препарат «Полихлорокс», который может быть использован для очистки почв, загрязненных ПХБ (<http://eco-emt.ru>).

Штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 использован в качестве бактериального агента в модельных экспериментах по восстановлению почвы, отобранной на территории хвостохранилища г. Калуш (Украина) (концентрация ПХБ 485 мг/кг = 8083 ПДК). Внесение штамма КТ112-7 привело к снижению уровня загрязнения почвы в 30 раз, конечная концентрация ПХБ составила 25 ПДК (рисунок 22). Анализ конгенерного состава ПХБ в почве показал, что происходит снижение всех, в том числе высокохлорированных, ПХБ. В результате снижения концентрации ПХБ к концу первого месяца ремедиации до 6% от начальной, в течение второго месяца эксперимента отмечается восстановление численности внесенных, и увеличение численности автохтонных бактерий. Одним из направлений ремедиации ПХБ-загрязненных почв является фиторемедиация. Однако, в случае высокой концентрации ПХБ в почве, применение растений становится невозможным из-за токсичности поллютанта (Štrédlová,

Cajthaml, 2022). В результате контактного фитотестирования с использованием *Raphanus sativus* L. (редиса) установлено, что почва до начала эксперимента по биоремедиации являлась супертоксичной ( $I = 100\%$ ). В результате проведенного эксперимента индекс ингибирования понизился до 14% (рисунок 22).

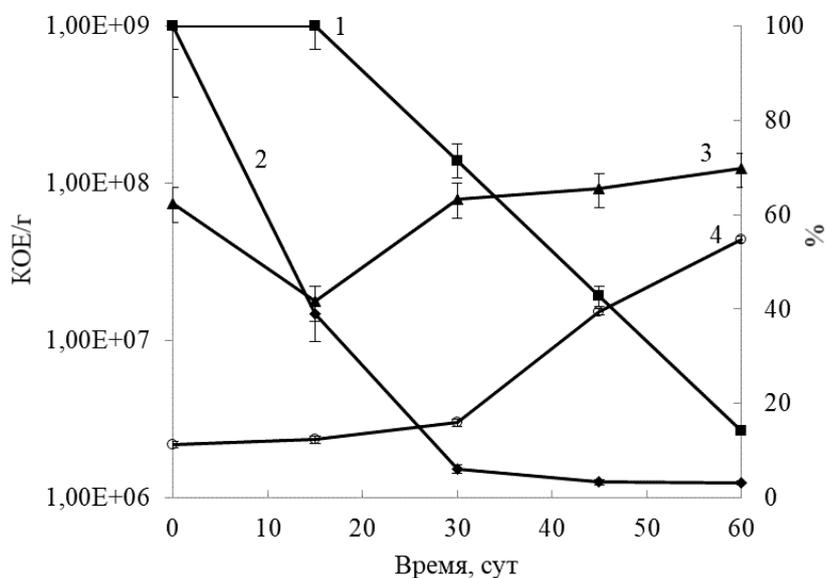


Рисунок 22 – Изменение концентрации ПХБ (%) (2), фитотоксичности почвы (%) (1) и количества внесенных (3) и автохтонных (4) бактерий (КОЕ/г почвы)

Полученные данные позволяют предположить, что в результате биоремедиации, обусловленной внесением штамма *R. wratislaviensis* KT112-7, почва была очищена до слаботоксичной, что делает возможным дальнейшее применение растений для ускорения процесса восстановления загрязненной территории.

Таким образом, штаммы рода *Rhodococcus*, исследованные в настоящей работе, являются перспективным для применения в биоремедиационных технологиях по очистке территорий, длительное время загрязненных ПХБ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из острых проблем современного общества является сохранение благоприятной для жизни окружающей среды. С этим неразрывно связана проблема восстановления и очистки территорий, загрязненных особо опасными веществами антропогенного происхождения, а именно – полихлорированными бифенилами (ПХБ) (Final act..., 2001; Negreet-Bolagay *et al.*, 2021). Анализ мирового опыта показал, что наиболее перспективным направлением в решении данной проблемы является разработка природоподобных технологий на основе аэробных бактерий, изолированных из естественных и техногеннозагрязненных экотопов (Горбунова и др., 2011; Elangovan *et al.*, 2019; Negreet-Bolagay *et al.*, 2021).

Исследования, направленные на изучение филогенетического и функционального разнообразия бактерий-деструкторов ПХБ, ведутся на протяжении нескольких десятилетий и охватывают все ведущие страны мира. Однако, на территории Российской Федерации работы, посвященные комплексному изучению штаммов аэробных бактерий, обладающих деградативным потенциалом в отношении ПХБ, до настоящего исследования не проводились. Проблема очистки ПХБ-загрязненных территорий, а также утилизации невостребованных ПХБ, для РФ актуальна, так как

данные соединения производились и использовались в промышленных масштабах более 60 лет, что привело к их накоплению как в местах складирования, так и в окружающей среде (Трегер, 2013; Горбунова и др., 2018).

В качестве объектов исследования на таксономическом, молекулярно-генетическом и функциональном уровнях нами были выбраны штаммы аэробных бактерий, выделенные из почв девяти географически удаленных друг от друга территорий, характеризующихся существенными различиями в спектре и концентрации химических загрязнителей. Проведенные исследования позволили выделить бактериальные ассоциации, а также более 300 штаммов аэробных бактерий, осуществляющих разложение бифенила/ПХБ и (хлор)бензойных кислот до соединений основного обмена клетки, доминирующую позицию среди которых занимают представители филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Полученные нами результаты об основных таксономических группах штаммов-деструкторов ПХБ, являющихся представителями микробиоценозов на территории РФ, совпадают с общемировыми наблюдениями об основных бактериальных таксонах, представители которых обладают ПХБ-деградативной активностью.

Оценивая накопленные в литературе данные о функциональном разнообразии аэробных штаммов-деструкторов ПХБ, можно говорить об общей закономерности: наиболее доступными для бактериальной трансформации являются конгенеры ПХБ, содержащие 1-4 заместителя в молекуле в *орто*- или *мета*-положении, а конечными интермедиатами являются хлорбензойные кислоты (ХБК) (Hou, Dutta, 2000; Pieper, Seeger, 2008; Ponce *et al.*, 2011; Somaraja *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2014; Iori *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Atago *et al.*, 2016; Shuai *et al.*, 2016; Kour *et al.*, 2019). Проведенные нами исследования позволили выявить штаммы *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ac-2623D), *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ac-2631D), *R. wratislaviensis* CH628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. В7а, *R. erythropolis* G12а, *Microbacterium oxydans* В51, обладающие уникальными путями разложения хлорбифенилов. Установлено, что данные штаммы окисляют как *орто*-, так и *пара*-замещенные кольца в молекулах ди- и трихлорированных бифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1}, а также осуществляют разложение образующихся ХБК до соединений основного обмена клетки как в результате атаки бензоат 1,2-диоксигеназы с образованием катехола/хлоркатехолов, так и в результате действия комплекса ферментов, приводящих к образованию *пара*-гидроксibenзойной и протокатеховой кислот. Представленные данные об особенностях разложения ХБК штаммами-деструкторами ПХБ являются новыми и вносят существенный вклад в понимание механизмов бактериальной трансформации хлорароматических поллютантов.

Современные исследования направлены на изучение процессов бактериального окисления ПХБ на молекулярно-генетическом уровне. Ключевым ферментом деструкции ПХБ является бифенил 2,3-диоксигеназа (ДО) (Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). Известно, что спектр разлагаемых конгенов ПХБ зависит от особенностей строения  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-ДО, кодируемой геном *bphA1*, на которой располагается каталитический центр фермента (Wang *et al.*, 2021). Применение в настоящем исследовании современной методологической базы позволило выявить особенности строения  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-ДО (*bphA1*-гена) у штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Установлено, что *bphA1*-гены штаммов рода *Rhodococcus* отличающихся метаболическим профилем при разложении ПХБ, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства

с генами фенилпропионат ДО (97.7–100%, 2 штамма), бифенил ДО (99.5–100%, 4 штамма), бифенил/толуол ДО грамположительных бактерий (87.1–99.6%, 14 штаммов). Вместе с тем, *bphA1*-гены штаммов рода *Pseudomonas* демонстрируют наибольший уровень сходства с генами бифенил/толуол ДО грамотрицательных бактерий (93.0–100%, 7 штаммов). Интересно отметить, что в геноме 5 штаммов рода *Pseudomonas* и 11 штаммов рода *Rhodococcus*, у которых изучен ген *bphA1*, выявлены плазмиды большой молекулярной массы, что может обуславливать горизонтальный перенос генов деструкции ПХБ. После проведенного анализа *bphA1*-генов для дальнейшего исследования структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-ДО были отобраны два штамма: *R. wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D) и *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896). Применение методов моделирования и биоинформатики позволило получить уникальные данные о вторичной и третичной структуре VphA1<sub>KT112-7</sub> (плазмидная локализация гена) и VphA1<sub>P25</sub>. Установлено, что третичная структура VphA1<sub>KT112-7</sub> имеет наибольший уровень сходства с VphA1 штамма *R. jostii* RHA1 (гены *bphA1* у обоих штаммов локализованы на плаزمидах), тогда как третичная структура VphA1<sub>P25</sub> является уникальной: не выявлено достоверного сходства с какой-либо  $\alpha$ -субъединицей бифенил/ толуол/ бензол/фенилпропионат 2,3-диоксигеназ.

Впервые задокументирована и размещена в международной базе данных GenBank полногеномная нуклеотидная последовательность штамма *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что геном представлен хромосомой (CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (CP072194.1) и pRHWK2 (CP072195.1). Биоинформатический анализ генома штамма KT112-7 подтвердил полученные экспериментальные данные о способности штамма утилизировать ПХБ до соединений основного обмена клетки. Установлено уникальное расположение *bph*-генов: плаزمида pRHWK1 несет *bph*-гены (*bphA1A2A3A4CB*), кодирующие ферменты классического «верхнего» пути разложения бифенила/ПХБ (99–100% сходства с *bph*-генами штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (GenBank ABG99107.1)); на хромосоме находятся гены «*bphA1A2B*», филогенетически близкие генам, кодирующим ферменты деструкции нафталина у актинобактерий (наибольший уровень сходства с генами нафталин 2,3-ДО штамма *R. opacus* TKN14 (GenBank BAE53376.1) – 98%). Известно, что нафталин 2,3-ДО (КФ 1.14.12.12) родококков способна осуществлять гидролитическое окисление (поли)ароматических соединений, в том числе бифенила/ПХБ (Barriault, Sylvestre, 1999; Gibson, Parales, 2000; Mukerjee-Dhar *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Впервые в одном геноме описана плазмидная (pRHWK1, участок ДНК 132078–133338 нуклеотид) и хромосомная (участок ДНК 4804486–4805746 нуклеотид) локализация генов *ohbAB*, обуславливающих разложение 2-ХБК. Также в геноме штамма KT112-7 выявлены гены, кодирующие ферменты деструкции гидрокси-бензойных кислот и катехола/хлоркатехолов. Сравнительный анализ генома штамма KT112-7 с геномами штаммов-деструкторов ПХБ, размещенными в международной базе данных NCBI, подтвердил уникальность штамма *R. wratislaviensis* KT112-7.

Известно, что группа ПХБ состоит из 209 соединений (конгенеров). В промышленности ПХБ применялись в виде коммерческих смесей, содержащих от 40 до 70 конгенеров (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erickson, Kaley, 2011). Химический анализ смесей ПХБ торговых марок Трихлорбифенил (ТХБ) и Совол, производившихся на предприятиях РФ, показал, что основную долю в них составляют (три-гекса)-хлорированные конгенеры, а в состав входят 40–50 ПХБ (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015). Учитывая тот факт, что большинство известных штаммов-деструкторов ПХБ эффективно разлагают низкохлорированные бифенилы, в настоящее

время существует необходимость поиска и изучения штаммов аэробных бактерий, не только осуществляющих деструкцию ПХБ без накопления токсичных метаболитов, но и способных разлагать многокомпонентные коммерческие смеси ПХБ. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Pseudomonas* sp. MD8, *M. oxydans* B51 разлагали экспериментальную (20 конгенов, основная доля - тетрахлорированные) и коммерческие смеси ПХБ (ТХБ/Delor 103, Совол): уровень деструкции смесей ПХБ достигал 95–100% за 3–14 суток при начальной концентрации 32–600 мг/л. Полученные результаты по разложению смесей сопоставимы с данными по разложению отдельных конгенов ПХБ, в то время как для ряда бактерий описана более низкая эффективность разложения смесей ПХБ, чем индивидуальных конгенов (Masai *et al.*, 1995; Furukawa, 2000; Sondossi *et al.*, 2004; Lambo, Patel, 2006; Iori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009). Следует отметить, что по эффективности деструкции коммерческих смесей ПХБ штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Pseudomonas* sp. MD8, *M. oxydans* B51 превосходят известные ранее (Bedard *et al.*, 1987; Kolar *et al.*, 2007; Petrić *et al.*, 2007; Adebusoeye *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Одним из лимитирующих факторов биодоступности ПХБ для бактерий является их низкая растворимость в воде (Горбунова и др., 2018). Решение данной проблемы возможно путем введения в молекулу ПХБ дополнительных заместителей: гидрокси-, аминоэтокси-, полиэтиленгликолокси- и некоторые другие группы (Горбунова и др., 2018). Основываясь на данных по химической функционализации ПХБ, нами была выдвинута гипотеза, что модифицированные в результате химической предобработки ПХБ будут более доступны для аэробной бактериальной деструкции. Кроме того, в настоящее время остро стоит вопрос формирования вторичных поллютантов – гидрокси- и метокси-ПХБ, образующихся в результате трансформации ПХБ в окружающей среде под действием абиотических и биотических факторов (Camara *et al.*, 2004; Passatore *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2016, 2018; Li *et al.*, 2019). В литературе присутствуют единичные сообщения о способности штаммов аэробных бактерий осуществлять разложение отдельных конгенов гидрокси-хлорбифенилов (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Заслуживает внимания тот факт, что гидрокси- и метокси-ПХБ присутствуют в природных средах в виде смесей, однако, до настоящего исследования изучение бактериальной деструкции данных смесей не проводилось. Применение междисциплинарного подхода, а именно, химических методов синтеза и анализа в комплексе с современными микробиологическими методами, позволило получить принципиально новые научные и практические данные о способности аэробных бактерий разлагать гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси и аминоэтокси-ПХБ. Установлено, что введение новых функциональных групп в молекулу ПХБ приводит к повышению удельной скорости деструкции в 1.05–2.26 раза штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25. Период разложения смесей, содержащих гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси- и аминоэтокси-ПХБ, на 73–100% при исходной концентрации 100–1500 мг/л составил 4–14 сут. Происходит разложение всех компонентов смесей и отсутствует накопление опасных интермедиатов, что подтверждается данными аналитических исследований. Полученные сведения позволили предложить новый междисциплинарный подход к уничтожению ПХБ, основанный на сочетанном использовании химических и биологических процессов, включающий в себя этап

химической функционализации ПХБ и последующий этап бактериальной деструкции полученных соединений.

В последнее время широко обсуждается вопрос разработки природоподобных технологий с использованием биодеградативного потенциала биологических объектов, и, в частности, аэробных бактерий (Šrédlová, Cajthaml, 2022). Отдельный этап работы был посвящен изучению возможности использования штаммов, выделенных в ходе настоящего исследования, в качестве основы биоремедиационных препаратов, применяемых в экобиотехнологиях, направленных на очистку ПХБ-загрязненных территорий. Установлено, что штаммы *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH625, *R. wratislaviensis* CH628, *Rhodococcus* sp. B7a в условиях модельных почвенных систем, содержащих от 14 до 16667 ПДК ПХБ (0.84–1000 мг ПХБ/кг почвы) разлагали загрязнитель на 72–100% за 14–90 сут. Проведение исследований как на искусственно загрязненных почвах, так и на почвах с многолетним загрязнением, показало, что внесение штаммов-деструкторов не приводило к угнетению аборигенной микрофлоры и накоплению токсичных метаболитов, а также способствовало снижению уровня фитотоксичности почвы. Учитывая полученные результаты, запатентованы активные штаммы-деструкторы ПХБ, а также способ очистки ПХБ-загрязненных почв, основанный на сочетанном использовании штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 и гуминно-минерального препарата «Гумиком» (патенты РФ №2262531, №2548804, №2585537, №2562156, №2563660).

Таким образом, в ходе проведенных исследований получены новые уникальные данные, расширяющие научные представления о потенциале аэробных бактерий, направленных на решения актуальных вопросов очистки окружающей среды от стойких органических загрязнителей – полихлорированных бифенилов, а также заложены основы их практической реализации.

## ВЫВОДЫ

1. Из техногеннозагрязненных почв девяти географически удаленных друг от друга территорий (Российская Федерация, Украина) выделены бактериальные ассоциации и индивидуальные аэробные бактерии (313 штаммов), способные разлагать бифенил/ПХБ, бензойную/хлорбензойные кислоты до соединений основного обмена клетки. Представители филумов *Actinobacteria* (роды *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*), *Proteobacteria* (роды *Achromobacter*, *Ohrobactrum*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*) и *Firmicutes* (род *Bacillus*) доминировали среди культивируемых бактерий в сообществах деструкторов бифенила/ПХБ исследуемых экотопов.

2. Выявлены активные штаммы-деструкторы *R. wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* CH628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *M. oxydans* B51, демонстрирующие уникальные пути разложения хлорбифенилов. Исследуемые бактерии осуществляют окисление как *ortho*-, так и *para*-замещенного кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1}, последующая деструкция образовавшихся хлорбензойных кислот происходит как в результате диоксигенирования, так и гидроксигенирования с образованием (хлор)катехолов/протокатеховой кислоты, разлагаемых далее до соединений основного обмена клетки.

3. Установлено, что *bphA1*-гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (ключевой фермент деструкции ПХБ) штаммов рода *Rhodococcus*,

отличающихся метаболическим профилем при разложении ПХБ, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами диоксигеназ (ДО), гидроксилирующих ароматическое кольцо: фенилпропионат ДО (97.7–100%) – 2 штамма, бифенил ДО (99.5–100%) – 4 штамма, бифенил/толуол ДО (87.1–99.6%) – 14 штаммов. На основании транслированных аминокислотных последовательностей получены модели вторичной и третичной структур  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-ДО (VphA1) штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25. Показано, что  $\alpha$ -субъединица бифенил 2,3-ДО штамма KT112-7 (VphA1<sub>pRHWK1</sub>) на 98.65% сходна с VphA1 активного деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1, в тоже время, третичная структура VphA1<sub>P25</sub> является уникальной: не выявлено достоверного сходства с какой-либо  $\alpha$ -субъединицей бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-диоксигеназ.

4. Показано, что геном активного деструктора ПХБ *R. wratislaviensis* KT112-7 содержит хромосому (7.5 М п.н.) и две плазмиды pRHWK1 и pRHWK2 (281.9 т.п.н. и 130.9 т.п.н., соответственно), на которых присутствуют гены, контролирующие разложение бифенила/ПХБ и (хлор/гидрокси)-бензойных кислот. Установлено уникальное расположение *bph*-генов: плазида pRHWK1 несет *bph*-гены (*bphA1A2A3A4CB*), кодирующие ферменты классического «верхнего» пути разложения бифенила/ПХБ; на хромосоме находятся гены «*bphA1A2B*», филогенетически близкие генам (97–100% сходства), кодирующим ферменты деструкции нафталина у актинобактерий. Впервые в одном геноме описана плазмидная и хромосомная локализация генов *ohbAB*, обуславливающих разложение 2-хлорбензойной кислоты.

5. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Pseudomonas* sp. MD8, *M. oxydans* B51 эффективно разлагали экспериментальную (32 мг/л) и коммерческие смеси ПХБ Совол, Трихлорбифенил/Delor 103 (100–600 мг/л), содержащие от 20 до 50 конгенов. Уровень деструкции ПХБ достигал 95–100% за 3–14 суток.

6. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации химически модифицированных смесей ПХБ, в качестве заместителей в молекулах которых присутствуют гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтоксигруппы, без накопления опасных для окружающей среды соединений. Показано, что штаммы *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7 осуществляют деструкцию смесей (концентрация 100–1500 мг/л) на 73–100% за 4–14 суток. Установлено, что удельная скорость деструкции смесей модифицированных ПХБ, полученных на основе коммерческих смесей Трихлорбифенил/Delor 103 и Совол, была выше аналогичного показателя при разложении исходных смесей (Трихлорбифенил/Delor 103 и Совол) в 1.05–1.45 и 1.21–2.26 раза, соответственно. Предложен междисциплинарный (химико-биологический) подход для разработки новых технологий, направленных на уничтожение невостребованных смесей ПХБ.

7. Установлено, что активные деструкторы ПХБ *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, *R. wratislaviensis* CH628 и *Rhodococcus* sp. B7a могут быть использованы в качестве биологических агентов при создании биоремедиационных препаратов. Эффективность деструкции ПХБ вышеперечисленными штаммами в условиях модельной почвенной системы составила 72–100% (при исходном уровне загрязнения ПХБ от 14 до 16667 ПДК) за 14–90 суток.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*В изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ*

### *Обзорная статья*

1. Solyanikova I.P., Travkin V.M., Rybkina (Egorova) D.O., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. Varyability of enzyme system of *Nocardioform* bacteria as a basis of their metabolic activity // J. Environmental Science and Health. Part B. – 2008. – V.43. – P. 241–252. SCOPUS, WoS, Q2

### *Экспериментальные статьи*

2. Рыбкина (Егорова) Д. О., Плотникова Е. Г., Дорофеева Л. В., Мироненко Ю. Л., Демаков В. А. Новый аэробный грамположительный микроорганизм с уникальными свойствами деструкции *орто*- и *пара*-хлорированных бифенилов // Микробиология. – 2003. – вып.72, №6. – С. 759–765. SCOPUS, WoS, Q3

3. Рыбкин А.В., Рыбкина (Егорова) Д.О. Оценка уровня загрязненности хлорорганическими соединениями крови мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) на территории крупного промышленного центра // Поволжский экологический журнал. –2006. – №1. – С. 51–60. ВАК, РИНЦ

4. Плотникова Е.Г., Рыбкина (Егорова) Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. Характеристика микроорганизмов, выделенных из техногенных почв Прикамья // Экология. – 2006. – №4. – С. 261–268. SCOPUS, WoS, Q3

5. Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Грамположительные бактерии-деструкторы хлорированных бифенилов, перспективные для использования при биоремедиации загрязненных почв // Биотехнология. – 2009. – №3. – С. 72–79. SCOPUS, Q4

6. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоконверсии штаммом *Rhodococcus* sp. В7а // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, №6. – С. 644–650. SCOPUS, WoS, Q4

7. Егорова Д. О., Демаков В. А., Плотникова Е. Г. Разложение смеси (тригекса)хлорированных бифенилов штаммами рода *Rhodococcus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47, № 6. – С. 655–662. SCOPUS, WoS, Q4

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. SCOPUS, WoS, Q3

9. Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Разложение смеси хлорированных бифенилов с преобладанием тетразамещенных конгенов штаммом *Microbacterium* sp. В51 // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 4.1. – С.172–173. ВАК, РИНЦ

10. Коршунова И.О., Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Влияние уровня засоленности среды на рост штамма-деструктора *Rhodococcus* sp. КТ112-7b // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 4.1. – С.176. ВАК, РИНЦ

11. Плотникова Е.Г., Соляникова И.П., Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Головлева Л.А. Особенности разложение 4-хлорбифенила и 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Rhodococcus ruber* P25 // Микробиология. – 2012. – Т. 81, №2. – С.159–170. SCOPUS, WoS, Q3

12. Егорова Д. О., Корсакова Е. С., Демаков В.А., Плотникова Е. Г. Деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislavensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Том 49, № 3. – С. 267–278. SCOPUS, WoS, Q4

13. Egorova D.O., Demakov V.A., Plotnikova E.G. Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains // Journal of Hazardous Materials. – 2013. – V. 261. – P. 378–386. SCOPUS, WoS, Q1

14. Егорова Д.О., Первова М.Г. Применение природных штаммов-деструкторов в процессах разложения химических поллютантов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т.15, № 3(4). – С. 1287–1290. ВАК, РИНЦ

15. Шумкова Е. С., Егорова Д. О., Корсакова Е. С., Дорофеева Л. В., Плотникова Е. Г. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий-деструкторов бифенила и идентификация генов  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы // Микробиология. – 2014. – Т.83, №1. – С. 63–71. SCOPUS, WoS, Q3
16. Горбунова Т. И., Первова М. Г., Панюкова А. А., Егорова Д. О., Салоутин В. И., Демаков В. А., Чупахин О. Н. Пример междисциплинарного подхода к проблеме обезвреживания техногенных полихлорбифенилов // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 454, № 4. – С.411–416. SCOPUS, WoS, Q3
17. Egorova D. O., Gorbunova T. I., Pervova M. G., Demakov V. A. Bacterial degradation of a mixture obtained through the chemical modification of polychlorinated biphenyls by polyethylene glycols // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. – V. 50, № 7. – P. 722–729. SCOPUS, WoS, Q4
18. Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Shumkova E.S., Egorova D.O., Korsakova E.S., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2015. – V.100. – 155–164. SCOPUS, WoS, Q1
19. Пьянкова А.А., Андреев Д.Н., Егорова Д.О. Микробно-токсикологический анализ почвы, длительное время загрязненной хлорорганическими поллютантами // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9 (18), № 2 (1). – С. 604–606. ВАК, РИНЦ
20. 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. 638–648. SCOPUS, WoS, Q4
21. Назаров А.В., Егорова Д.О., Макаренко А.А., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами. // Экология человека. – 2016. – №3. – С. 3–8. SCOPUS, WoS, Q4
22. Егорова Д.О., Фарофонова В.В., Андреев Д.Н., Бузмаков С.А., Демаков В.А. Сообщества аэробных бактерий-деструкторов ДДТ, как результат естественной и искусственной селекции // Известия Саратовского университета. Новая Серия. Серия Химия, Биология, Экология. – 2017. – Т. 17, Вып. 1. – С. 79–86. ВАК, РИНЦ
23. 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. SCOPUS, WoS, Q2
24. 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. SCOPUS, WoS, Q2
25. Егорова Д.О., Первова М.Г., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Особенности разложения хлорированных бифенилов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – V.54, № 3. – С. 253–263. SCOPUS, WoS, Q4
26. Егорова Д.О., Демаков В.А. Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 - основа для биорегенерации полихлорбифенил-загрязненного металл/углеродного катализатора // Биотехнология. – 2018. – Т. 34, № 4. – С. 51–61. SCOPUS, Q4
27. Егорова Д.О. Трансформация модифицированных полихлорбифенилов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2018. – Вып. 3. – С. 277–283. ВАК, РИНЦ
28. Назарова Э.А., Кирьянова Т.Д., Егорова Д.О. Разнообразие гена бензоат диоксигеназы в бактериальных ассоциациях, сформировавшихся под давлением хлорорганического загрязнения // Экологическая генетика. – 2019. – Т.17, №3. – С. 13–22. SCOPUS, WoS, Q4

29. Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Демаков В.А. Иммуобилизация клеток штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 – как способ повышения эффективности биодеструкции модифицированных полихлорбифенилов // Биотехнология. – 2019. – №2. – С. 58–70. SCOPUS, Q4
30. Егорова Д.О., Горбунова Т.И., Первова М.Г., Плотникова К.А., Кирьянова Т.Д., Демаков В.А., Салоутин В. И., Чупахин О. Н. Бактериальная деструкция смеси гидрокси- и метоксипроизводных полихлорированных бифенилов // ДАН. – 2019. – Т. 486, №3. – С. 307–311. SCOPUS, WoS, Q3
31. Воронина А. О., Егорова Д. О., Корсакова Е. С., Плотникова Е. Г. Разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе техногеннозагрязненной почвы и выделение новых бактерий-деструкторов бифенила/хлорбифенилов рода *Pseudomonas* // Микробиология. –2019. – Т.13, №4. – С. 438–449. SCOPUS, WoS, Q3
32. Егорова Д.О., Пьянкова А.А. Скрининг гена альфа-субъединицы бензоат диоксигеназы в бактериальных ассоциациях, полученных в результате селекции на (хлор)ароматических соединениях // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2019. – Вып. 4. – С. 464–470. ВАК, РИНЦ
33. Egorova D.O., Vuzmakov S.A. Carcinogenic and teratogenic status of human population and polychlorinated biphenyls contaminations of soils and biota (European pied flycatcher) in a Perm (Western Ural, Russia)// Environmental Geochemistry and Health. – 2020. – V. 42. – P. 4299–4311. SCOPUS, WoS, Q1
34. Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir'yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. – 2020. – V. 400. – Article 123328. SCOPUS, WoS, Q1
35. Егорова Д.О., Первова М.Г., Демаков В.А. Влияние субстрата селекции на полихлорбифенил-деградативную активность аэробных почвенных бактериальных ассоциаций // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2020. – Вып. 4. – С. 294–302. ВАК, РИНЦ
36. Gorbunova T.I., Egorova D.O., Pervova M.G., Kyrianova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – V. 409. – Article 124471. SCOPUS, WoS, Q1
37. Егорова Д. О., Горбунова Т. И., Кирьянова Т. Д., Первова М. Г., Плотникова Е. Г. Моделирование структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов рода *Rhodococcus* и особенности их деградативной активности к хлорированным- и гидроксированным бифенилам при различных температурах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57, № 6. – С. 571–582. SCOPUS, WoS, Q4

#### Патенты

38. Плотникова Е.Г., Рыбкина (Егорова) Д.О., Демаков В.А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент RU 2262531 С2. 2005. Бюл. №29.
39. Егорова Д.О., Плотникова Е.Г., Корсакова Е.С., Назаров А.В., Демаков В.А. Галотолерантный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент RU 2548804 С1. 2015. Бюл. №11.
40. Назаров А.В., Плотникова Е.Г., Егорова Д.О., Токарев И.П., Куми В.В., Макаренко А.А. Средство для очистки почв, загрязненных гексахлорбензолом, линданом, дихлордифенилтрихлорэтаном, дихлордифенилдихлорэтаном, триаллатом и эфирами фталиевой кислоты (дибутилфталатом, диоктилфталатом). Патент RU 2562156 С1. 2015. Бюл. № 25.
41. Назаров А.В., Плотникова Е.Г., Егорова Д.О., Токарев И.П., Куми В.В., Макаренко А.А. Способ очистки почв, загрязненных полихлорированными бифенилами и другими токсичными соединениями. Патент RU 2563660 С1. 2015. Бюл. № 26

42. Куми В.В., Токарев И.П., Макаренко А.А., Назаров А.В., Егорова Д.О., Плотникова Е.Г. Штамм *Rhodococcus wratislaviensis* – деструктор устойчивых токсичных хлорорганических соединений. Патент. RU2585537 С1. 2016. Бюл. №15.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПХБ – полихлорированные бифенилы; СОЗ – стойкие органические загрязнители; ПДК – предельно допустимая концентрация; ТХБ – Трихлорбифенил (коммерческая смесь ПХБ); ХБК – хлорбензойные кислоты; ГОФДК – гидрокси-оксо-фенилгексадиеновая кислота; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ – газовая хроматография; ПИД – пламенно-ионизационный детектор; МС – масс-спектрометрический детектор; БК – бензойная кислота; ХБК – хлорбензойная кислота; 2-ХБК – 2-хлорбензойная кислота; 4-ХБК – 4-хлорбензойная кислота; моноХБ – монохлорбифенил; диХБ – дихлорбифенил; триХБ – трихлорбифенил; 2-ХБ – 2-хлорбифенил; 3-ХБ – 3-хлорбифенил; 4-ХБ – 4-хлорбифенил; 2,2'-диХБ – 2,2'-дихлорбифенил; 2,4'-диХБ – 2,4'-дихлорбифенил; 3,4-диХБ – 3,4-дихлорбифенил; 4,4'-диХБ – 4,4'-дихлорбифенил; 2,4,2'-триХБ – 2,4,2'-трихлорбифенил; 2,4,4'-триХБ – 2,4,4'-трихлорбифенил; 2,4,5-триХБ – 2,4,5-трихлорбифенил; 2,4,6-триХБ – 2,4,6-трихлорбифенил; ДО – диоксигеназа; БДО – бифенил диоксигеназа; Б/Т ДО – бифенил/толуол диоксигеназа; ФПДО – фенил пропионат диоксигеназа; ПК 1,2-ДО – катехол 1,2-диоксигеназа; ПК 2,3-ДО – катехол 2,3-диоксигеназа; ПГБГ – *para*-гидроксибензоат гидроксилаза; ПКК 3,4-ДО – протокатехоат 3,4-диоксигеназа; ПКК 4,5-ДО – протокатехоат 4,5-диоксигеназа; НО-ПХБ – гидрокси-полихлорбифенилы; ПХБ-ПЭГ – полиэтиленгликоль-полихлорбифенилы; Ме-ПХБ – метокси-полихлорбифенилы; Ме,НО-ПХБ – метокси-гидрокси-полихлорбифенилы; АЭ-ПХБ – аминоэтокси-полихлорбифенилы; НО,АЭ-ПХБ – гидрокси-аминоэтокси-полихлорбифенилы.

Егорова Дарья Олеговна

**АЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ  
БИФЕНИЛОВ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ  
РАЗНООБРАЗИЕ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ**

03.02.03 Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Подписано в печать  
Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1,5  
Тираж 120 экз. Заказ  
Набор компьютерный

---

Отпечатано в «Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук» - филиале Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского  
отделения Российской академии наук  
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13