

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

На правах рукописи

Воронина Анна Олеговна

**РАЗНООБРАЗИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ БИФЕНИЛА
(ХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ) ТЕХНОГЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ**

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Плотникова Елена Генриховна

Пермь – 2020

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Структура, свойства, распространение бифенила и ПХБ.....	12
1.2. Разложение бифенила и его хлорированных производных бактериями	14
1.2.1. Процесс анаэробного разложения ПХБ.....	16
1.2.2. Процесс аэробного разложения бифенила и ПХБ.....	18
1.3. Характеристика аэробных бактерий-деструкторов бифенила и ПХБ	19
1.3.1. Грамположительные бактерии-деструкторы рода <i>Rhodococcus</i>	28
1.3.2. Грамотрицательные бактерии-деструкторы рода <i>Pseudomonas</i>	30
1.3.3. Деструкция бифенила/ПХБ в переменных условиях окружающей среды.....	32
1.4. Молекулярно-биологические аспекты бактериальной деструкции бифенила и ПХБ	35
1.4.1. Метаболические пути и ключевые ферменты деструкции бифенила и ПХБ	35
1.4.1.1. Ферментные системы “верхнего пути”	37
1.4.1.2. Ферментные системы “нижнего пути”	43
1.4.2. Геномы и генетические системы разложения бифенила/ПХБ активных бактерий-деструкторов	44
1.4.3. Разнообразие генов (<i>bphA</i> -генов), детерминирующих начальный этап разложения бифенила/ПХБ	57
1.4.4. Биоремедиация окружающей среды с использованием бактерий- деструкторов	61
Глава 2. Материалы и методы исследований.....	66
2.1. Характеристика образцов, отобранных для исследований.....	66
2.2. Анализ исследуемых образцов	75

2.3. Среды и условия культивирования	75
2.4. Накопительные культуры и выделение бактерий-деструкторов	77
2.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	77
2.6. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез.....	78
2.7. Клонирование и изучение генов деструкции бифенила/ПХБ	79
2.7.1. Выделение и подготовка тотальной ДНК для клонирования	79
2.7.2. Амплификация <i>bphA1</i> -генов с тотальной ДНК.....	79
2.7.3. Электрофорез амплифицированных фрагментов	80
2.7.4. Клонирование фрагментов <i>bphA1</i> -генов.....	81
2.7.6. Секвенирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов <i>bphA1</i>	82
2.8. Изучение морфологических и физиолого-биохимических характеристик активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ.....	83
2.8.1. Определение ростовых характеристик	84
2.8.2. Определение субстратной специфичности бактерий.....	85
2.9. Изучение штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ молекулярно-генетическими методами.....	85
2.9.1. Выделение ДНК из чистых культур бактерий	85
2.9.2. ДНК-типирование	86
2.9.3. Амплификации генов 16S рРНК.....	86
2.9.4. Амплификации <i>bphA1</i> -генов с матрицы ДНК чистых культур.....	87
2.9.5. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей и построение деревьев	87
2.9.6. Детекция плазмидной ДНК.....	88
2.10. Деструкция хлорированных бифенилов бактериальными штаммами	88
2.11. Статистическая обработка результатов	90
Глава 3. Разнообразие генов деструкции бифенила/ПХБ в микробных сообществах загрязненных экотопов	91

3.1. Гены деструкции бифенила/ПХБ (<i>bphA1</i>) в микробном сообществе донных отложений прибрежной зоны порта Анадырь	92
3.2. Характеристика бактериального сообщества и анализ <i>bphA1</i> -генов поверхностного слоя шламохранилища калийного предприятия (г. Березники).....	96
3.3. Характеристика бактериального сообщества и анализ <i>bphA1</i> -генов почвы/грунта около солеотвала (г. Березники).....	104
3.4. Гены деструкции бифенила/ПХБ (<i>bphA1</i>) в микробном сообществе почвы с территории “Пермского завода смазок и СОЖ”	115
3.5. <i>bphA1</i> -Гены в сточных водах предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь).....	121
3.6. Разнообразие <i>bphA1</i> -генов в микробном сообществе донных отложений реки Чапаевки (территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов”).....	122
3.7. Скрининг <i>bphA1</i> -генов в загрязненных экосистемах полуострова Крым.....	127
3.8. Исследование почвы с перевала Кыртыкауш (республика Кабардино-Балкария) на наличие <i>bphA1</i> -генов.....	129
Глава 4. Бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ	130
4.1. Бактерии-деструкторы рода <i>Pseudomonas</i>	130
4.1.1. Идентификация, морфо-физиологические и генетические характеристики штаммов VRP2-2 и VRP2-6.....	130
4.1.2. Биодegradационные свойства <i>Pseudomonas</i> spp. VRP2-2 и VRP2-6..	133
4.1.3. Гены <i>bphA1</i> бактерий-деструкторов рода <i>Pseudomonas</i>	138
4.2. Бактерии-деструкторы рода <i>Rhodococcus</i>	141
4.2.1. Выделение и идентификация активных штаммов-деструкторов из образцов почв/грунтов, шламов района солеработок (г. Березники)	143
4.2.2. Выделение и идентификация штаммов-деструкторов бифенила из сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)	144

4.2.3. Выделение и идентификация штаммов-деструкторов бифенила из образцов донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск).....	144
4.2.4. Физиологические и генетические характеристики бактерий рода <i>Rhodococcus</i>	145
4.2.5. Биодegradационные свойства бактерий рода <i>Rhodococcus</i>	149
4.2.6. Гены <i>bphA1</i> штаммов-деструкторов рода <i>Rhodococcus</i>	153
Заключение	161
Выводы	172
Список сокращений	174
Список литературы	176
Приложение	207

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Проблема загрязнения окружающей среды трудноразлагаемыми токсичными органическими соединениями, поступающими в окружающую среду в результате работы промышленных предприятий, на сегодняшний день остается актуальной и привлекает все большее внимание исследователей, занимающихся вопросами экологии. К таким соединениям относятся бифенил и его хлорированные производные – полихлорированные бифенилы (ПХБ). Бифенил, являясь компонентом нефти, каменного угля и природного газа, вызывает масштабное загрязнение окружающей среды, а также широко используется в химической промышленности для синтеза многих органических соединений (Nam *et al.*, 2014). ПХБ отнесены Программой ООН по окружающей среде (ЮНЕП) к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ) (<http://chm.pops.int>). Благодаря исключительной устойчивости к физическим и химическим воздействиям в XX веке ПХБ широко использовались в различных отраслях промышленности, наибольшее применение получили в качестве компонентов, входящих в диэлектрические жидкости (в трансформаторах, конденсаторах), смазочно-охлаждающие жидкости (СОЖ), в лакокрасочные изделия, изоляционные материалы (Pieper, Seeger, 2008; Zhao *et al.*, 2016; Васильев, 2017). Несмотря на запрет промышленного выпуска и использования ПХБ (Стокгольмская конвенция, 2001 г.), до сих пор остается актуальной проблема их утилизации и восстановления загрязненных территорий (Васильева, Стрижакова, 2007; Sharma *et al.*, 2018; Elangovan *et al.*, 2019). Бифенил и ПХБ негативно влияют на иммунную, нервную, репродуктивную и эндокринную системы человека, а продолжительное воздействие на организм данными токсикантами может вызвать серьезные заболевания (Murugan *et al.*, 2018; Berghuis, Roze, 2019). Бифенил ввиду меньшей токсичности по сравнению с его хлорпроизводными может использоваться в качестве модельного соединения при изучении биологических процессов разложения ПХБ (Шумкова и др., 2015; Hu *et al.*, 2015). В последние

годы все более интенсивно разрабатываются и внедряются новые технологии для детоксикации и очистки загрязненных территорий с использованием биологического потенциала микроорганизмов (Sharma *et al.*, 2018). Известны и хорошо охарактеризованы грамположительные и грамотрицательные бактерии, способные к утилизации или частичной трансформации бифенила и ПХБ (Рыбкина и др., 2003; Gonçalves *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011; Плотникова и др., 2013; Шумкова и др., 2014; Kim *et al.*, 2018). Поиск и изучение активных бактерий-деструкторов, перспективных для использования в биотехнологиях восстановления и мониторинга загрязненных территорий (в т.ч. бифенилом/ПХБ), является актуальной задачей (Sharma *et al.*, 2018).

Как правило, деструкция бифенила/ПХБ у бактерий осуществляется до пентадиеновой и (хлор)бензойной кислот в четыре этапа. Первая реакция – включение двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо бифенила происходит под действием бифенил 2,3-диоксигеназы (БДО) – ключевого фермента деструкции бифенила/ПХБ. Считается, что именно α -субъединица БДО играет решающую роль в распознавании и связывании субстрата (Furukawa *et al.*, 2004; Viger *et al.*, 2012). Таким образом, ген *bphA1* (кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы) является важным маркером при исследовании биодegradационного потенциала индивидуальных бактерий и сообществ микроорганизмов (Pieper, 2005; Шумкова и др., 2015).

Цель настоящей работы – исследование разнообразия ключевых генов деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*-генов) в микробных сообществах техногеннозагрязненных экосистем, выделение и характеристика активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ.

Основные задачи исследования

1. Изучение разнообразия ключевых генов деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*, кодирующих α -субъединицу БДО) в микробных сообществах техногеннозагрязненных территорий Российской Федерации.

2. Выделение и идентификация активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ из образцов почв/грунтов, донных отложений и промышленных стоков, загрязненных (хлор)ароматическими соединениями.

3. Исследование биодegradационных свойств выделенных бактерий-деструкторов.

4. Молекулярно-генетическая характеристика выделенных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ.

Научная новизна

С использованием молекулярно-генетических методов впервые изучено разнообразие ключевых бактериальных генов (*bphA1*) деструкции бифенила/ПХБ загрязненных территорий ряда географически удаленных промышленных регионов Российской Федерации (в том числе, расположенных в Чукотском автономном округе, Пермском крае, Самарской области и Крыму). В бифенил-деградирующих микробных сообществах техногеннозагрязненных экотопов выявлены *bphA1*-гены, гомологичные генам некультивируемых бактерий. В загрязненных экотопах Чукотского автономного округа и Пермского края обнаружены новые “*bphA1*-гены”, имеющие низкий процент сходства (68,9–90,3 %) с известными генами диоксигеназ, гидроксимирующих бензольное кольцо ароматических соединений. Из загрязненных почв/грунтов, водоемов изолированы активные бактерии-деструкторы бифенила рода *Pseudomonas* и рода *Rhodococcus*, способные разлагать моно(ди)хлорированные бифенилы, и осуществляющие окисление как *орто*-, так и *пара*-хлорированных колец 2,4'-ХБ. Активность штаммов по отношению к хлорированным бифенилам указывает на перспективность их использования в биотехнологических целях.

Теоретическое и практическое значение работы

Исследование бактериальных генов (*bphA1*), ответственных за разложение токсичных (хлор)ароматических соединений – бифенила, полихлорированных бифенилов, выявленных на территориях ряда географически удаленных промышленных регионов РФ, и полученные новые данные о разнообразии *bphA1*-

генов, расширяют представление о микробиологическом составе техногеннозагрязненных экотопов и важной роли некультивируемых бактерий в деградации моно(поли)ароматических соединений и их хлорпроизводных. Результаты исследования также позволяют оценить вклад бактерий-деструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в процесс разложения (хлор)ароматических соединений, в том числе бифенила и ПХБ, и восстановление техногеннозагрязненных территорий РФ. Клонированные нуклеотидные последовательности *bphA1*-генов, а также последовательности генов 16S рРНК и *bphA1*-генов выделенных активных штаммов-деструкторов депонированы в общедоступную международную базу данных GenBank. Изолированные и охарактеризованные бактерии-деструкторы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* могут быть использованы при создании биотехнологий, направленных на мониторинг и восстановление загрязненных (хлор)ароматическими соединениями территорий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В микробных сообществах техногеннозагрязненных территорий ряда географически удаленных регионов Российской Федерации (Чукотский автономный округ, Пермский край и Самарская область) присутствуют гены гидроксилирующих диоксигеназ, ответственных за разложение токсичных ароматических соединений (в том числе, бифенила и ПХБ). Исследуемые сообщества характеризуются разнообразием *bphA1*-генов, кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деструкции бифенила/ПХБ. В незагрязненной почве с перевала Кыртыкауш (республика Кабардино-Балкария) гены *bphA1* отсутствуют.

2. Бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ, выделенные из загрязненных почв территории предприятия ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” (г. Пермь), относятся к роду *Pseudomonas*. В исследуемых псевдомонадах выявлены *bphA1*-гены, гомологичные генам активных деструкторов бифенила/ПХБ. Штамм *Pseudomonas* sp. VRP2-6 эффективно разлагает моно- и дихлорированные

бифенилы: 2-ХБ и 4-ХБ в концентрации 250 мг/л (97,1 % и 82,3 % за 24 часа, соответственно); 2,4'-диХБ – 44,6 мг/л (20,0 % за 24 часа).

3. Грамположительные бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ, выделенные из загрязненных почв, водоемов Пермского края и Самарской области, идентифицированы как представители рода *Rhodococcus*; в исследуемых штаммах детектировано наличие *bphA1*-генов, проведен их филогенетический анализ. Штаммы *Rhodococcus* spp. КВВ16 и VR31-1 характеризуются способностью разлагать хлорированные бифенилы: 2-ХБ, 4-ХБ в концентрации 96 мг/л (100 % за 3 часа) и 2,4'-диХБ – 44,6 мг/л (54,3 % за 24 часа).

Апробация работы и публикации

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на V, VII, X Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов “Симбиоз – Россия”, Тверь, 2012, Екатеринбург, 2014, Казань, 2017; 17-ой, 20-ой и 21-ой Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, Пушкино, 2013, 2016, 2017; Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи “Экотоксикология – 2013”, Тула, 2013; II Всероссийской школе-конференции молодых ученых “Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии”, Пермь, 2015; Всероссийской научно-практической с международным участием конференции “Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”, Пермь, 2016; XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем”, Киров, 2016; IX Международном конгрессе “Биотехнология: состояние и перспективы развития”, Москва, 2017; XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Экология родного края: проблемы и пути их решения”, Киров, 2017; Региональном конкурсе инновационных проектов по программе “УМНИК”, Пермь, 2017; II Международной научной конференции “Высокие технологии, определяющие качество жизни”, Пермь, 2018.

По теме диссертации опубликованы 16 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах из списка ВАК, входящие в национальную библиографическую базу данных научного цитирования РИНЦ, из них 2 в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования WoS и Scopus.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 209 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 42 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы (включающего 263 наименований работ, в том числе 35 отечественных и 228 зарубежных авторов), приложения.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН и является частью исследований, проводимых по теме “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды” (Регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1). Исследования поддержаны проектом Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (номер гос. Регистрации в ЦИТиС №01200963682), грантом РФФИ-Урал №16-44-590968-р_урал_a, Региональным конкурсом инновационных проектов по программе “УМНИК”, Пермь, 2017. Научные положения и выводы полностью базируются на результатах собственных исследований автора.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура, свойства, распространение бифенила и ПХБ

Бифенил представляет собой соединение, состоящее из двух бензольных колец. Это вещество является природным компонентом и встречается в составе каменноугольной смолы, нефти и природного газа. Бифенил используется в качестве важного промышленного химического реактива и имеет множество практических применений в повседневной жизни; выступает в качестве компонента при процессе синтеза пластмасс, входит в состав высокотемпературных теплоносителей и является исходным соединением для синтеза полихлорированных бифенилов (ПХБ). В некоторых странах бифенил до сих пор используют в качестве пищевой добавки (консервант), также им обрабатывают растения для защиты от насекомых и грибов. В то же время, данное вещество является мутагеном, а его длительное воздействие может привести к неблагоприятным эффектам (Muguan *et al.*, 2018). Бифенил, по сравнению с его синтетическими хлорпроизводными – полихлорированными бифенилами, обладает меньшей токсичностью, благодаря чему используется в качестве модельного соединения при изучении ферментов и генетических систем, участвующих в бактериальной деструкции ПХБ (Nam *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

Молекула ПХБ состоит из двух бензольных колец, содержащих от 1 до 10 атомов хлора, которые могут образовывать 209 конгенов, различающиеся по количеству хлора в разных позициях. Более хлорированные конгены имеют наибольшую токсичность, устойчивость к биотрансформации и характеризуются длительным выведением из организма человека в сравнении с менее хлорированными (Serdar *et al.*, 2014; Shuai *et al.*, 2016). По своим физико-химическим свойствам ПХБ близки к диоксинам. Размеры молекул находятся в диапазоне 9-10,5Å в длину и около 3Å в ширину. ПХБ имеют низкое давление насыщенных паров, обладают заметной способностью переходить в парогазовую фазу, то есть испаряться в атмосферный воздух с поверхности почвы, воды и т.д. Характер и динамика распределения ПХБ в окружающей среде во многом

определяются их физическими свойствами, такими как химическая инертность, достаточно высокая плотность паров и способность сорбироваться на частицах. ПХБ максимально адсорбируются органическим веществом почвы и за счет наличия носителя способны перемещаться вниз по профилю, загрязняя поверхностные и грунтовые воды (Демин, 2013).

ПХБ аккумулируются в жировых тканях животных, человека и могут сохраняться там длительное время, накопление ПХБ осуществляется и в растениях (Adam *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2017; Warenik-Bany *et al.*, 2019). В настоящее время, примерно, треть произведенных ПХБ попали в окружающую среду. Остальные две трети находятся в связанном состоянии в старом электрооборудовании и отходах (Демин, 2013). Благодаря уникальным физическим и химическим свойствам ПХБ широко использовались в качестве компонента, входящего в диэлектрические жидкости (в трансформаторах и конденсаторах), в лакокрасочные изделия (Zhang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). ПХБ являются побочным продуктом при сжигании отходов, а также многих промышленных процессов, использующих хлор. Предельно допустимые концентрации ПХБ, включающие суммарный токсический эффект от всех 209 конгенов, имеют следующие значения: атмосферный воздух – 1 мкг/м³, вода – 1 мкг/л, почва – 0,06 мг/кг; пищевые продукты (в пересчете на жир): молоко – 1,5 мг/кг, рыба – 5 мг/кг (Демин, 2013). Несмотря на запрет использования ПХБ в хозяйственной и промышленной деятельности (Стокгольмская конвенция, 2001 г.), данные токсиканты широко распространены по всей планете и продолжают загрязнять окружающую среду. Исключением не являются и отдаленные регионы, где отсутствует антропогенная нагрузка (высокогорные районы, полярные области), в силу того, что ПХБ обладают способностью к переносу на дальние расстояния (Демин, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). При воздействии на организм ПХБ запускается процесс образования активных форм кислорода (АФК) и индуцируются антиоксидантные ферменты, благодаря активации арил гидрокарбонowego рецептора и цитохрома

P-450-1A (Mauger *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017). В связи с этим, Международным агентством по изучению рака (International Agency for Research on Cancer – IARC) ПХБ отнесены к I группе канцерогенов (<https://www.iarc.fr/>; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). ПХБ также негативно влияют на иммунную, нервную, репродуктивную и эндокринную системы человека. Кроме того, эпидемиологические исследования показали устойчивую корреляцию между концентрациями ПХБ в плазме крови и развитием серьезных заболеваний (например, сахарный диабет, рак) (Mauger *et al.*, 2016; Berghuis, Roze, 2019).

1.2. Разложение бифенила и его хлорированных производных бактериями

Биодеградация (биоразрушение) – это преобразование сложных веществ в результате биологической активности. Это широкое понятие включает три более узких процесса:

- 1) трансформация или незначительные изменения молекулы;
- 2) фрагментация или разложения сложной молекулы на более простые соединения;
- 3) минерализация или превращения сложного вещества в более простые (H_2O , CO_2 , CH_4 и т.д.).

Соединения, в состав которых входит бензольное кольцо, имеют широкое распространение в окружающей среде. Бензольное кольцо характеризуется термодинамической стабильностью, что, в свою очередь, является причиной устойчивости к химической деструкции ряда ароматических соединений и способствует аккумуляции таких веществ в природе, подвергая биосферу большой опасности. Благодаря наличию широкого спектра ферментов биодеградации, микроорганизмы могут использовать различные органические соединения в качестве единственного источника углерода и энергии, в том числе и такие ароматические соединения (АС), как бифенил и его хлорированные производные (ПХБ).

Загрязнение окружающей среды стойкими токсичными соединениями влияет на все уровни организации живого. Бактерии, являясь частью биосферы, выступают в качестве индикатора и реагируют на изменения, происходящие в их среде обитания. В результате того, что микроорганизмы длительный период времени находятся в близком контакте с ароматическими загрязнителями, слабо подверженными деструкции, бактериям удалось адаптироваться для использования этих соединений в качестве единственного источника углерода и энергии. На сегодняшний день остается актуальным вопрос как происходит бактериальная деграция ксенобиотиков, с которыми микроорганизмы столкнулись впервые. Это может быть обусловлено широким эволюционным потенциалом генетических систем, ответственных за трансформацию токсичных органических веществ, благодаря мутациям или/и рекомбинации уже существующих генов, кодирующих ферменты деструкции ароматических соединений (Schlömann, 1994).

Таким образом, на сегодняшний день, исследования по выделению и изучению активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ являются перспективными, развитие которых необходимо для более детального понимания процессов бактериальной деструкции и дальнейшего применения накопленных знаний в таких отраслях науки, как биотехнология и экология.

В настоящее время накоплен большой объем информации о способности к утилизации или частичной трансформации бифенила/ПХБ различными анаэробными и аэробными бактериями родов *Achromobacter*, *Agromyces*, *Alcaligenes*, *Aquamicrobium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Ceriporia*, *Chitinophaga*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Hydrogenophaga*, *Janibacter*, *Janthinobacterium*, *Luteibacter*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pandoraea*, *Phanerochaete*, *Phoma*, *Pleurotus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shigella*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Subtercola*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Trametes* и *Williamsia* (Hou, Dutta, 2000; Pieper, Seeger, 2008; Cao *et al.*, 2011; Ponce *et al.*, 2011; Colbert *et*

al., 2013; Somaraja *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2014; Nam *et al.*, 2014; Pori *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Atago *et al.*, 2016; Shuai *et al.*, 2016; Kour *et al.*, 2019).

1.2.1. Процесс анаэробного разложения ПХБ

При анаэробной бактериальной деструкции наиболее активное разложение ПХБ идет через восстановительное дехлорирование. Как правило, этот процесс влияет на удаление (отщепление) хлора в *мета*- и *пара*-положении, в результате чего происходит уменьшение количества высокохлорированных ПХБ с соответствующим увеличением низкохлорированных *орто*-замещенных ПХБ-конгенов. Следует отметить, что менее хлорированные конгены ПХБ в значительной степени снижают потенциальные риски для окружающей среды, так как обладают меньшей канцерогенностью и диоксин-токсичностью, по сравнению с высокохлорированными ПХБ (Abramowicz, 1995; Elangovan *et al.*, 2019).

Разложение ПХБ в анаэробных условиях с участием бактерий-деструкторов является важным процессом биоремедиации донных отложений морей и пресных водоемов, грунтовых вод, где количество кислорода лимитировано и происходит активный процесс накопления загрязняющих веществ. Многие смеси ПХБ способны трансформироваться и минерализоваться исключительно при воздействии анаэробных бактерий-деструкторов (Zhang, Bennett, 2005). Также имеются литературные данные, подтверждающие, что аэробная деградация высокохлорированных ПХБ не происходит без предварительного анаэробного процесса (Master *et al.*, 2002; Kaaya *et al.*, 2018).

Установлено, что процесс анаэробного разложения (дегалогенирование) ПХБ осуществляется бактериями-деструкторами, которые могут использовать хлорбифенилы в качестве акцептора электронов, в результате чего происходит отщепление атомов хлора в молекулах ПХБ (Sowers, May, 2013; Liang *et al.*, 2014; Elangovan *et al.*, 2019) (рисунок 1).

Выделены и хорошо изучены бактериальные штаммы родов *Desulfomonile*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter*, *Desulfuromonas*, *Dehalococcoides*, *Achromobacter*,

Acidovorax, *Anaeromyxobacter*, *Sedimentibacter*, *Clostridium*, *Geobacter* и *Sulfuricurvum*, осуществляющие дегалогенирование ПХБ в анаэробных условиях (Kranzioch *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2017). Brown с соавторами (1984) опубликовали исследование, в котором изучался процесс анаэробного дехлорирования ПХБ на примере технической смеси Aroclor 1242, загрязняющей донные отложения реки Гудзон (США). Через 16 недель 53 % хлора (от суммарного количества хлора) из смеси Aroclor 1242 было удалено, а доля моно- и дихлорбифенилов увеличилась с 9 до 88 % (Brown *et al.*, 1984). Дальнейшие исследования, касающиеся изучения дехлорирования смесей ПХБ (Aroclor 1242, 1248, 1254 и 1260), показали, что конгенеры ПХБ в большей степени подвергались отщеплению хлора в *para*- и *meta*-положении, что приводило к накоплению менее хлорированных конгенов ПХБ с хлором в *ortho*-положении. В то же время, трансформация смесей ПХБ, несущих хлор в *ortho*-положении, является не менее важным процессом в биоремедиации, так как конгенеры этой группы (хлор в *ortho*- и *para*-положении), как правило, ответственны за токсичность (Field, Sierra-Alvarez, 2008).

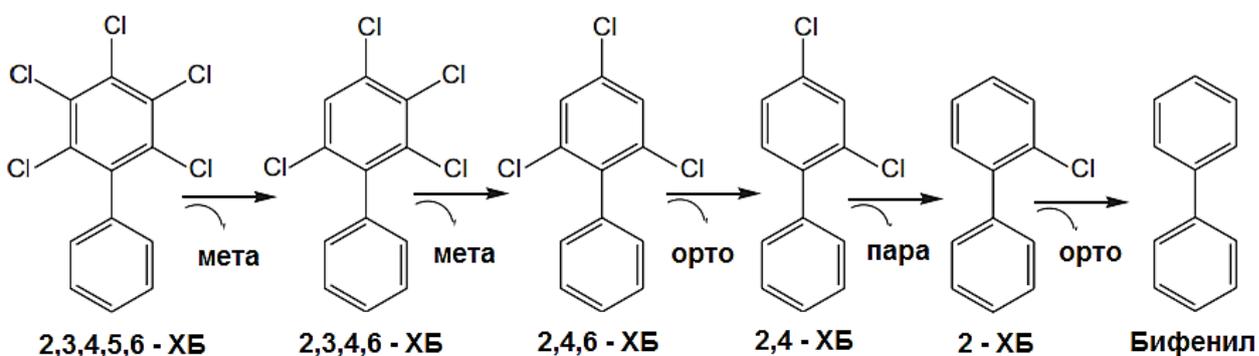


Рисунок 1 – Анаэробное дехлорирование 2,3,4,5,6-пентахлорбифенила бактериальным штаммом *Dehalococcoides ethenogenes* 195 (Elangovan *et al.*, 2019).

Активная деструкция различных конгенов ПХБ зависит от наличия в микробном сообществе как штаммов-деструкторов с узконаправленным деградационным потенциалом, так и штаммов, способных трансформировать широкий спектр хлорароматических соединений (Agulló *et al.*, 2019).

Также, одним из определяющих критериев разложения смесей ПХБ до менее токсичных продуктов метаболизма является комбинация анаэробного дехлорирования и аэробного окисления (Pathiraja *et al.*, 2018).

1.2.2. Процесс аэробного разложения бифенила и ПХБ

Аэробная деградация бифенила и ПХБ бактериями включает в себя два пути: общий “верхний путь” биодegradации (хлор)бифенилов, в процессе которого (хлор)бифенил расщепляется до пентадиеновой и (хлор)бензойной кислоты и “нижний путь” биодеструкции, при котором 2-гидрокси-2,4-пентадиеновая кислота трансформируется до пирувата и ацетил-КоА, который затем может участвовать в цикле Кребса (рисунок 2) (Elangovan *et al.*, 2019).

В процессе аэробной биодegradации ПХБ наблюдается корреляция между структурой ПХБ и бактериальной деструктивной активностью:

1. Первый этап деструкции ПХБ начинается с оксигеназной атаки менее хлорированного или вовсе не имеющего заместителей хлора ароматического кольца.

2. Низкохлорированные конгенеры ПХБ разлагаются легче по сравнению с высокохлорированными. По мере увеличения замещения хлора скорость деструкции ПХБ уменьшается.

3. Процесс биодegradации ПХБ затрудняется, если в пределах одного кольца присутствует два атома хлора в *орто*-положении (например, 2,6-ХБ) или каждое бензольное кольцо несет по одному заместителю хлора (например, 2,2'-ХБ).

4. Деструкция ПХБ, содержащих заместители хлора только в одном кольце, протекает легче, чем при наличии одинакового количества атомов хлора в обоих кольцах.

5. ПХБ, содержащие два хлора в положении 2,3 одного кольца, более подвержены бактериальной деструкции, чем тетра- и пентахлорбифенилы (Elangovan *et al.*, 2019).

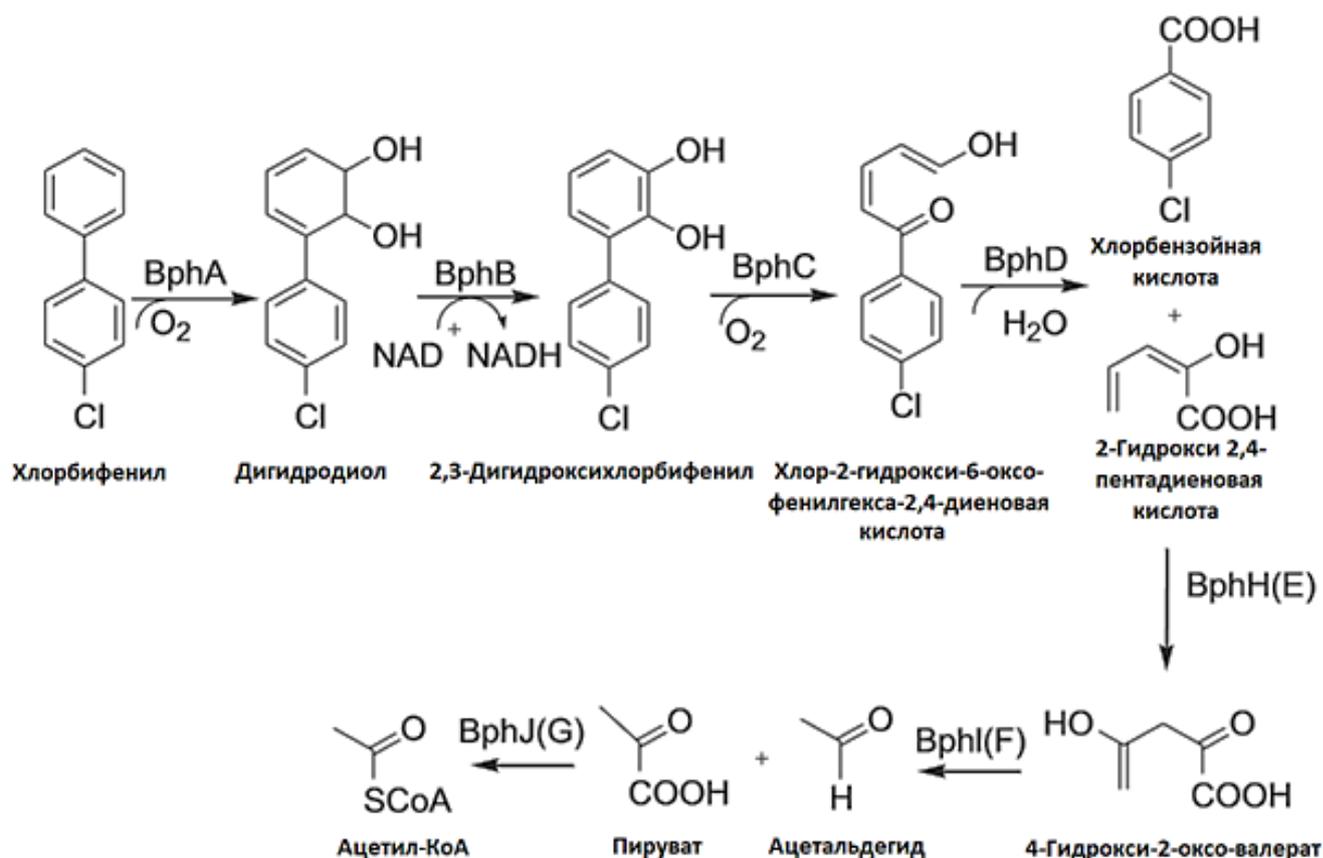


Рисунок 2 – Путь биодegradации хлорбифенила. Ферменты “верхнего пути” биодegradации: BphA – бифенил диоксигеназа; BphB – бифенил 2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа; BphC – 3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа; BphD – 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза. Ферменты “нижнего пути” биодegradации: BphH(E) – 2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза; BphI(F) – 4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза и BphJ(G) – ацетальдегид дегидрогеназа (Elangovan *et al.*, 2019).

1.3. Характеристика аэробных бактерий-деструкторов бифенила и ПХБ

Результаты многочисленных исследований демонстрируют, что аэробные бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ встречаются повсеместно, а их выделение осуществляется из различных экологических ниш. В таблице 1 представлены данные о наиболее изученных представителях аэробных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ.

Таблица 1 – Аэробные бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ

Штамм	Спектр разлагаемых субстратов	Место и источник выделения	Ссылка
1	2	3	4
Грамположительные бактерии			
* <i>Rhodococcus jostii</i> RNA1	Моно-, ди-, три-, тетра-, гекса- гептаХБ. <i>Орто</i> - и <i>пара</i> -замещенные изомеры ПХБ	Почвы, загрязненные инсектицидом, γ -гексахлороциклогексаном (Япония)	Masai <i>et al.</i> , 1995 Seto <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus erythreus</i> NY05	2-ХБ, 4-ХБ, диХБ (2,4-, 2,4'-ХБ), триХБ (2,4,4'-ХБ)	н.д.	Maltseva <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhodococcus globerulus</i> P6	2-ХБ, 3-ХБ, 4-ХБ, 2,4-диХБ, 2,4,4'-, 2,5,4'-триХБ, тетра- и пентаХБ	н.д.	Asturias, Timmis, 1993
<i>Rhodococcus sp.</i> B7a	МоноХБ (2-ХБ, 4-ХБ), диХБ (2,2'-, 2,4'-, 4,4'-ХБ), триХБ (2,4,2'-, 2,4,4'-ХБ)	Почва, загрязненная отходами химических производств (г. Березники, Пермский край)	Егорова и др., 2010
<i>Rhodococcus ruber</i> P25	4-ХБ, 2,4'-, 4,4'-ХБ, 2,4,2'-, 2,4,4'-ХБ	Почва, загрязненная отходами производства галогеносодержащих соединений (г. Пермь)	Плотникова и др., 2012
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P13 и P20	моноХБ (2-ХБ, 4-ХБ), диХБ (2,4'-диХБ)	Почва, загрязненная отходами химических производств (г. Березники, Пермский край)	Шумкова и др., 2015
<i>Rhodococcus sp.</i> R04	3-ХБ, 3,4-ХБ, 4,4'-ХБ, 2,4,6-ХБ, 2,4',5-ХБ, 2,3,4,5-ХБ, 3,4,3',4'-ХБ	Почва, загрязненная нефтепродуктами	Yang <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhodococcus sp.</i> WB1	ПХБ от моноХБ до тетраХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Китай)	Xu <i>et al.</i> , 2016
<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA421 и TA431	Бифенил, некоторые конгенеры ПХБ	Экосистема термитника (<i>Reticulitermes speratus</i>)	Chung <i>et al.</i> , 1994
* <i>Geobacillus sp.</i> JF8	Деструкция конгенов ПХБ: моноХБ (2-ХБ, 3-ХБ, 4-ХБ), диХБ (2,3-, 2,3'-, 2,4'-, 3,4-, 3,5-, 3,3'-, 3,4'-, 4,4'-ХБ), триХБ (2,3,4-, 2,3,3'- ХБ) при температуре 60°C	Компост отходов ПХБ (Япония)	Shintani <i>et al.</i> , 2014

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>Janibacter</i> sp. MS3-02	ПХБ из промышленной смеси Aroclor 1242	Почва около мусоросжигательной установки (Испания)	Sierra <i>et al.</i> , 2003
<i>Microbacterium</i> sp. B51	Окисление <i>орто</i> -ХБ (2,2'-, 2,4'-диХБ, 2,4,2'-триХБ) и <i>пара</i> -ХБ (4,4'-диХБ, 2,4,4'-триХБ)	Почва, загрязненная отходами химических производств (г. Березники)	Рыбкина и др., 2003
<i>Paenibacillus</i> sp. KBC101	Утилизирует как <i>орто</i> -ХБ (2,5,2'-ХБ, 2,5,2',5'-ХБ, 2,4,5,2',5'-ХБ), так и <i>пара</i> -ХБ (2,4,3',4'-ХБ, 2,4,2',4'-ХБ, 2,4,5,2',4',5'-ХБ)	Почва, загрязненная отходами водоочистительных сооружений (Япония)	Sakai <i>et al.</i> , 2005
Грамотрицательные штаммы			
* <i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707	Предпочтительное окисление <i>пара</i> -ХБ, в том числе 4,4'-диХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Erickson, Mondello, 1993
* <i>Pseudomonas putida</i> KF715	4-Метилбифенил, 2-бромобифенил, 2-нитробифенил, 2-гидроксибифенил, бифенилметан, 4-ХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Suenaga <i>et al.</i> , 2017
* <i>Pseudomonas toyotomiensis</i> KF710	Бифенил, ПХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Watanabe <i>et al.</i> , 2015a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JP-11	Бифенил, ПХБ	Донные отложения Бенгальского залива (Индийский океан)	Chakraborty, Das, 2016
<i>Pseudomonas</i> sp. SA-6	МоноХБ, диХБ (2,2'-, 2,4'-, 2,3-, 3,3'-, 3,5-ХБ), триХБ (2,2',4-, 2,2',5-, 2',3,4-ХБ)	Почва, загрязненная диэлектриком из трансформатора (Нигерия)	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008, Gioia <i>et al.</i> , 2014
* <i>Pseudomonas alcaliphila</i> JAB1	Моно-, ди-, три- и тетраХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Чехия)	Ridl <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudomonas</i> sp. S210, S211, S212	МоноХБ, диХБ (2,2'-, 2,4'-ХБ), триХБ (2,2',4-, 2,4',4-ХБ)	Почва (г. Серпухов, Московская область)	Плотникова и др., 1998
<i>Achromobacter</i> sp. BP3	Бифенил	Почва, загрязненная нефтепродуктами	Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H850	2-ХБ, 2,4-, 2,5-диХБ, 2,4,5-триХБ, тетра-, пента-, некоторые гексаХБ.	Грунт со дна р. Гудзон (США)	Bedard <i>et al.</i> , 1987
<i>Alcaligenes faecalis</i> Pi434	Все моноХБ, некоторые ди-, три-ХБ	Почва в черте Нью-Йорка (США)	Bedard, Haberl, 1990
<i>Alcaligenes eutrophus</i> A5	Бифенил, 4-ХБ	Донные отложения водохранилища (США)	Springael <i>et al.</i> , 1993

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>Aquamicrobium</i> sp. SK-2	Бифенил	Активный ил сточных вод (г. Сеул, Южная Корея)	Chang <i>et al.</i> , 2015
<i>Burkholderia cepacia</i> H201	Все моноХБ, некоторые ди-, триХБ	Почва в черте Нью-Йорка (США)	Bedard, Haberl, 1990
* <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	Широкий спектр ПХБ, содержащих до 6 заместителей	Почва в черте Нью-Йорка (США)	Mondello, 1989
<i>Burkholderia cepacia</i> P166	Все моноХБ. Способность к полной утилизации 4-ХБ	Индустриальные стоки (Панама)	Arensdorf, Foht, 1994; Field, Sierra-Alvarez, 2008
<i>Burkholderia</i> sp. SK-3	МоноХБ, изомеры ПХБ из смеси Aroclor 1242. Утилизация 4-ХБ и 2,4'-диХБ	Иловые отложения, загрязненные ПХБ (США)	Vilo <i>et al.</i> , 2014
<i>Comamonas testosteroni</i> B-356	4-ХБ, 3,3'-диХБ, 2,2'- и 4,4'-диХБ, ПХБ из промышленной смеси Aroclor 1242. Предпочтительное окисление <i>мета</i> -ХБ.	Активный ил (Канада)	Sondossi <i>et al.</i> , 2004
<i>Comamonas testosteroni</i> H336	Все моноХБ, 2,4-диХБ, тетра- и пентаХБ	Почва в черте Нью-Йорка (США)	Bedard, Haberl, 1990
* <i>Comamonas testosteroni</i> KF712 (= <i>Pseudomonas testosteroni</i> KF712)	4-Метилбифенил, 2-бромобифенил, 2-нитробифенил, 4-ХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Hirose <i>et al.</i> , 2015
* <i>Comamonas testosteroni</i> ТК102 (= <i>Pseudomonas testosteroni</i> ТК102)	Бифенил	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Fukuda <i>et al.</i> , 2014
<i>Cupriavidus basilensis</i> KF708	ПХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Suenaga <i>et al.</i> , 2015
<i>Cupriavidus pauculus</i> KF709	Бифенил и моноХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Watanabe <i>et al.</i> , 2015b
* <i>Cupriavidus</i> sp. SK-4	МоноХБ (2-ХБ, 3-ХБ, 4-ХБ), <i>орто</i> - замещенные ди-ХБ (2,2'-диХБ и 2,4'-диХБ)	Иловые отложения, загрязненные ПХБ (США)	Vilo <i>et al.</i> , 2014
* <i>Dyella ginsengisoli</i> LA-4	Утилизация около 95 % бифенила (100 мг/л) в течение 72 часов	Очистные сооружения химического предприятия (Китай)	Ang <i>et al.</i> , 2009
<i>Enterobacter</i> sp. LY402	Три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октаХБ	Загрязненная почва (Китай)	Jia <i>et al.</i> , 2008

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>Enterobacter</i> sp. SA-2	Все моноХБ, диХБ (2,2'-, 2,4'-, 2,3-ХБ)	Почва (Нигерия)	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008; Gioia <i>et al.</i> , 2014
<i>Hydrogenophaga</i> sp. IA3-A	Моно-, ди-, триХБ	Почва, загрязненная ПХБ (Ньюфаунд, Канада)	Lambo, Patel, 2006
<i>Ralstonia</i> sp. SA-3	3,3'-, 3,5-диХБ	Почва (Нигерия)	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008; Gioia <i>et al.</i> , 2014
<i>Ralstonia</i> sp. SA-4	Все моноХБ, диХБ (2,2'-, 2,4'-, 2,3-, 3,3'-, 3,5-ХБ), триХБ (2,2',4-, 2,2',5-, 2',3,4-ХБ)	Почва (Нигерия)	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008; Gioia <i>et al.</i> , 2014
<i>Ralstonia</i> sp. SA-5	Все моноХБ, диХБ (2,2'-, 2,4'-, 2,3-, 3,3'-ХБ), триХБ (2,2',4-, 2,2',5-, 2',3,4-ХБ)	Почва (Нигерия)	Adebusoye <i>et al.</i> , 2008; Gioia <i>et al.</i> , 2014
<i>Sphingobium fuliginis</i> НСЗ	Бифенил	Почва, загрязненная ПХБ	Hu <i>et al.</i> , 2015

Примечание. “н.д.” – данные не приведены. *Штаммы, у которых был секвенирован геном (см. таблица 2).

Штаммы, способные использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии, трансформируют это соединение до менее токсичных веществ. Ряд бактерий, таких как *Sphingobium yanoikuyae* В1, *Sphingobium fuliginis* НСЗ, *Achromobacter* sp. ВРЗ, *Dyella ginsengisoli* LA-4, *Rhodococcus* sp. R04, *Mycobacterium* sp. РYR-1, осуществляющие утилизацию бифенила, были выделены из разнообразных экотопов и хорошо изучены (Moody *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Chadhain *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2015). Исследуемые штаммы характеризовались высокой деструктивной активностью в отношении бифенила: *Mycobacterium* sp. РYR-1 осуществлял деградацию более 98 % бифенила (80 мг/л) в течение 72 ч, тогда как *Dyella ginsengisoli* LA-4 утилизировал около 95 % бифенила (100 мг/л) в течение 72 часов, *Achromobacter* sp. ВРЗ полностью разрушал 50 мг/л бифенила в течение 28 часов, а штамм *Sphingobium fuliginis* НСЗ – 80,7 % бифенила (100 мг/л) в течение 24 часов (Hu *et al.*, 2015). Штамм *Aquamicrobium* sp. SK-2, выделенный из

активного ила сточных вод (г. Сеул, Южная Корея), осуществлял полную деструкцию бифенила в концентрации: 0,65; 1,3 и 2,6 мМ – за 24 часа, а в концентрации 3,9 мМ – за 96 часов. В случае с более высокими концентрациями (6,5 мМ и 9,75 мМ) процесс деструкции проходил за более продолжительный промежуток времени – 120 часов, и составлял 80 % и 46,7 %, соответственно. Следует отметить, что оптическая плотность клеточной культуры увеличивалась при повышении концентрации вносимого субстрата, например, оптическая плотность штамма *Aquamicrobium* sp. SK-2 с $ОП_{660} = 0,31$ до $ОП_{660} = 1,52$ после повышения концентрации бифенила с 0,65 до 9,75 мМ (Chang *et al.*, 2013).

Некоторые аэробные бактерии-деструкторы способны использовать моноклорбифенилы в качестве единственного источника углерода и энергии. Примеры бактериального роста на 4-хлорбифениле (4-ХБ) являются наиболее распространенными, в то время как субстраты 2-ХБ и 3-ХБ используются бактериями в значительно меньшей степени. Так, штамм *Burkholderia ceracia* P166 (ранее идентифицирован как *Pseudomonas ceracia*) рос как на 4-ХБ, так и на 2-ХБ и 3-ХБ, однако рост на 2-ХБ и 3-ХБ был ограничен из-за накопления токсичных промежуточных продуктов. Неограниченный рост на 4-ХБ был обусловлен способностью штамма легко утилизировать 4-хлорбензоат (промежуточный продукт) без образования каких-либо токсичных соединений. Скорость роста штамма *B. ceracia* P166 на 4-ХБ, в качестве субстрата, примерно, в два раза превышала рост на бифениле. Через двое суток 4-ХБ (1 мМ) трансформировался в 4-хлорбензойную кислоту (0,53 мМ) и неорганический хлорид (0,34 мМ) (Field, Sierra-Alvarez, 2008).

Выявлены другие бактерии-деструкторы хлорбифенилов, обладающие способностью полного или частичного разрушения его хлорированных производных. S. Kim и F.W. Picardal (2000) выделили уникальные аэробные штаммы *Burkholderia* sp. SK-3 и *Cupriavidus* sp. SK-4, способные использовать моноклорбифенилы (2-ХБ, 3-ХБ, 4-ХБ), а также дихлорбифенилы – 2,2'-диХБ и 2,4'-диХБ (имеющие атомы хлора в *орто*-положении), в качестве единственного

источника углерода и энергии (Kim, Picardal, 2000; Kim, Picardal, 2001; Vilo *et al.*, 2014).

В 2008 году из загрязненных экосистем Африки были выделены штаммы-деструкторы *Ralstonia* sp. SA-3, *Ralstonia* sp. SA-4, *Ralstonia* sp. SA-5, *Pseudomonas* sp. SA-6 и *Enterobacter* sp. SA-2, обладающие способностью к деструкции *мета*- и *орто*-дихлорированных бифенилов (Adebusoye *et al.*, 2008). Уникальность штаммов проявлялась в способности деградировать *орто*-триХБ, которые характеризовались наличием атомов хлора на обоих бензольных кольцах (Gioia *et al.*, 2014). Далее, из исследуемой экосистемы М.О. Пори с соавторами (2008) изолировали и исследовали еще один перспективный штамм-деструктор бифенила/ПХБ *Achromobacter xylosoxidans* IR08, метаболические функции которого были аналогичны с штаммами *Ralstonia* sp. SA-4, *Ralstonia* sp. SA-5, *Pseudomonas* sp. SA-6, однако он отличался способностью утилизировать 4,4'-диХБ без накопления токсичных промежуточных продуктов. Также следует обратить внимание на довольно необычную особенность: бактериальный рост штамма *A. xylosoxidans* IR08 на бифениле и бензоате был менее активным, чем на хлорированных бифенилах, в результате можно сделать вывод, что наличие хлора в кольце не только не препятствовало активному росту штамма, а, предположительно, способствовало этому. Примечательно, что многочисленные данные указывают на то, что первые этапы эволюции ферментных систем деструкции хлорзамещенных бифенилов начинались с незамещенного бифенила. Авторы сделали предположение, что ферментные системы деградации ПХБ штамма *A. xylosoxidans* IR08 имеют отличия от подавляющего большинства изученных ранее ферментных систем других активных штаммов-деструкторов ПХБ (Pori *et al.*, 2008).

Штамм *Enterobacter* sp. LY402 был выделен из поверхностного слоя почвы, длительное время (более 20 лет) подвергавшейся загрязнению ПХБ, входящих в состав трансформаторных жидкостей (Китай). Данный штамм характеризовался способностью деградировать широкий спектр конгенов коммерческих смесей

ПХБ. Как правило, в литературных источниках встречаются описания бактериальных штаммов, разлагающих конгенеры ПХБ с пятью или меньшим количеством заместителей хлора, большинство исследуемых штаммов не способны к деструкции высокохлорированных ПХБ (содержащих пять и более атомов хлора). Уникальный штамм *Enterobacter* sp. LY402 обладал способностью трансформировать 92 % – пентаХБ, 76 % – гексаХБ и 37 % – гептаХБ, содержащихся в коммерческих смесях ПХБ, а также обладал активностью по отношению к некоторым октаХБ (Jia *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011).

Из образцов почв, загрязненных отходами водоочистительных сооружений (Япония), был выделен штамм деструктор высокохлорированных бифенилов (имеющих от пяти до девяти заместителей хлора) – *Paenibacillus* sp. КВС101. Данный штамм активно утилизировал как *орто*-хлорированные бифенилы: 100 % – 2,5,2'-ХБ, 72 % – 2,5,2',5'-ХБ, 58 % – 2,4,5,2',5'-ХБ, так и *пара*-ХБ: 58 % – 2,4,3',4'-ХБ, 33 % – 2,4,2',4'-ХБ, 11 % – 2,4,5,2',4',5'-ХБ, в концентрации 10 мг/л. Следует отметить, что штамм *Paenibacillus* sp. КВС101 по своим деградационным свойствам превосходил ранее хорошо изученные штаммы-деструкторы ПХБ, такие как *Rhodococcus jostii* RHA1 и *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Например, штамм *R. jostii* RHA1, в отличие от *Paenibacillus* sp. КВС101, не проявлял деградационной активности по отношению к 3,4,3',4'- и 2,4,5,2',4',5'-ХБ. А штамм *P. pseudoalcaligenes* KF707 характеризовался относительно низкой активностью или полным отсутствием процесса деградации (от 0 до 31 %) конгенов ПХБ, используемых в данном исследовании (Sakai *et al.*, 2005).

Особое значение в свете современных задач экологии и, в частности, биоремедиации, занимают исследования высокоактивных штаммов-деструкторов бифенила и ПХБ. На сегодняшний день к наиболее изученным и перспективным бактериям-деструкторам можно отнести следующие штаммы: *R. jostii* RHA1, *Burkholderia xenovorans* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707, *Alcaligenes eutrophus* H850 (Yates, Mondello, 1989; Gómez-Gil *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Atago *et al.*, 2016).

Представители рода *Burkholderia* занимают разнообразные экологические ниши. Особый интерес к штаммам рода *Burkholderia* вызван их способностью разлагать широкий спектр ксенобиотиков, в частности, галогенированные ароматические соединения. Одним из наиболее изученных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ является *Burkholderia xenovorans* LB400, штамм был выделен из почвы, загрязненной ПХБ (Нью-Йорк, США). Первоначально штамм идентифицировали как *Pseudomonas* sp., позже реклассифицировали – *Burkholderia* sp. Пути деградации бифенилов/ПХБ у штамма *B. xenovorans* LB400 были подробно изучены на молекулярно-генетическом уровне и стали модельными системами для исследования бактериальной деструкции стойких органических загрязнителей окружающей среды (Goris *et al.*, 2004).

Штамм *Pseudomonas furukawii* KF707 был выделен К. Furukawa и Т. Miyazaki (1986) с территории предприятия по производству бифенила/ПХБ в Японии. Этот штамм демонстрировал способность разлагать достаточно узкий диапазон изомеров ПХБ, однако его уникальность заключалась в способности к активной деструкции 4,4-ХБ, тогда как другие штаммы-деструкторы ПХБ способны к деградации этого соединения в значительно меньшей степени (Furukawa, 2000).

Штамм *Alcaligenes eutrophus* H850 был выделен и охарактеризован D.L. Bedard с соавторами (1987). Исследуемый штамм демонстрировал хороший рост на бифениле и 2-ХБ, а также осуществлял деструкцию многих конгенов ПХБ, таких как тетра-, пента- и гекса-ХБ. *A. eutrophus* H850 характеризовался двухступенчатым процессом метаболизма ПХБ: анаэробное дехлорирование с последующим окислением. Этот процесс, как правило, способствует эффективному разрушению многих изомеров ПХБ (преимущественно *ortho*-замещенных), входящих в состав промышленных смесей Aroclor 1242 и Aroclor 1254 (Bedard *et al.*, 1987).

Штамм *R. jostii* RHA1 был изолирован Е. Masai с соавторами (1995) из почвы, загрязненной инсектицидом (γ -гексахлоро-циклогексаном) в Японии.

Данный штамм проявлял деградационную активность по отношению к моно-, ди-, три-, тетра-, гекса- гептаХБ, как *орто*-, так и *пара*-замещенных изомеров ПХБ (Masai *et al.*, 1995).

В результате анализа литературных данных по разнообразию бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ было установлено, что доминирующими штаммами являются представители классов *Gamma*proteobacteria и *Actinobacteria*. Наиболее распространенными родами среди бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ считаются *Pseudomonas* и *Rhodococcus* (Kour *et al.*, 2019).

1.3.1. Грамположительные бактерии-деструкторы рода *Rhodococcus*

Бактерии рода *Rhodococcus* являются интересной и многообещающей в плане биотехнологии группой микроорганизмов: загрязненные участки почв, водоемов часто являются местами их естественного обитания; родококки присутствуют в экосистемах даже в условиях голодания; на разложение ими поллютантов не влияет наличие более доступных источников углерода. Клетки родококков гидрофобны благодаря алифатическим цепям миколовых кислот в клеточной стенке, что позволяет им разлагать гидрофобные поллютанты, осуществляя адгезию в интерфазе масло/вода. Некоторые штаммы родококков являются психрофильными, что очень существенно для биоремедиации в холодном климате (Соляникова и др., 2010). Представители рода *Rhodococcus* способны к деградации широкого спектра органических субстратов и, таким образом, играют ключевую роль в глобальном круговороте углерода (Warren *et al.*, 2004) (таблица 1). Среди бактерий этого рода встречаются активные деструкторы бифенила/ПХБ, наиболее изученными представителями (на всех уровнях организации: морфологическом, генетическом и биохимическом) являются *R. jostii* RHA1, *R. erythropolis* TA421 и TA431, *R. rhodochrous* K37, *R. globerulus* P6, *Rhodococcus* sp. HA99 и *Rhodococcus* sp. M5 (Asturias, Timmis, 1993; Kosono *et al.*, 1997; Labbe *et al.*, 1997; Taguchi *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2011).

Штамм *R. jostii* RHA1 характеризуется своей исключительной способностью к разложению ПХБ (Warren *et al.*, 2004). Так, технические смеси

Kaneclor 200, 300, 400 (включающие три-, тетра- и пентахлорбифенилы, соответственно) штамм *R. jostii* RHA1 утилизировал в течение трех суток (Furukawa, 2000). При деградации ПХБ происходило накопление промежуточных метаболитов: ди- и трихлорбензойных кислот, постепенное снижение концентрации этих соединений в присутствии *R. jostii* RHA1 указывало на способность штамма утилизировать хлорбензойные кислоты. Также *R. jostii* RHA1 проявлял активность по отношению к конгенерам ПХБ с замещенным хлором как в *орто*-, так и в *пара*-положении (Seto *et al.*, 1995). Было обнаружено, что данный штамм содержит, по меньшей мере, два набора генов, ответственных за деградацию ПХБ (Furukawa, 2000).

В 2000-х годах с территории нефтяного месторождения (Китай) был выделен штамм *Rhodococcus* sp. R04, осуществляющий деструкцию и дехлорирование ПХБ в аэробных условиях. Результаты исследования показали, что штамм *Rhodococcus* sp. R04 метаболизирует многие моно-, ди-, три- и тетра-хлорированные бифенилы. Кроме того, исследуемый штамм осуществлял деструкцию конгенов ПХБ с двойными заместителями хлора. Установлено, что в течение 5 дней штамм *Rhodococcus* sp. R04 разлагал 95 % конгенов ПХБ (в концентрации 500 мг/л), несущих хлор на обоих кольцах (Yang *et al.*, 2004).

Четыре бактериальных штамма, деградирующих бифенил, были изолированы из активного ила сточных вод (г. Сеул, Южная Корея) и отнесены к *Rhodococcus* sp. (SK-1, SK-3 и SK-4). В ходе исследования авторы проанализировали способность штаммов трансформировать бифенил при различных концентрациях (0,65, 1,3, 2,6, 3,9, 6,5 и 9,75 мМ). В частности, штамм *Rhodococcus* sp. SK-3 полностью утилизировал бифенил в диапазоне концентраций от 0,65 до 2,6 мМ в течение 120 часов, в то время как *Rhodococcus* sp. SK-1 и SK-4 обладали менее выраженными деструктивными характеристиками (Chang *et al.*, 2013).

1.3.2. Грамотрицательные бактерии-деструкторы рода *Pseudomonas*

Бактерии рода *Pseudomonas* встречаются во многих экологических нишах, благодаря универсальным метаболическим путям бактерии этого рода имеют высокий потенциал адаптаций к изменениям условий окружающей среды. Многие виды *Pseudomonas* были выделены из почв и донных отложений, загрязненных токсичными ароматическими соединениями (АС), в том числе бифенилом/ПХБ. Благодаря способности псевдомонад осуществлять биodeградацию АС эти бактерии вызывают повышенный интерес ученых, занимающихся исследованиями основ биохимической и генетической микробной деструкции (Suenaga *et al.*, 2017). В 1980-х годах из загрязненной почвы с территории завода по производству бифенила в Японии было выделено 14 штаммов-деструкторов ПХБ (штаммы KF) (Furukawa *et al.*, 1989). Данные штаммы принадлежали к различным видам *Pseudomonas* и демонстрировали активный бактериальный рост на ароматических соединениях (таблица 1).

Кластер генов *bph* (кодирующий путь разложения бифенила) обнаружен и исследован в таких штаммах как *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pseudomonas putida* KF715, *Pseudomonas toyotomiensis* KF710 (таблица 2). Секвенирование генома этих штаммов позволило идентифицировать генетические структуры, лежащие в основе уникального метаболического потенциала рода *Pseudomonas* (Watanabe *et al.*, 2015a; Suenaga *et al.*, 2017; Sandri *et al.*, 2017).

J. Shuai с группой ученых (2016) выделили 7 штаммов рода *Pseudomonas*, осуществляющих деструкцию бифенила. Для оценки деструктивной активности был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, результаты анализа показали, что уровень деградации бифенила (5 мг/л) на вторые сутки у штамма *Pseudomonas* sp. P6-245 был незначительным – 5,9 %, в то время как штамм *Pseudomonas* sp. P4-38 характеризовался высоким уровнем деструкции – 65,3 %. Через 4 дня бактериальные штаммы продемонстрировали максимальные деградационные возможности, так, штамм *Pseudomonas* sp. P9-324

утилизировал – 96,3 % бифенила, а штамм *Pseudomonas* sp. P4-38 – 83,6 % (Shuai *et al.*, 2016).

Штамм-деструктор *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 был выделен с территории, загрязненной отходами электрохимической промышленности (электростанция, Иран). Исследуемый штамм активно рос на коммерческих смесях Aroclor 1242 и Aroclor 1260, а также многих конгенерах ПХБ (в концентрации 200 мг/л): моноХБ (2-ХБ, 4-ХБ), диХБ (2,4-, 2,5-, 2,2'-, 4,4'-ХБ), триХБ (2,4,4'-ХБ), тетраХБ (2,2',5,5'-ХБ), гексаХБ (2,2',4,4',5,5'-ХБ). Авторы отмечают, что *P. aeruginosa* TMU56 осуществлял разложение 2,2',4,4',5,5'-гексаХБ (через 96 часов деструкция составляла – 58 %), следовательно, данный штамм является перспективным деструктором ПХБ (Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Загрязнение водных экосистем (хлор)бифенилами является не менее актуальной проблемой. Так, из донных отложений Бенгальского залива (Индийский океан) был выделен штамм *Pseudomonas aeruginosa* JP-11, осуществляющий утилизацию бифенила (98,86 % ± 2,29) в концентрации 200 мг/л в течение 72 часов (Chakraborty, Das, 2016).

Далеко не все бактерии, утилизирующие бифенил, обладают способностью к деградации ХБ, содержащих более одного заместителя хлора. Из загрязненной почвы африканского континента (Нигерия) был выделен штамм *Pseudomonas* sp.SA-6 способный расти не только на всех монохлорбифенилах, но также и на некоторых дихлорбифенилах (2,2'-, 2,3-, 2,4'-, 3,3'- и 3,5-диХБ). Исследуемый штамм демонстрировал активную деструкцию конгенов ПХБ, замещенных в *орто*-положении одного или обоих колец, довольно часто такие конгенеры выступают в качестве промежуточных продуктов при анаэробном дехлорировании. Присутствие в окружающей среде аэробных бактерий, предотвращающих накопление таких соединений, является важным условием для последовательных анаэробно-аэробных процессов биоремедиации (Adebusoye *et al.*, 2007, Adebusoye *et al.*, 2008).

Помимо молекулярно-генетических исследований бактерий рода *Pseudomonas* ученые в последние годы заинтересовались вопросом, как хемотаксис у бактерий повышает способность к биодеструкции различных органических загрязнителей, в том числе бифенила. Из донных отложений реки Эльбы (Германия), загрязненных ПХБ, был выделен штамм-деструктор *Pseudomonas* sp. В4. В ходе исследования было показано, что данный штамм осуществлял активное передвижение по градиенту повышения концентрации загрязняющего вещества, распознавая и реагируя на присутствие в среде бифенила и его хлорпроизводных, а также хлорбензоатов. Таким образом, можно сделать вывод, что *Pseudomonas* sp. В4 имеет более эффективную модель деградации бифенила/ПХБ по сравнению с неподвижными бактериальными штаммами-деструкторами (Gordillo *et al.*, 2007).

1.3.3. Деструкция бифенила/ПХБ в переменных условиях окружающей среды

Реакция бактерий на изменение окружающей среды является фундаментальным свойством живой клетки/организма. Благодаря эволюции микроорганизмы приобрели полезные механизмы для регулирования своих функций и процессов в ответ на изменения условий окружающей среды (Chávez *et al.*, 2006).

Бактерии-деструкторы, осуществляющие окисление бифенила и его хлорпроизводных, были выделены из различных экологических ниш: почв, донных отложений, сточных вод, пресных и соленых водоемов (Chang *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2014; Quero *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015), в том числе с различными климатическими характеристиками.

Бактериальная биоремедиация загрязненных объектов окружающей среды бифенилами и ПХБ **в климатических зонах с низкими температурными показателями** требует использования микроорганизмов, адаптированных к холоду (Lambo, Patel, 2006). В последнее десятилетие особое внимание уделяется психротолерантным бактериям, изолированным из отдаленных холодных

регионов (Арктика, Антарктика и др.) и осуществляющим деструкцию при пониженных температурах. ПХБ способны накапливаться в снежных покровах и на поверхности дрейфующих льдин, в результате, загрязняющие вещества переносятся на большие расстояния, таким образом, получая широкое распространение (Michaud *et al.*, 2007; Papale *et al.*, 2017). Группой ученых были выделены психротолератные морские бактерии из залива Терра-Нова (Антарктида), способные использовать ПХБ в качестве единственного источника углерода и энергии. В ходе исследования изоляты были отнесены к трем родам: *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* и *Arthrobacter*, охарактеризован их биодegradационный потенциал в отношении смеси Aroclor 1242 (100 мг/л). Штамм *Arthrobacter* sp. 74 показал высокую степень деструкции ПХБ (~ до 70 %) как при +4°C, так и при +15°C. В то время как у штамма *Pseudoalteromonas* sp. 19 деструкционная способность была выше при температуре +15°C (~ до 80 %), чем при +4°C (~ до 60 %). Штамм *Psychrobacter* sp. 15 не проявлял дегradационных свойств при температуре +4°C, но при +15°C обладал активностью по отношению к ПХБ (~ до 25 %). Высокими сходными деструкционными характеристиками (к ди-, три- и тетрахлорбифенилам), при +4°C, обладали штаммы *Pseudoalteromonas* sp. 19 и *Arthrobacter* sp. 74, в то время как пентахлорбифенилы разрушались только штаммом *Arthrobacter* sp. 74 (Michaud *et al.*, 2007). Штамм *Hydrogenophaga faeniospiralis* IA3-A, выделенный из почвы, загрязненной ПХБ (западная часть Ньюфаундленда, Канада), демонстрировал активный рост на различных ХБ при пониженной температуре; штамм осуществлял деструкцию ди- и трихлорбифенилов (2,3'-ХБ, 2,2',4-ХБ, 2,2',3-ХБ, 2,4',6-ХБ и 2,4,4'-ХБ) смеси Aroclor 1248 (10 мг/л) при температуре +5°C (Lambo, Patel, 2006).

Биоремедиация объектов окружающей среды, загрязненных бифенилами/ПХБ, **в климатических зонах с высокими температурными показателями** при помощи термофильных бактерий является перспективной стратегией. При повышенных температурах у некоторых загрязняющих соединений меняются химические свойства (например, увеличивается

растворимость), а у термофильных бактерий ферментные системы, ответственные за деструкцию поллютантов, характеризуются повышенной термостабильностью и активностью при таких условиях (Mukerjee-Dhar *et al.*, 2005). М. Shimura с соавторами (1999) выделили термофильный штамм *Geobacillus* sp. JF8, способный использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии при высокой температуре (+60°C). Штамм JF8 проявлял деградационную активность по отношению к некоторым пента-, тетра-, дихлорбифенилам (Shimura *et al.*, 1999). Термофильные бактерии-деструкторы СОЗ детально изучаются на биохимическом уровне. Так, J. Chakraborty с соавторами (2017) пришли к выводу, что термофильные бактерии являются потенциальными носителями новых, более стабильных (по сравнению с мезофильными бактериями) арил гидроксилующих диоксигеназ, содержащих кластер Риске (оксигеназы Риске), благодаря которым может осуществляться трансформация широкого спектра ароматических углеводов (Chakraborty *et al.*, 2017).

Антропогенные загрязнения окружающей среды, в ряде случаев, сопровождаются дополнительными негативными факторами, одним из которых является **засоление почв и водных систем**. Повышенное содержание солей (NaCl) более 1 % может привести к подавлению дыхания бактериальных клеток и/или плазмолизу. В связи с этим, имеются ограничения в использовании бактериально-биологических методов для ремедиации засоленных водоемов и почв. Поэтому важно выделять и исследовать бактерии, которые способны трансформировать бифенил и ПХБ в присутствии высоких концентраций NaCl. На данный момент описано лишь несколько аэробных штаммов, разрушающих ПХБ при концентрации хлорида натрия 0,05–3,5 % в окружающей среде (Chang *et al.*, 2013; Егорова и др., 2018). К числу бактериальных штаммов, осуществляющих деструкцию при повышенной концентрации NaCl, как правило, относятся морские бактерии. Так, штамм *Pseudomonas aeruginosa* CH07, изолированный из прибрежной зоны штата Гоа (Индия), является деструктором высокохлорированных конгенов ПХБ, таких как 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил и

2,2',3,4,4',5,5'-гептахлорбифенил (в концентрации 100 мг/л), полностью утилизируя исследуемые соединения в течение 40 часов при концентрации NaCl ~ 3,4 % (De *et al.*, 2006).

1.4. Молекулярно-биологические аспекты бактериальной деструкции бифенила и ПХБ

1.4.1. Метаболические пути и ключевые ферменты деструкции бифенила и ПХБ

В процессе метаболизма при анаэробных условиях ПХБ используются в качестве акцептора электронов, что приводит к потере атомов хлора; восстановительная дегалогеназа (RDase) считается ключевым ферментом, катализирующим дехлорирование ПХБ. При аэробных условиях бифенил и ПХБ выступают в качестве донора электронов, а бензольное кольцо подвергается оксигеназной атаке (Liang *et al.*, 2014).

Процессы деградации ПХБ активно изучались в последние десятилетия, начиная с первых исследований грамположительных бактерий, опубликованных в 70-х гг. D. Lunt, W.C. Evans (Lunt, Evans, 1970) и D. Catelani с соавторами (Catelani *et al.*, 1970) о способности бактерий микробного сообщества донных отложений реки Гудзон (США) метаболизировать ПХБ в анаэробных условиях. Анаэробное восстановительное дегалогенирование в сочетании с аэробной деградацией является естественным процессом, обеспечивающим детоксикацию и полную утилизацию ПХБ. Были описаны различные модели бактериального дехлорирования как в окружающей среде, так и в лабораторных условиях (Bedard, 2008). Известно, что хлорароматические соединения могут выступать в качестве альтернативного акцептора электронов при анаэробном дыхании (Pieper *et al.*, 2008). Дегалогенирование ПХБ микроорганизмами является перспективной стратегией очистки окружающей среды, но динамическое развитие в этом направлении затруднено из-за проблем, связанных с культивированием анаэробных бактерий.

Аэробное разложение бифенила и ПХБ бактериями осуществляется по общему, “верхнему пути” биодegradации, в процессе которого (хлор)бифенил расщепляется до пентадиеновой и (хлор)бензойной кислот (рисунок 2). В деструкции участвуют следующие ферменты: бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA), бифенил 2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа (BphB), 3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (BphC), 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (BphD).

Бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA) состоит из четырех субъединиц: BphA1, BphA2, BphA3 и BphA4. Реакция начинается с включения кислорода в молекулу субстрата в результате диоксигеназной атаки одного из ароматических колец. Первым метаболитом в результате двойного гидроксирования соседних *орто*- и *мета*-атомов углерода одного из колец бифенила, является бифенил 2,3-дигидродиол. Бифенил 2,3-дигидродиол окисляется бифенил 2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназой (BphB) в присутствии NAD⁺, как акцептора электронов, с образованием 2,3-дигидроксибифенила. На третьем этапе биодеструкции бифенила 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (BphC) осуществляет включение молекулярного кислорода по *орто*- и *мета*-углеродным атомам окисленного кольца, что приводит к расщеплению углерод-углеродной связи между ними. В результате данной реакции образуется 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота (ГОФДК). Конверсию ГОФДК до пентадиеновой и бензойной кислот катализирует 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (BphD), осуществляя разрыв углерод-углеродной связи между 6 и 7 углеродными атомами молекулы (Ohtsubo *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2011).

Бифенил 2,3-диоксигеназа может гидроксировать ароматическое кольцо как в положении 2,3, так и в положениях 3,4 и 5,6. В результате диоксигеназной атаки 2,5,2'-, 2,5,3'- и 2,5,2',5'-ХБ по 3 и 4 углеродным атомам образуются тупиковые продукты метаболизма, которые не трансформируются под

воздействием ферментных систем бифенильного пути деструкции (Haddock, Gibson, 1995).

Образовавшиеся в результате деструкции бифенила ферментами “верхнего пути” (хлор)бензойная и пентадиеновая кислоты далее трансформируются до продуктов основного обмена клетки. Конверсию 2-гидрокси-2,4-пентадиеновой кислоты до ацетил-КоА осуществляют три фермента: 2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза (BphE), 4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза (BphF) и ацетальдегид дегидрогеназа (BphG) (Ohtsubo *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2011).

1.4.1.1. Ферментные системы “верхнего пути”

Арил гидроксилирующие диоксигеназы Риске (ROs) катализируют *цис*-диоксигенирование арильных соединений, генерируя *цис*-дигидродиольные метаболиты. ROs являются активными катализаторами, осуществляющими окисление многих ароматических соединений (например, бензола, бифенила), а также гетероциклических ароматических соединений, таких как хинолин, дибензофуран и флавоноиды (Viger *et al.*, 2012).

Бифенил 2,3-диоксигеназа (БДО) (BphA1) относится к арилгидроксилирующим диоксигеназам кластера Риски и является ключевым ферментом, осуществляющим первую реакцию включения двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо молекулы бифенила/ПХБ, а также БДО отвечает за распознавание и связывание с субстратом (Pieper, 2005; Viger *et al.*, 2012).

БДО – мультикомпонентный фермент, состоящий из трех компонентов. Каталитический компонент (BphA) представляет собой гетерогексамер, состоящий из трех α - (BphA1) и трех β -субъединиц (BphA2), формой напоминающий грибок, с тремя α -субъединицами, образующими колпачок и тремя β -субъединицами, формирующими стержень. Ферредоксин (BphA3) и ферредоксинредуктаза (FAD-содержащая редуктаза, BphA4) участвуют в переносе электронов. BphA1 взаимодействует с субстратом, катализируя 2,3-дигидроксилирование, и состоит из двух доменов: каталитического (С-концевой домен) и домен Риске (N-концевой). Домен Риске, принимает

электроны от ферредоксина (FrdA3) и переносит их на центр моонуклеарного железа каталитического домена. Следует отметить, что расположение кластера Риске в значительном отдалении от каталитического железа не позволяет напрямую взаимодействовать двум доменам в пределах одной α -субъединицы (FrdA1), что в свою очередь затрудняет перенос электронов во время реакции. В результате перенос электронов осуществляется по другому пути от ферредоксина (FrdA3) к кластеру Риске одной из α -субъединиц, а затем к каталитическому железу другой α -субъединицы (Viger *et al.*, 2012; Sylvestre, 2013; Dhindwal *et al.*, 2016).

α -Субъединица (FrdA1), как правило, состоит из ~ 460 аминокислотных остатков (АКО). **Н-концевой домен** состоит из β -тяжей и петель и включает в себя железо-серный кластер Риске [2Fe-2S] (с 40 по 140 АКО). Два остатка гистидина и два цистеина координируют атомы железа и серы, входящие в этот кластер. **С-концевой домен** включает каталитический карман, в котором находится моонуклеарное железо, координированное двумя остатками гистидина (His-207 и His-212) и одним остатком аспарагиновой кислоты (Asp-360) (рисунок 3) (Zielinski *et al.*, 2002; Ferraro *et al.*, 2007; Шумкова, Плотникова, 2012).

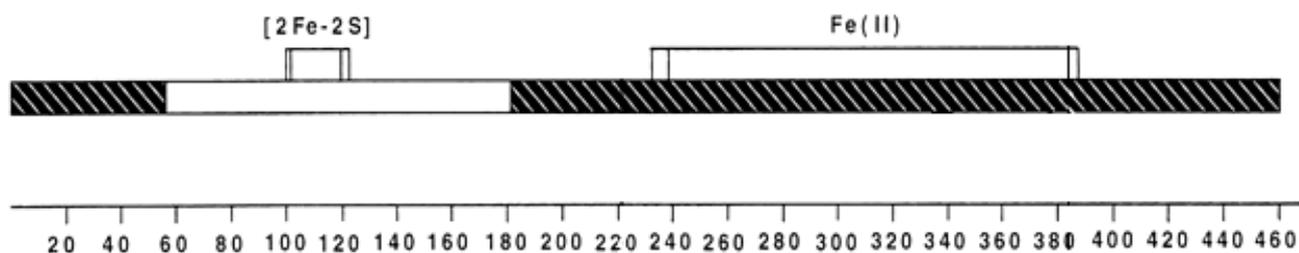


Рисунок 3 – Схема α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы *Burkholderia xenovorans* LB400. Короткие вертикальные линии, соединенные горизонтальной, показывают расположение лигандов железосерного кластера Риске и моонуклеарного железа активного центра, соответственно (Zielinski *et al.*, 2002; Шумкова, Плотникова, 2012).

Предполагается, что размер и конфигурация каталитического кармана напрямую влияет на диапазон субстратов, окисляемых ферментом, и на эффективность их взаимодействия, так как процесс гидроксирования зависит от того, насколько оптимально происходит фиксация субстрата в каталитическом кармане (Jakoncic *et al.*, 2007).

Изучение эволюции, структуры и функций активных центров бифенил 2,3-диоксигеназ осуществляется при помощи следующих молекулярно-генетических методов: направленный и случайный мутагенез, моделирование и конструирование гибридных диоксигеназ. Например, при помощи случайного мутагенеза, а также рекомбинации участков генов, установлено, что аминокислотная область III и IV в С-концевой части α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *B. xenovorans* LB400 участвует в распознавании субстрата и региоспецифичности для дихлорбифенилов (Barriault, Sylvestre, 2004; Vézina *et al.*, 2007). А замена аспарагиновой кислоты (Asn) на треониновую (Thr-376) вблизи мононуклеарного железа активного центра бактериального штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707, позволила расширить диапазон окисления и изменить региоспецифичность для изомеров ПХБ (Suenaga *et al.*, 2006).

Вторым этапом метаболического пути деструкции бифенила/ПХБ является дегидрирование (хлор)*цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидроксибифенила (бифенил 2,3-дигидродиола) с получением (хлор)2,3-дигидроксибифенила, при помощи фермента ***цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидроксибифенил дегидрогеназы (BphB)**. *Цис*-дигидродиол дегидрогеназы участвуют в различных деградационных путях АС, они относятся к семейству короткоцепочечных алкоголь дегидрогеназ, как правило, имеющих широкую субстратную специфичность и способных трансформировать некоторые субстраты *цис*-дигидродиола. Фермент *цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидроксибифенил дегидрогеназа штамма *B. xenovorans* LB400 участвует в реорганизации изофлавоноидов, полученных после дигидроксилирования бифенил 2,3-диоксигеназой, в результате образуются менее токсичные промежуточные продукты. Интересно, что бифенил 2,3-диоксигеназа

(BphA) штамма *B. xenovorans* LB400 катализирует диоксигенирование бифенил 2,3-дигидродиола (бифенилдиендиола) в неокисленном кольце с образованием бифенил-бис-диендиола (рисунок 4). Этот метаболит используется в качестве источника углерода для роста таких штаммов как *B. xenovorans* LB400 и *Pseudomonas* sp. B4.

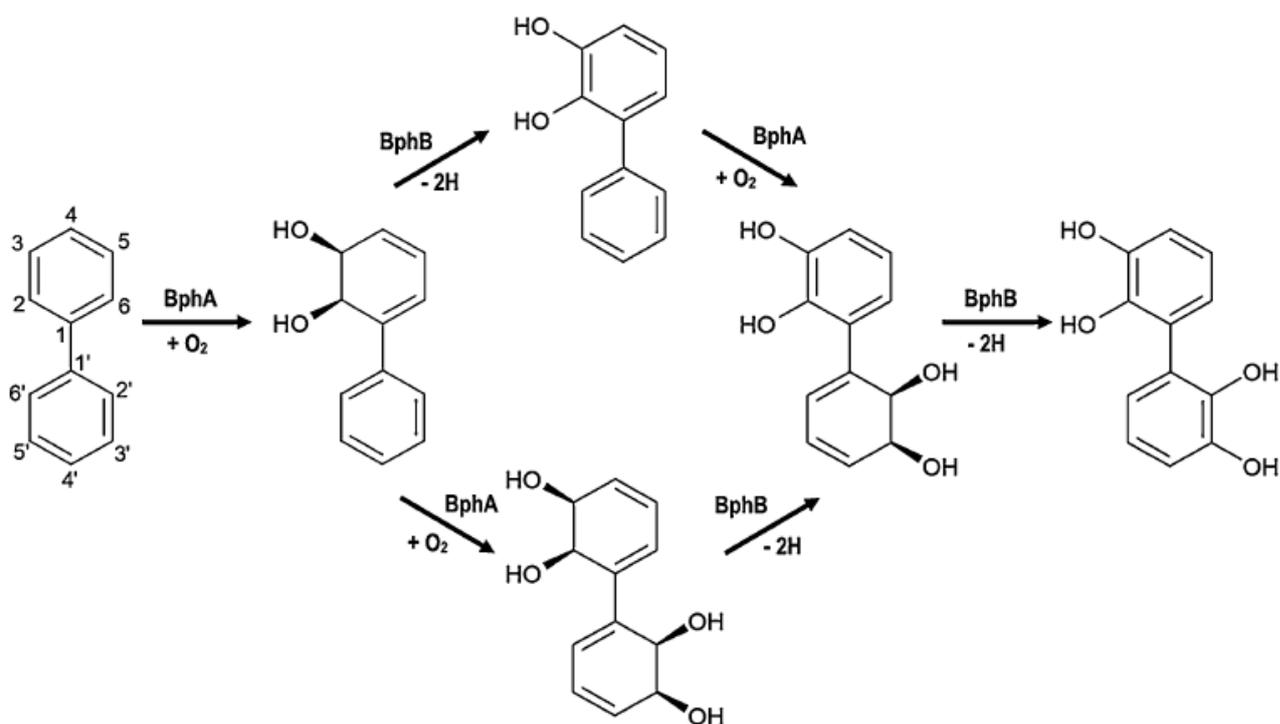


Рисунок 4 – Пути разложения бифенила до 2,3,2',3'-тетрагидроксибифенила (Agulló *et al.*, 2019).

Фермент BphV способен окислять оба кольца бифенил-бис-диендиола до 2,3,2'3'-тетрагидроксибифенила в два этапа. Кроме того, бифенил 2,3-диоксигеназа также окисляет 2,3-дигидроксибифенил до 2,3-дигидроксибифенил-4,6-диен-2,3'-диола, который далее трансформируется *цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидроксибифенил дегидрогеназой до 2,3,2',3'-тетрагидроксибифенила (Agulló *et al.*, 2019)

У штамма *B. xenovorans* LB400 был охарактеризован фермент BphV, в том числе определена кристаллическая структура никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) при помощи молекулярных замен. Несмотря на то, что BphV является

представителем семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз и по своему строению имеет сходство с другими ферментами данного семейства, в участке связанном с кофактором были идентифицированы различия. Результаты эксперимента показали, что субстрат связывается с гидрофобной щелью, расположенной вблизи NAD^+ , предполагая, что Asn143 является ключевым фактором субстратной специфичности (Furukawa, Fujihara, 2008).

В ферменте BphB штамма *Comamonas testosteroni* B-356, аминокислоты Ser142, Tyr155 и Lys159 выполняют функцию каталитической группы, как и в случае других представителей семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз. Фермент BphB показал для NAD^+ по отношению к $NADP^+$ более высокую константу специфичности K_{cat}/K_m (Furukawa, Fujihara, 2008).

2,3-Дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназы (BphC) участвуют в разложении бифенила/ПХБ и катализируют реакцию *meta*-расщепления 2,3-дигидроксибифенила. Разрыв кольца играет важную роль в разрушении ароматических соединений, поэтому 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа является ключевым ферментом для деградации (хлор)бифенилов, а ген *bphC* используется в качестве маркерного гена для оценки уровней загрязнения ПХБ (Gou *et al.*, 2012; Hashmi *et al.*, 2016).

Несмотря на то, что ферменты BphC разных бактерий отличаются по своей субстратной специфичности, как правило, они способны преобразовывать различные хлорзамещенные производные, за исключением субстратов, ингибирующих их действие: 3,4-дигидроксибифенилы, 2'-хлорзамещенные 2,3-дигидроксибифенилы и 3-хлоркатехол (Yang *et al.*, 2008; Agulló *et al.*, 2019). Особенностью экстрадиольных диоксигеназ является их чувствительность к ингибированию в результате окисления, например, 2'-хлорзамещенные 2,3-дигидроксибифенилы способствуют такой инактивации и, таким образом, мешают деградации других соединений (Agulló *et al.*, 2019).

Ранее проведенные исследования показали, что присутствие большого числа экстрадиольных диоксигеназ, по-видимому, является общим признаком для

штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus*. В штамме *R. jostii* RHA1 было обнаружено наличие четырех генов, кодирующих 2,3-дигидроксибифенил диоксигеназы, три из которых экспрессировались, когда штамм выращивали на бифениле. В общей сложности, семь *bphC*-генов были обнаружены у штамма *R. erythropolis* TA421, три найдены у *R. globerulus* P6, а штамм *Rhodococcus* sp. R04, использующий бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии, а также осуществляющий трансформацию многих конгенов ПХБ, содержал два гена *bphC* (Yang *et al.*, 2008).

“Верхний путь” разложения бифенила/ПХБ состоит из четырех ферментов, которые превращают бифенил и его хлорпроизводные в (хлор)бензойную кислоту и 2-гидроксипента-2,4-диеновую кислоту. Тем не менее, при трансформации некоторых конгенов ПХБ может происходить накопление промежуточных метаболитов, что в свою очередь, приводит к ингибированию ферментных систем пути разложения бифенила/ПХБ. Например, 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота (ГОФДК), хлорированная в положениях 3 и 4, ингибирует четвертый фермент – **2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролазу (BphD)** бактерий *B. xenovorans* LB400 и *R. globerulus* P6. BphD имеет признаки, характерные для надсемейства α/β -гидролаз и катализирует расщепление С-С-связи у 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновой кислоты, включая консервативную каталитическую триаду активного участка, состоящую из остатков аминокислот серина, гистидина и аспартата (Ser112-His265-Asp237) (Bhowmik *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2017). Результаты исследований штаммов *B. xenovorans* LB400 и *R. globerulus* P6 показали еще одну интересную закономерность, фермент 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза может быть специфичным при метаболизме определенных конгенов ПХБ, например, ГОФДК несущие в фенильной части заместители хлора трансформировались эффективнее, чем ГОФДК, несущие заместители хлора на диеноатном фрагменте (Agulló *et al.*, 2019).

Глутатион-S-трансфераза (BphK) – фермент, осуществляющий преобразование широкого диапазона электрофильных соединений в реакции, обычно включающей глутатион (γ -L-Glu-L-Cys-Gly).

BphK встречается в некоторых биохимических путях бактериальной деструкции бифенила/ПХБ. Показано, что BphK не имеет существенного значения для деградации бифенила, однако этот фермент может запустить процесс дегалогенирования 4-хлорбензоата, конечного продукта разложения ПХБ. Этот процесс осуществляется при помощи ферментной системы “BphA, BphB, BphC, BphD и BphK” и показывает, что глутатион-S-трансфераза дополняет *bph*-путь, приводя к облегчению процессов деградации ПХБ. Следует отметить, что 3-хлор-2-гидрокси-6-оксо-6-фенил-2,4-диеноаты, соединения, которые образуются при кометаболизме ПХБ (BphA, BphB и BphC), ингибируют работу фермента BphD, а также выступают в качестве приоритетного субстрата в сравнении с 4-хлорбензоатом для фермента BphK. Таким образом, BphK, вероятно, способствует повышению активности метаболизма ПХБ путем снижения ингибирования BphD хлорированными ГОФДК (Pieper, Seeger, 2008).

1.4.1.2. Ферментные системы “нижнего пути”

Метаболизм (хлор)бифенилов при помощи ферментов “верхнего *bph*-пути” приводит к образованию (хлор)2-гидроксипента-2,4-диеноатов и (хлор)бензоатов. 2-Гидрокси-2,4-пентадиеновая кислота трансформируется рядом ферментов: **2-гидроксипента-2,4-диеноат гидратазой (BphH(E))**, **4-гидрокси-2-оксовалерат-альдолазой (BphI(F))** и **ацетилированной ацетальдегидрогеназой (BphJ(G))** до нетоксичных продуктов обмена веществ (пируват и ацетил-КоА), затем ацетил-КоА может участвовать в цикле Кребса (рисунок 2). Альдолаза II-типа, BphI, образует с дегидрогеназой BphJ тетрамерный комплекс, направляя токсичные альдегиды по пути от BphI до BphJ (Agulló *et al.*, 2019). У таких активных штаммов-деструкторов ПХБ как *B. xenovorans* LB400 и *R. jostii* RNA были детально изучены ферментные системы, осуществляющие трансформацию 2-гидрокси-пента-2,4-диеноата (Pieper, Seeger, 2008). При гидролизе ГОФДК,

катализируемой ферментом VphD, образуются, помимо 2-гидрокси-пента-2,4-диеноата, (хлор)бензоаты. Бензоат является субстратом для широкого спектра бактерий классов *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, напротив, хлорированные бензоаты, как правило, представляют собой тупиковые продукты распада для бактериальной деградации ПХБ (Agulló *et al.*, 2019).

1.4.2. Геномы и генетические системы разложения бифенила/ПХБ активных бактерий-деструкторов

За долгие годы исследований накоплен большой объем данных о штаммах, разлагающих бифенил и его хлорированные производные. Наиболее перспективные, с точки зрения экологии и биотехнологии, штаммы-деструкторы бифенила/ПХБ изучаются на всех уровнях организации живого: физиологическом, биофизическом, биохимическом и генетическом. В начале XXI века стало возможным применение уникальных методов по определению нуклеотидного состава молекулы ДНК (расшифровка генома), что неизбежно привело к более детальному представлению об организации и функционировании геномов живых организмов, в том числе и штаммов-деструкторов (таблица 2). Высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS) – представляет собой процесс определения последовательности нуклеотидов в геномной ДНК или в совокупности информационных РНК (транскриптом) путем амплификации множества коротких участков генов. Это разнообразие генных фрагментов в итоге покрывает всю совокупность целевых генов, весь геном (или транскриптом как совокупность молекул РНК) (Бархатов и др., 2016).

В таблице 2 представлена информация о геномах активных штаммов-деструкторов бифенила и ПХБ. На основе имеющихся геномных данных нами проанализированы структуры (опероны, гены), детерминирующие разложение бифенила/ПХБ, у бактерий. Нельзя не отметить, что накопленный багаж фундаментальных знаний о бактериальных генетических структурах, ответственных за деструкцию ароматических соединений, в том числе бифенила/ПХБ, был получен в результате многочисленных исследований задолго

до появления работ по полногеномному секвенированию. Таким образом, на сегодняшний день, нам доступно проведение биоинформационного анализа, основанного на сравнение полученных результатов при секвенировании полных геномов и отдельных участков генома (генов, оперонов), кодирующих ферменты бактериальной деструкции.

Геном активного штамма-деструктора хлорированных бифенилов *R. jostii* RHA1 представляет собой набор из одной хромосомы и трех плазмид (pRHL1, pRHL2, pRHL3). *bph*-Гены ответственные за трансформацию бифенила/ПХБ расположены на плазмидах pRHL1 (CP000432.1) и pRHL2 (CP000433.1). Так, на плазмиде pRHL1 локализованы гены “верхнего пути” деградации бифенила в следующей последовательности: *bphA1* – *bphA2* – *bphA3* – *bphA4* – *bphC* – *bphB*. Характерной особенностью является отсутствие гена *bphD* (2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза) в *bph*-кластере плазмиды pRHL1 и наличие в pRHL2. Также следует отметить, что ген “верхнего *bph*-пути” *bphB* (бифенил 2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа), и гены “нижнего *bph*-пути”: *BphE* (2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза), *BphG* (ацетальдегид дегидрогеназа), *BphF* (4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза) имеют локализацию как на плазмиде pRHL1, так и на pRHL2.

Ранее из штамма *R. jostii* RHA1 E. Masai с соавторами (1995) выделили и изучили фрагмент размером 7,6 kb, несущий гены, кодирующие ферменты бифенильного пути *bphA1A2A3A4CB*. Таким образом, впервые удалось определить, что организация *bph*-оперона у штамма *R. jostii* RHA1 – *bphA1A2A3A4-bphC-bphB*, имеет отличия в последовательности генов при сравнении с другими известными бактериями-деструкторами бифенила/ПХБ – *bphA-bphB-bphC* (Masai *et al.*, 1995). Гены, кодирующие ферменты “нижнего пути” трансформации бифенила: *bphE1-bphF1-bphG* были клонированы и исследованы M. Sakai с соавторами в 2003 г.

Таблица 2 – Геномы активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ

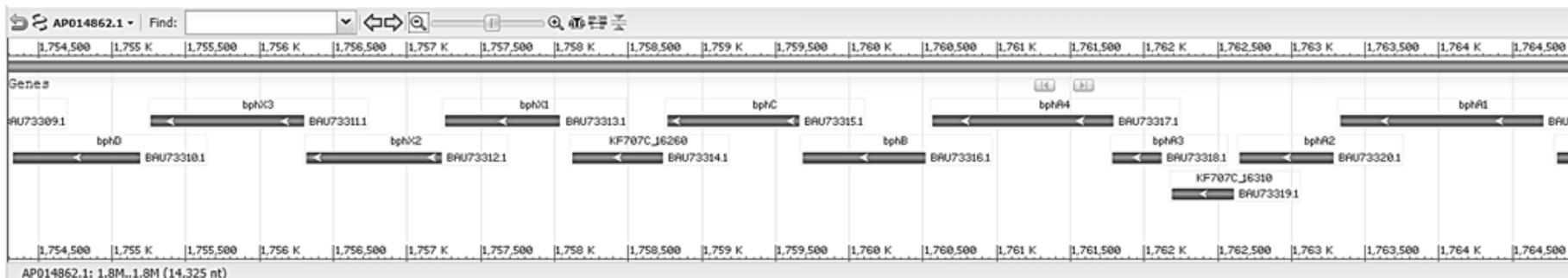
Штамм	Размер генома (Mb)	Кол-во генов	Кол-во белков	Генетические структуры	Размер (Mb)	Номер в GenBank	Ссылка
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	9,72711	9101	8416	Хромосома	7,8	CP000431.1	McLeod <i>et al.</i> , 2006; Takeda <i>et al.</i> , 2010
				Плазмида – pRHL1	1,12	CP000432.1	
				Плазмида – pRHL2	0,44	CP000433.1	
				Плазмида – pRHL3	0,33	CP000434.1	
<i>Pseudomonas putida</i> KF715	7,46769	7100	6734	Хромосома	6,58	AP015029.1	Suenaga <i>et al.</i> , 2017
				Плазмида – pKF715A	0,48	AP015030.1	
				Плазмида – pKF715B	0,28	AP015031.1	
				Плазмида – pKF715C	0,09	AP015032.1	
				Плазмида – pKF715D	0,03	AP015033.1	
<i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707	6,24295	5822	5662	Хромосома	6,18	AP014862.1	Kimura <i>et al.</i> , 2018; Triscari-Barberi <i>et al.</i> , 2012
				Плазмида – pKF707	0,06	AP014863.1	
<i>Geobacillus</i> sp. JF8	3,48631	3555	3283	Хромосома	3,45	CP006254.2	Shintani <i>et al.</i> , 2014
				Плазмида – pBt40	0,04	CP006255.1	
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	9,71704	8854	8346	Хромосома 1	4,9	CP000270.1	Daligault <i>et al.</i> , 2014; Chain <i>et al.</i> , 2006
				Хромосома 2	3,36	CP000271.1	
				Хромосома 3	1,47	CP000272.1	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Comamonas testosteroni</i> TK102 (= <i>Pseudomonas testosteroni</i> TK102)	6,0627	5609	5314	Хромосома	6,06	CP006704.1	Fukuda <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas alcaliphila</i> JAB1	5,34029	4969	4782	Хромосома	5,34	CP016162.1	Ridl <i>et al.</i> , 2018
<i>Acidovorax</i> sp. KKS102 (= <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102)	5,19693	4883	4667	Хромосома	5,2	CP003872.1	Ohtsubo <i>et al.</i> , 2012b
<i>Burkholderia</i> sp. SK-3 (= <i>Cupriavidus</i> sp. SK-3)	7,42915*	6524	6399	–	7,43	JFJV00000000.2	Vilo <i>et al.</i> , 2014
<i>Cupriavidus</i> sp. SK-4	7,72023*	6923	6725	–	7,72	JFJW00000000.1	Vilo <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> KF710	5,59672*	5270	5092	–	5,6	BBQO00000000.1	Watanabe <i>et al.</i> , 2015a
<i>Comamonas testosteroni</i> KF712 (= <i>Pseudomonas testosteroni</i> KF712)	5,89032*	5596	5341	–	5,89	BBQO00000000.1	Hirose <i>et al.</i> , 2015
<i>Rodococcus ruber</i> P25	5,72725*	5284	5107	–	5,73	LDUF00000000.1	Shumkova <i>et al.</i> , 2015
<i>Dyella ginsengisoli</i> LA-4	4,54686*	4144	4018	–	4,55	AMSF00000000.1	Kong <i>et al.</i> , 2013

Примечание: * – общая длина контигов.

1



2



Рисунок 5 – *bph*-Опероны активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1 – штамм *Pseudomonas furukawaii* KF707 (AP014862.1); 2 – штамм *Burkholderia xenovorans* LB400 (CP000272.1).

В результате показано, что порядок генов *bphG-bphF1-bphE1* у штамма *R. jostii* RHA1 также является нехарактерным для многих *bph*-кластеров грамотрицательных и грамположительных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ – *bphE-bphG-bphF*. Также, в ходе эксперимента было выявлено, что сайт инициации транскрипции находится внутри гена *bphR*, который расположен после *bphG* (рисунок 8). А наличие вставки, осуществляющей инактивацию генов, кодирующих “нижний путь” деградации бифенила (*bphE1*, *bphF1* и *bphG*) приводит к потере соответствующей активности ферментов и, как следствие, к уменьшению бактериального роста на бифениле (Sakai *et al.*, 2003).

Геном штамма *B. xenovorans* LB400 представлен тремя хромосомами. *bph*-Оперон расположен на небольшой (1,47 Mb) хромосоме (CP000272.1) и имеет следующую последовательность *bph*-генов: *bphA1* (1,3 kb) – *bphA2* (0,6 kb) – *bphA3* (0,3 kb) – *bphA4* (1,2 kb) – *bphB* (0,8 kb) – *bphC* (0,8 kb) – *bphK* (0,6 kb) – *bphH* (0,7 kb) – *bphJ* (0,9 kb) – *bphI* (1 kb) – *bphD* (0,8 kb) (рисунок 5). Гены *bphK* (глутатион-S-трансфераза), *bphH* (2-гидроксипента-2,4-диеноат гидратаза), *bphJ* (ацетальдегид дегидрогеназа) и *bphI* (4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза) расположены между генами *bphC* (3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа) и *bphD* (2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза) (рисунок 5).

Ранее F. Beltrametti с соавторами (2001) методом клонирования исследовали бифенильные гены штамма *B. xenovorans* LB400 и описали характерную особенность организации *bph*-оперона, а именно, наличие генов, кодирующих ферменты “нижнего *bph*-пути” (*bphKHJ*) между генами “верхнего *bph*-пути” *bphC* и *bphD* (рисунок 8). Анализ результатов Northern blot-гибридизации исследуемого генного кластера показал, что транскрипция всех генов, кодирующих бифенильные катаболические ферменты, запускалась в присутствии бифенила, сукцината или их смесей (Beltrametti *et al.*, 2001). Следует отметить, что помимо *bph*-генов в геноме штамма *B. xenovorans* LB400 на хромосомах 1 и 2 встречаются гены, кодирующие диоксигеназы (ДО) других ароматических

соединений: бензол 1,2-ДО, фталат 4,5-ДО, катехол 1,2-ДО, 2-аминофенол 1,6-ДО, 3-хлоркатехол 1,2-ДО, 4-гидрокси-фенилпируват-ДО, *орто*-галобензоат 1,2-ДО и другие.

Штамм *Acidovorax* sp. KKS102 (ранее *Pseudomonas* sp.) характеризуется наличием одной хромосомы (CP003872.1) размером 5,2 Мб и отсутствием плазмид. *bph*-Кластер имеет следующую организацию (последовательность генов): *bphE* – *bphG* – *bphF* – *bphA1* – *bphA2* – *bphA3* – *bphB* – *bphC* – *bphD* – *bphA4*. Так гены, кодирующие ферменты “нижнего *bph*-пути”: *bphE* (2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза), *bphG* (ацетальдегид дегидрогеназа) и *bphF* (4-гидрокси-2-оксвалерат альдолаза) предшествуют генам, кодирующим ферменты “верхнего *bph*-пути” деградации. Кроме того, ген, кодирующий одну из субъединиц бифенил диоксигеназы (ферредоксин редуктазу) – *bphA4*, расположен в конце кластера и отделен от генов, кодирующих другие субъединицы – *bphA1A2A3* генами “верхнего *bph*-пути” *bphBCD*. Данные полногеномного секвенирования подтверждают результаты ранее проведенных исследований по изучению *bph*-оперона штамма *Acidovorax* sp. KKS102 (*bphEGF* (*ORF4*) *A1A2A3BCD* (*ORF1*) *A4*) (Kikuchi *et al.*, 1994; Ohtsubo *et al.*, 2001; Pieper, 2005; Ohtsubo *et al.*, 2012a) (рисунок 8).

Результаты полногеномного секвенирования активного деструктора ПХБ *P. putida* KF715 показали наличие в клетках штамма четырех плазмид (pKF715A, pKF715B, pKF715C, pKF715D), несущих гены, ответственные за разложение органических поллютантов (Pori *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2017). Так, плазида pKF715A (AP015030.1) содержит гены, кодирующие ферменты “верхнего” и “нижнего” путей разложение бифенила и ПХБ, а также гены, кодирующие катехол 2,3-диоксигеназу, толуол 1,2-диоксигеназу и бензоат 1,2-диоксигеназу. Организация *bph*-генов стандартная: от *bphA1* к *bphD*, количество пар нуклеотидов *bphA1* составляет 1,377.

Анализ полного генома штамма *P. furukawii* KF707 показал, что гены ответственные за деградацию бифенила и ПХБ расположены в хромосоме (AP014862.1), а не в плазмиде, как у штамма *P. putida* KF715, плазида pKF707

преимущественно характеризуется наличием генов, кодирующих различные трансферазы. Организация *bph*-оперона штамма *P. furukawaii* KF707 имеет отличительные особенности от *P. putida* KF715, у которого *bph*-гены расположены в заданном порядке (друг за другом): *bphA1* – *bphD*, в то время как у штамма *P. furukawaii* KF707 гены “нижнего *bph*-пути”: *bphX1* (2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза), *bphX2* (ацетальдегид дегидрогеназа) и *bphX3* (4-гидрокси-2-оксвалерат альдолаза) локализованы между *bphC* и *bphD* генами (рисунок 5).

J. Hirose с соавторами (2019) просеквенировали геномы 10 штаммов-деструкторов, выделенных из загрязненной ПХБ почвы (Япония): *Pseudomonas putida* KF715 (7 467 690 п.н.); *P. furukawaii* KF707 (6 242 950 п.н.); *P. abietaniphila* KF701, (6 886 250 п.н.); *P. aeruginosa* KF702, (7 167 540 п.н.); *P. putida* KF703 (6 434 897 п.н.); *P. toyotomiensis* KF710 (5 596 721 п.н.); *P. stutzeri* KF716 (4 188 013 п.н.); *Cupriavidus basilensis* KF708 (7 826 077 п.н.); *C. pauculus* KF709 (6 826 799 п.н.); *Comamonas testosteroni* KF712 (5 890 323 п.н.). В ходе биоинформационного анализа *bph*-кластеры исследуемых штаммов были отнесены к 4 типам (рисунок 6; рисунок 7).

Результаты исследования показали, что штаммы KF, принадлежащие к I и II типам, обладали сходством с точки зрения организации генов и составу нуклеотидных последовательностей, за исключением того, что *bphX*-область (гены *bphX0*, *bphX1*, *bphX2* и *bphX3*) отсутствовала в *bph* кластере у штаммов II типа. В *bph* кластере III типа не был идентифицирован ген *bphX0*, кодирующий фермент глутатион-S-трансферазу при сравнении с I и II-типами. К IV типу были отнесены бактерии *C. basilensis* KF708 и *C. testosteroni* KF712, *bph* кластеры данных штаммов были локализованы на интегративных конъюгативных элементах (ICEs). ICE штамма *C. basilensis* KF708 был почти идентичен ICE – 4677 (*Acidovorax* sp. KKS102), за исключением некоторых различий в нуклеотидных заменах, можно предположить, что данные генетические элементы способны передаваться между родами *Cupriavidus* и *Acidovorax* (Hirose *et al.*, 2019).

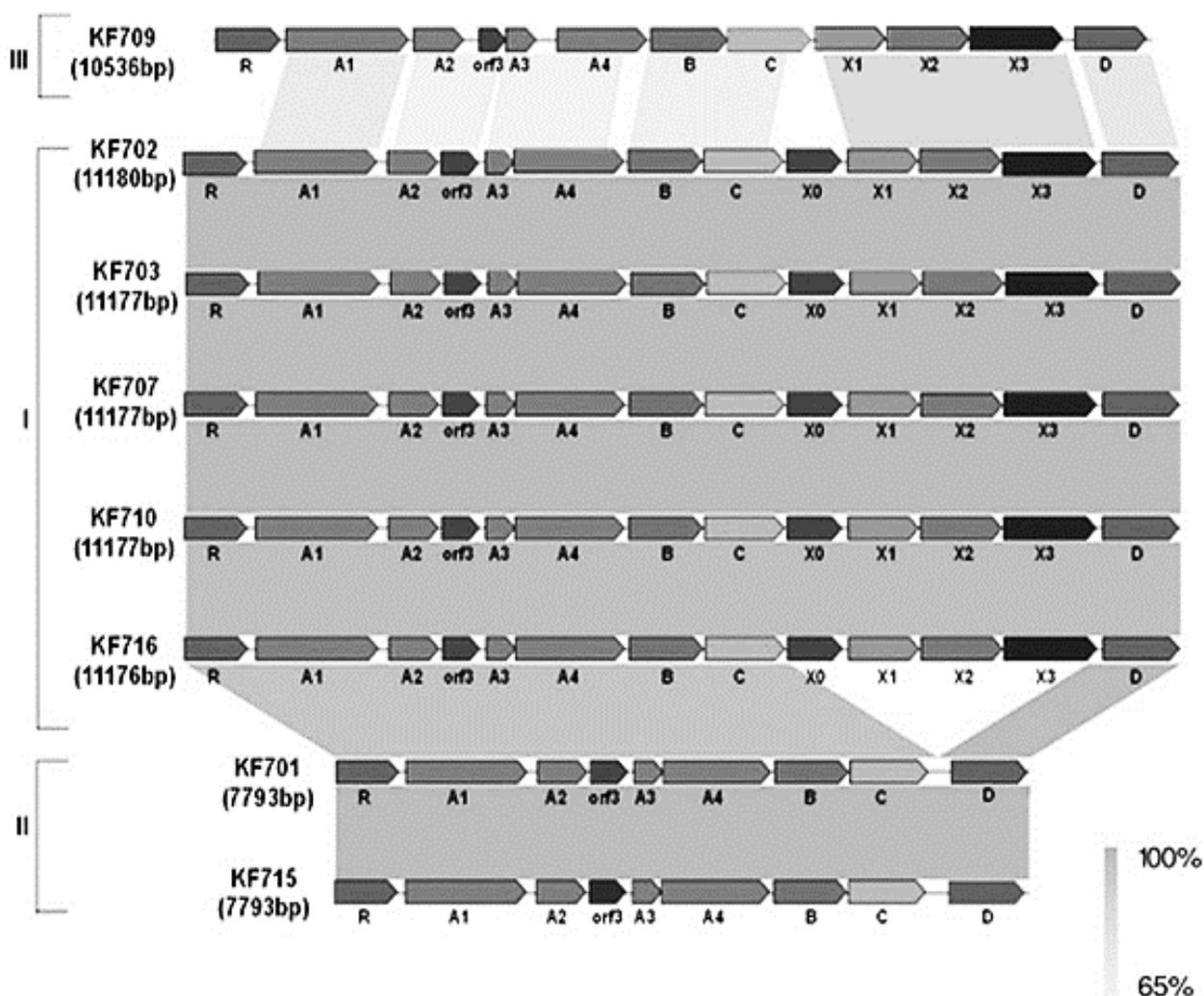


Рисунок 6 – Сравнение кластеров *bph*-генов штаммов KF (I-III типа). R – *BphR* (регулятор транскрипции); A1 – *bphA1* (большая субъединица терминальной диоксигеназы); A2 – *bphA2* (малая субъединица терминальной диоксигеназы); A3 – *bphA3* (ферредоксин); A4 – *bphA4* (ферредоксин редуктаза); B – *bphB* (бифенил 2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа); C – *BphC* (3-дигидроксифенил 1,2-диоксигеназа); D – *bphD* (2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза); X0 – *bphX0* (глутатион-S-трансфераза), X1 – *bphX1* (2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза); X2 – *bphX2* (ацетальдегид дегидрогеназа); X3 – *bphX3* (4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза) (Hirose *et al.*, 2019).

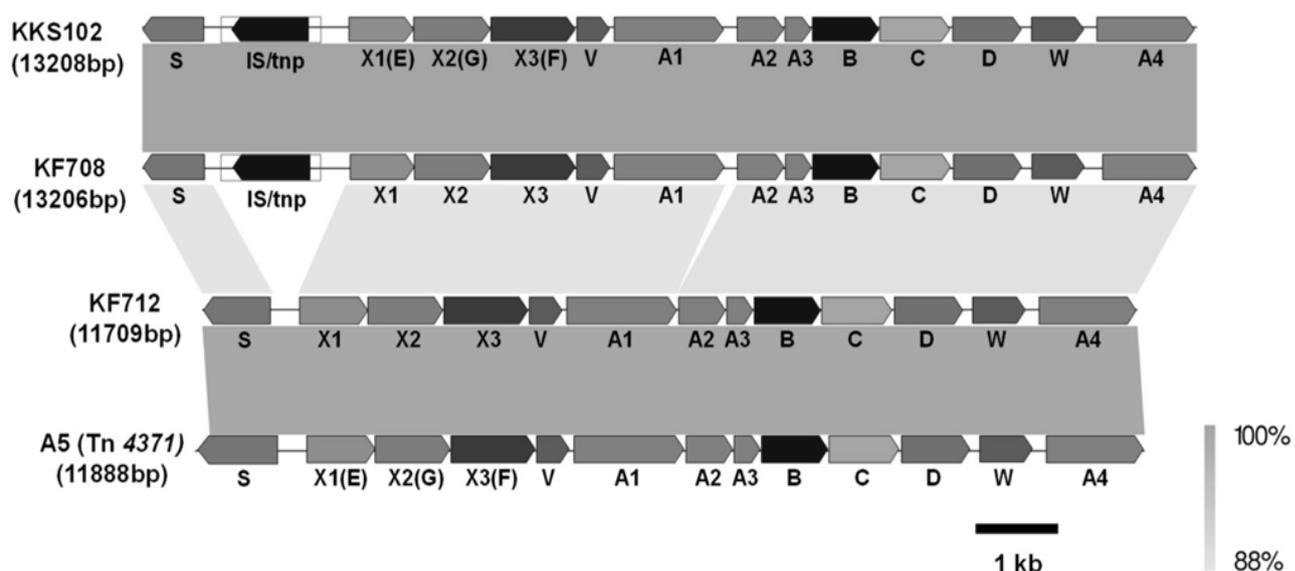


Рисунок 7 – Сравнение кластеров *bph*-генов штаммов *Cupriavidus basilensis* KF708 и *Comamonas testosteroni* KF712 (IV тип). E – *bphE* (2-гидрокси-2,4-пентадиеноат гидратаза); F – *bphF* (4-гидрокси-2-оксвалерат альдолаза); G – *bphG* (ацетальдегид дегидрогеназа); S – *BphS* (регулятор транскрипции – репрессор); V/W – *BphV/bphW* (не идентифицированные гены); IS – инсерционная последовательность; *tnp* – транспозаза. Гены *bphE*, *bphF* и *bphG* (KKS102/*Tn4371*) гомологичны генам *bphX1*, *bphX2* и *bphX3* (KF708/KF712), соответственно (Hirose *et al.*, 2019).

Интегративный конъюгативный элемент штамма *C. testosteroni* KF712 имел высокий процент сходства с транспозоном *Tn4371* бактерии *Cupriavidus oxalacticus* A5. Таким образом, кластеры *bph*-генов, локализованные на интегративных конъюгативных элементах, принимающих участие в горизонтальном переносе генетической информации, способны передаваться как внутри бактериального вида, так и между родами. Анализируя полученные результаты по *bph* кластерам исследуемых штаммов KF, можно сделать вывод, что даже в пределах одного микробного сообщества присутствуют различные типы *bph* генов (Hirose *et al.*, 2019).

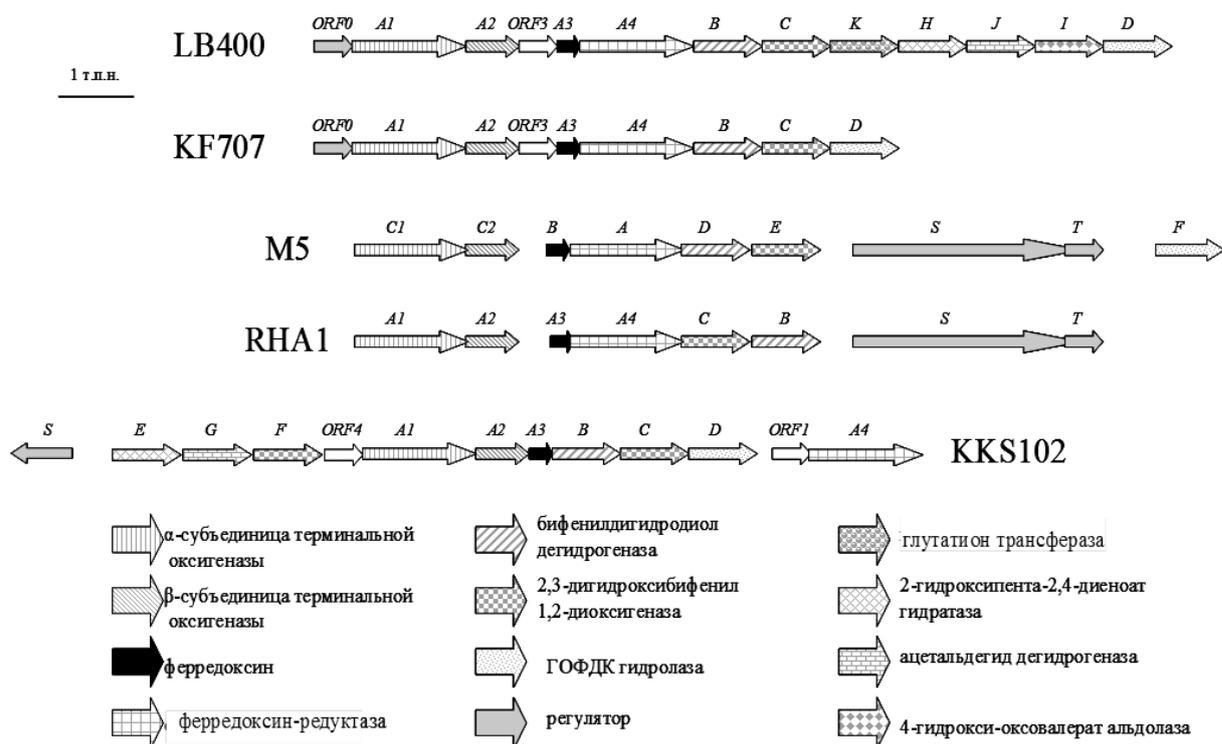


Рисунок 8 – Организация *bph*-оперонов у бактерий: *B. xenovorans* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707, *Rhodococcus* sp. M5, *Rhodococcus* sp. RHA1, *Acidovorax* sp. KKS102 (Шумкова, 2009).

Мобильные генетические элементы бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ. Высокая гомология структуры *bph*-оперонов у ряда бактерий-деструкторов бифенила указывает на то, что они имеют общего предка. Как правило, распространение *bph*-генов осуществляется при помощи механизмов горизонтального переноса (Springael *et al.*, 2001; Pieper, 2005). Бактериальный горизонтальный перенос генов играет ключевую роль в приобретении новых полезных фенотипических признаков, помогающих клеткам-хозяевам адаптироваться к окружающей среде. Особый интерес представляют мобильные генетические элементы, осуществляющие перенос генов деградации ксенобиотических соединений. Такие элементы способствуют распространению генетической информации, позволяющей клетке-хозяину разрушать стойкие

органические загрязнители (Ohtsubo *et al.*, 2012a). Наблюдаемые различия *bph*-кластерной организации между бактериальными штаммами (перестановка, инсерция, делеция генов и др.) подтверждают наличие эволюционных процессов (Springael *et al.*, 2001; Pieper, 2005).

Из генома штамма *Ralstonia eutropha* A5 был изолирован и изучен **катаболический транспозон *Tn4371*** (55 т.п.н.), который включал в себя гены деструкции бифенила/4-хлорбифенила, сгруппированные в кластер *bphEFGA1A2A3BCDA4* (13 т.п.н.). Гены “нижнего *bph*-пути” *bphE*, *bphG* и *bphF* расположены перед генами “верхнего *bph*-пути” *bphA1*, *A2*, *A3*, *B*, *C*, *DA4*. Что касается регуляторных генов *bphR* и *bphS*, то они локализованы по краям от *bphE* и *bphA4* (рисунок 9) (Mouz *et al.*, 1999). Перенос элемента *Tn4371* от одной бактериальной клетки к другой происходит только после инсерции элемента в плазмиду с широким кругом хозяев (Pieper, 2005).

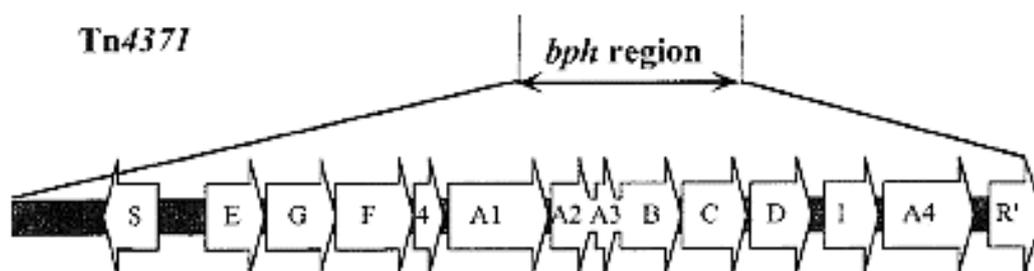


Рисунок 9 – Транспозон *Tn4371*, несущий гены деструкции бифенила/4-хлорбифенила, выделенный из генома *Ralstonia eutropha* A5 (Mouz *et al.*, 1999).

У многих бактерий, способных утилизировать химические соединения, происходит процесс регуляции транскрипции генов, участвующих в процессе деградации. В большинстве случаев гены, кодирующие регуляторную часть, расположены вблизи структурных генов, а их белковые продукты активируют транскрипцию в присутствии индуктора. Регуляция генов, участвующих в катаболизме ароматических соединений, как правило, не зависит от белковых

репрессоров, однако экспрессия *bph*-генов на транспозоне *Tn 4371* подвергается репрессии ферментом *BphS*. Транскрипция оперона зависит от *pE* промотора, расположенного после гена *bphE*, и контролируется продуктом экспрессии гена *bphS*, который локализован за *bphE* и отделен от этого гена инсерционной последовательностью (вставкой). Экспрессия *bph*-генов осуществляется в присутствии бифенила, а также в качестве индуктора может выступать ГОФДК – промежуточный метаболит деградационного пути бифенила (Ohtsubo *et al.*, 2001; Ohtsubo *et al.*, 2003).

Способность штаммов-деструкторов к деградации разнообразных ксенобиотиков характеризуется наличием в бактериальных клетках **катаболических плазмид**. Эти внехромосомные генетические структуры наиболее часто встречаются в геномах бактерий, получивших широкое распространение в средах с повышенным уровнем загрязнения. Плазмиды играют ключевую роль в эволюции метаболических путей бактериальных популяций, они не только обеспечивают удвоение генетической информации и возможность для накопления мутационных изменений, но также являются важным элементом горизонтального переноса генов.

Первые сообщения об участии плазмид в метаболизме ПХБ встречаются с 70-х гг. Плазмида pAC27 (97,5 т.п.н.) была выделена из бактериального штамма *Klebsiella pneumoniae* и включала в себя гены, ответственные за трансформацию 4-хлорбифенила до 4-хлорбензоата. В то же время, К. Furukawa и А.М. Chakrabarty изолировали плазмиды размером ~ 53 т.п.н. из штаммов *Arthrobacter* sp. M5 и *Rhodococcus globerulus* P6, авторы доказали, что наличие плазмид в исследуемых бактериях коррелируется с процессом метаболизма 4-хлорбифенила до 4-хлорбензоата. Имеются литературные данные о штаммах деструкторах ПХБ, характеризующихся наличием двух плазмид, например, *Archromobacter* sp. B-218 (плазмиды 76 т.п.н. и 16 т.п.н.) (Pori *et al.*, 2015).

Линейные плазмиды были описаны как у грамположительных бактерий, так и у грамотрицательных. Первый тип линейных элементов характеризуется наличием инвертированных повторов на обоих концах (у представителей

актиномицетов, бактериофагов и вирусов). Второй тип линейных плазмид имеет ковалентно замкнутые концевые области (например, представители рода *Borrelia*) (Hinnebusch *et al.*, 1990). Впервые линейные плазмиды были описаны у *Streptomyces* sp., а также обнаружены у бактерий родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium*. Штамм *R. jostii* RHA1 содержит три линейные плазмиды с инвертированными повторами в концевых областях: pRHL1, pRHL2, и pRHL3. Гены ответственные за деструкцию бифенила/ПХБ расположены в непосредственной близости от участка, кодирующего фермент транспозазу, что свидетельствует о возможных процессах горизонтального переноса генов (Shimizu *et al.*, 2001).

Способность к горизонтальному переносу генов была обнаружена у штамма *Rhodococcus* sp. DK17, который содержит плазмиду pDK2 (330 т.п.н.), по своим характеристикам этот линейный элемент идентичен плазмиде pRHL2 штамма *R. jostii* RHA1. Таким образом, считается, что линейные плазмиды играют ключевую роль в распространении генов биодegradации среди штаммов рода *Rhodococcus* (Shimizu *et al.*, 2001).

1.4.3. Разнообразие генов (*bphA*-генов), детерминирующих начальный этап разложения бифенила/ПХБ

Одной из главных задач экологических исследований является понимание взаимосвязи между разнообразием, а также функционированием ключевых генов деструкции и процессами биоремедиации, происходящими в окружающей среде (Iwai *et al.*, 2010). Бифенил 2,3-диоксигеназы, кодируемые *bphA*-генами, инициируют окисление бифенила и ПХБ, определяя возможный диапазон загрязняющих веществ, метаболизируемых бактериями-деструкторами. Увеличение разнообразия *bphA* генов в микробных сообществах загрязненных экосистем может позволить катаболизировать более широкий спектр конгенов ПХБ, что в свою очередь приведет к более высокому качеству очистки окружающей среды. α -Субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*-ген), обеспечивает субстратную специфичность благодаря связыванию с различными изомерами ПХБ, а также некоторыми другими ароматическими углеводородами.

Таким образом, мутации в нуклеотидной последовательности *bphA1*-гена, особенно в сайте связывания субстрата, может привести к заметным сдвигам субстратной специфичности, что облегчает деструкцию значительно большего количества конгенов ПХБ. Продолжительное воздействие загрязняющих веществ (в том числе, ПХБ и полициклических ароматических углеводородов) на окружающую среду играет важную роль в эволюции *bphA*-генов, характеризующихся высоким уровнем разнообразия нуклеотидных последовательностей. Филогенетический анализ *bphA*-генов и трехмерный структурный анализ белковых областей, ответственных за распознавание и связывание субстратов ПХБ, подтвердили модулирующее воздействие исследуемых загрязняющих веществ на эволюцию генов (*bphA*). Следовательно, можно сделать вывод, что высокие концентрации антропогенных загрязнителей окружающей среды выступают в качестве селективного давления для увеличения разнообразия последовательностей *bphA*-генов, изменяя потенциал микробных сообществ, повышая деструктивные свойства (Hoostal, Bouzat, 2016).

Многочисленные исследования, основанные на детекции *bphA1*-генов в окружающей среде (почве, воде, донных отложениях, сточных водах и др.) и последующее определение их нуклеотидных последовательностей (в том числе, с использованием новых технологий секвенирования) показали многообразие α -субъединиц бифенил 2,3-диоксигеназ (БДО) в природных экосистемах. Следует отметить, что разнообразие *bphA1*-генов культивируемых бактерий-деструкторов составляет малую часть по сравнению с количеством *bphA1*-генов в метагеноме природного микробного сообщества, в состав которого входят также некультивируемые бактерии (Iwai *et al.*, 2010; Standfuß-Gabisch *et al.*, 2012).

Исследовательская группа во главе с А.Р. Luz (2004) провела скрининг *bphA1*-генов в двух характерно отличающихся друг от друга географических регионах: Антарктике (16 образцов почв) и Бразилии (13 образцов почв). В ходе эксперимента были использованы следующие методы: ПЦР и гибридизации с применением меченного ДНК-зонда. Методом ПЦР с матриц ДНК, выделенных из почв, которые подвергались загрязнению дизельным топливом (Антарктика),

были детектированы ПЦР фрагменты (*bphA1*) ожидаемой длины (830 п.н.) у подавляющего количества образцов (81 %) (данные результаты подтверждены методом гибридизации). В результате амплификации *bphA1*-генов с тотальных ДНК почв, полученных с территории хранения промышленных отходов, в том числе и ПХБ (Бразилия), искомый ПЦР фрагмент был обнаружен во многих образцах. Но следует обратить внимание, что только у 23 % была осуществлена гибридизация (с меченым зондом), что указывает на относительно низкую гомологию амплифицированных фрагментов с *bphA1*. Используемые в этом исследовании праймеры и зонды позволили обнаружить генотипическое разнообразие и распределение *bphA1*-генов в техногеннозагрязненных экосистемах. Авторы предположили, что за деградацию углеводородов нефти (Антарктика) и хлорорганических загрязнителей (Бразилия) отвечают *bphA1*-гены, негомологичные по своей структуре (Luz *et al.*, 2004).

D. Garrido-Sanz с соавторами (2018) изучали бактериальное сообщество почвы, отобранной с загрязненной территории бензоколонки (Мадрид, Испания). Для идентификации метаболических путей, участвующих в деградации бифенила, ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, использовался в качестве маркера, присутствующего в исследуемом метагеноме. В ходе эксперимента были идентифицированы три типа *bphA1*-генов, принадлежащих к роду *Rhodococcus* (Garrido-Sanz *et al.*, 2018).

Для исследования генетического разнообразия генов, кодирующих бифенил диоксигеназы (*bphA*), микробного сообщества донных отложений реки Raisin (Мичиган, США) был использован метод стабильного изотопного зондирования ДНК. В процессе анализа библиотеки ПЦР-фрагментов было обнаружено два типа последовательностей *bphA*-генов, имеющих наибольшее сходство с генами известных активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ *C. testosteroni* В-356 и *R. jostii* RHA1 (Sul *et al.*, 2009).

При помощи метода стабильного изотопного зондирования ДНК L. Jiang с группой ученых (2018) идентифицировали активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ в почве, загрязненной отходами электронной промышленности.

А также успешно амплифицировали один из ключевых функциональных генов – *bphA*, участвующий в разложении бифенила/ПХБ. В ходе исследования был обнаружен только один *bphA*-ген, который имел высокий процент сходства (98 %) с последовательностями известных генов бактерий родов *Comamonas* и *Acidovorax*. Разнообразие *bphA* генов в исследуемом почвенном сообществе оказалось довольно низким, это можно объяснить использованием специфичных праймеров к гену *bphA* (Jiang *et al.*, 2018).

В настоящее время, накоплен большой объем информации по *bphA1*-генам. С помощью метода секвенирования расшифрованы многие последовательности *bphA1*-генов чистых культур бактериальных штаммов, например, у штамма *R. jostii* RHA1 размер нуклеотидной последовательности *bphA1*-гена составил – 1,383 п.н. (NC_008269.1). У активного штамма-деструктора *B. xenovorans* LB400 – 1,380 п.н. (CP000272.1). Полногеномное секвенирование активных бактерий деструкторов бифенила/ПХБ позволяет анализировать не только функционирование всего генома в целом, но и уделять внимание отдельным кластерам генов (например, *bph*-кластер), и в частности ключевым генам деструкции *bphA1* (таблица 2).

Известно, что бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ, содержащие в своем геноме функциональный биодegradационный ген *bphA1*, имеют широкое распространение и встречаются во многих техногеннозагрязненных экотопах (Agulló *et al.*, 2019). Детекция *bphA1* используется для оценки процессов бактериальной деструкции, кроме того, разнообразие этого гена, а также его филогенетические характеристики, исследуют с целью выявления потенциальных биоремедиационных ресурсов для создания перспективных механизмов трансформации бифенила/ПХБ, а подробное изучение последовательностей и структур *bph*-оперонов помогает разобраться в связях между функциональными генами и расширить понимание эволюционных процессов (Jiang *et al.*, 2018).

1.4.4. Биоремедиация окружающей среды с использованием бактерий-деструкторов

На сегодняшний день достаточно остро стоит вопрос загрязнения окружающей среды СОЗ. Наиболее массовыми загрязнителями биосферы выступают полициклические ароматические углеводороды, хлорорганические соединения (растворители, пестициды, ПХБ) (Янкевич и др., 2015). До середины 80-х годов прошлого столетия мировое производство ПХБ составило около 1,5 млн. тонн, из них, примерно, 750 тыс. тонн попали в биосферу Земли. Известно, что большая часть ПХБ локализована в почве и осадках водоемов вблизи мест их бывшего использования (Васильева, Стрижакова, 2007). Однако благодаря миграционным свойствам ПХБ стали повсеместными загрязнителями окружающей среды, обнаруженными в отдаленных регионах, ранее не подверженных антропогенному воздействию (полярные и горные регионы). Процесс десорбции и деградации ПХБ преимущественно зависит от эффективности используемых технологий ремедиации. Большинство традиционных методов восстановления почв и донных отложений (механическая рекультивация, внесение минеральных веществ, экстракция при помощи химических соединений (растворители), термическая обработка и др.) не приводят к нужному результату. Как правило, количество ПХБ на загрязненных участках составляет 1 % от общей массы почвы/донных отложений (Passatore *et al.*, 2014), следовательно, для деструкции этих опасных химических соединений необходимо обрабатывать очень большие объемы загрязненных грунтов/осадков. Таким образом, классические методы ремедиации не подходят для очистки больших территорий, так как являются дорогостоящими и энергетически затратными, а также приводят к потере почвенного плодородия и образованию других, не менее опасных, токсикантов. В настоящее время, для решения данной проблемы разрабатываются экономически эффективные технологии очистки окружающей среды от ПХБ. К таким технологиям можно отнести биоремедиацию, в основе которой лежит биологический потенциал микроорганизмов (Егорова, Плотникова, 2009; Passatore *et al.*, 2014).

Общепринято, что основную роль в биодеструкции стойких органических загрязнителей играют бактерии. Установлено, что бактерии, обладающие способностью трансформировать бифенил и ПХБ, присутствуют во многих природных и антропогенных средах даже в отсутствие каких-либо загрязнителей (Васильева, Стрижакова, 2007; Macedo *et al.*, 2007). Однако в “исторически” загрязненных местах под длительным воздействием селективного фактора (присутствие ПХБ, других хлорорганических соединений) сформировались специфические микробные сообщества, в состав которых входят высокоэффективные бактерии-деструкторы. В результате того, что деградации ПХБ осуществляется анаэробными и аэробными бактериями, процесс биоремедиации может проходить как в переувлажненных почвах, донных отложениях водоемов, сточных илах, так и в сухих поверхностных слоях почв, грунтов и т.д. Особое внимание заслуживает процесс деструкции ПХБ в биопленке, образующейся на границе аэробных и анаэробных условий, так как большинство конгенов ПХБ разлагаются преимущественно в условиях кометаболизма бактерий-деструкторов (Васильева, Стрижакова, 2007; Master *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2018; Pathiraja *et al.*, 2019). Опубликованы десятки работ, в которых описаны механизмы, закономерности, а также перспективы биоремедиации окружающей среды, загрязненной ПХБ (Singer *et al.*, 2000; Petrić *et al.*, 2011; Егорова, Первова, 2013; Payne *et al.*, 2013; Егорова и др., 2017).

Для очистки загрязненных территорий используются методы стимуляции специфической аборигенной микрофлоры, способной кометаболизовать ПХБ, путем внесения определенных индукторов и осуществления оптимизации условий среды (Wiegel, Wu, 2000; Luo *et al.*, 2008; Krumins *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018). Также широко используется процесс биоаугментации – инокулирование природных бактерий-деструкторов (полученных методом накопительных культур) или генно-инженерных штаммов, для повышения численности и разнообразия ПХБ-деструкторов, что, в свою очередь, приводит к увеличению биодegradационного потенциала (Rein *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2010; Fagervold *et al.*, 2011; Egorova *et al.*, 2013; Cervantes-González *et al.*, 2019;

Mishra *et al.*, 2020). Успешными на сегодняшний день являются направления по выделению из природной среды, а также созданию новых штаммов, обладающих широкой субстратной специфичностью (по отношению к различным конгенерам ПХБ), а также имеющих множественный набор генов, в том числе, кодирующих ферменты разложения не только ПХБ, но и хлорбензойных кислот (Рыбкина и др., 2003; Васильева, Стрижакова, 2007; Sharma *et al.*, 2018). Для создания биопрепаратов, направленных на очистку загрязненных территорий, отбирают бактериальные штаммы, демонстрирующие высокую активность разложения ПХБ и не представляющие угрозы для здоровья человека и животных (Егорова, Плотникова, 2009).

R.B. Payne с соавторами (2013) исследовали консорциум активных бактерий-деструкторов ПХБ, состоящий из анаэробного штамма *Dehalobium chlorocoercia* DF1 и аэробного *B. xenovorans* LB400. Использование биопрепаратов (исследуемые штаммы и сорбент – гранулированный активированный уголь) в условиях *in situ* привело к снижению количества ПХБ на 80 %, с 8 мг/кг до 2 мг/кг в течение 120 дней (Payne *et al.*, 2013). Н. Dudasova с соавторами (2017) в своей работе описали перспективный метод очистки сточных вод от ПХБ, используя биологический потенциал штамма *Achromobacter xylosoxidans* H8 и химический метод – озонирование. Результаты исследования показали, что сочетание химического и биологического методов очистки сточных вод от конгенов ПХБ имеет высокую эффективность (до 90 %) (Dudasova *et al.*, 2017).

E. Cervantes-González с коллегами (2019) изучили микробный консорциум, полученный из загрязненной почвы (Мексика). Было выделено 4 бактериальных штамма, которые в дальнейшем использовались для биоаугментации и биостимуляции загрязненных почв. В результате 8 недельного эксперимента эффективность биodeградации ПХБ достигала 60 %. Кроме того, выделенные штаммы были использованы, в составе смешанной культуры, для разложения коммерческих смесей ПХБ: за четыре недели

инкубации концентрация ПХБ снизилась более чем в два раза (с 0,5 до 0,23 мг/л) (Cervantes-González *et al.*, 2019).

Исследование по очистке почв, длительное время подвергавшихся загрязнению ПХБ, при помощи биоаугментации провела группа ученых во главе с Н. Horváthová (2018). Было продемонстрировано, что более эффективным методом является использование бактериальных консорциумов, чем единичных бактериальных штаммов. При изучении консорциума, состоящего из двух штаммов-деструкторов (*Rhodococcus ruber* и *Achromobacter xylosoxidans*), в соотношении 1:1, наблюдалась высокая деградация коммерческих смесей ПХБ (~ 85 %) (Horváthová *et al.*, 2018).

Бактерии играют важную роль в фиторемедиации и ризоремедиации, включающей взаимодействие растений и бактериальных сообществ, что приводит к очистке почвы от органических загрязнителей, в том числе и ПХБ (Terzaghi *et al.*, 2018). Donnelly совместно с соавторами (1994) описали способность штаммов *B. xenovorans* LB400, *Cupriavidus necator* H850 и *Corynebacterium* sp. MB1 использовать в качестве субстрата фенольные соединения растений, содержащиеся в ризосфере, при этом исследуемые штаммы обладали деструкционной активностью по отношению к ПХБ (Vergani *et al.*, 2016). Из ризосферы канареечника тростниковидного – *P. arundinacea*, L. Vergani с группой ученых (2019) выделили и изучили ряд штаммов рода *Rhodococcus*, способных использовать вторичные метаболиты растений и бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии. В условиях, приближенных к естественным, было продемонстрировано, что три исследуемых штамма способны стимулировать развитие корневой системы растений и разлагать различные конгенеры ПХБ, что делает их перспективными для ризоремедиации (Vergani *et al.*, 2019). Штамм *Mesorhizobium* sp. ZY1 был выделен из ризосферы астрагала (*Astragalus sinicus*), растущего на сельскохозяйственных территориях, загрязненных ПХБ (в частности, соединением 3,3',4,4'-ХБ (ПХБ77), обнаруженным в почве в высоких концентрациях). Результаты исследования показали, что штамм *Mesorhizobium* sp. ZY1 способен утилизировать 3,3',4,4'-ХБ

(400 мг/л) на 62,7 % в течение 10 дней (Teng *et al.*, 2016). Таким образом, ризосферные микроорганизмы представляют определенный интерес для разработки новых биотехнологий, сочетающих потенциал бактерий и растений, для детоксикации загрязненных ПХБ территорий.

В последние десятилетия в биотехнологии используются простые, безопасные и дешевые аналитические инструменты для детекции и мониторинга токсичных соединений в окружающей среде – **биосенсоры** (Park *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010a; Liu *et al.*, 2010b; Chobtang *et al.*, 2011). В состав биосенсора входит электрохимическое или оптическое (физическое) устройство для преобразования и определения сигнала, поступающего от чувствительного биологического элемента. Основой для биосенсоров, как правило, выступают биологические материалы (ферменты, антитела, органеллы, клетки и ткани). Для оценки реального действия загрязняющих веществ (бифенила/ПХБ) на живые системы в качестве модельного объекта в биосенсорах наиболее часто применяются клетки бактерий-деструкторов. Клетки бактерий, как правило, легко выращиваются в культуре, что обеспечивает их экономическое преимущество перед такими альтернативными биологическими компонентами, используемыми в современных биосенсорах, как ферменты и антитела. Другим важным критерием выбора штаммов-деструкторов в качестве основы биосенсоров является большой объем накопленных знаний о метаболическом потенциале микроорганизмов в их естественных местах обитания и детальное изучение бактерий-деструкторов на всех уровнях живого (физиологическом, генетическом, биофизическом), эти знания также используются при критической оценке безопасности используемых бактерий для окружающей среды и человека (Плотникова и др., 2016). На сегодняшний день имеются исследования по созданию и изучению цельноклеточных биосенсоров на основе генномодифицированных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Ralstonia* (Layton *et al.*, 1998; Feliciano *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010b, Шумкова и др., 2017).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика образцов, отобранных для исследований

Анадырский лиман (полоса прибоя). Порт города Анадырь является крупнейшим морским портом на Чукотке, открытым для захода судов в период летней навигации с июня по октябрь, ежегодный грузооборот превышает 700 тыс. тонн (<http://portsinfo.ru/ports/63-port-russia/169765-port-anadyr>). В процессе эксплуатации судов и судоремонтных предприятий происходит загрязнение окружающей среды нефтью, мазутом, техническими маслами, которые являются источниками токсичных ароматических соединений. Мониторинг атмосферного воздуха Чукотского автономного округа на наличие стойких органических загрязнителей (СОЗ) показал присутствие в воздухе конгенов ПХБ, соответствующих составу совола – технической смеси ПХБ, широко применявшейся на территории бывшего СССР (Коноплев и др., 2012). Это свидетельствует о возможном наличии локальных или региональных источников загрязнения ПХБ в районе места пробоотбора (метеостанция Валькаркай в 40 км к северу от г. Певека) на Чукотке. Следует отметить, что уровни содержания ПХБ в воздухе на Чукотке относятся к наиболее высоким среди данных по всем станциям мониторинга СОЗ глобальной Арктики (Carrizo, Gustafsson, 2011; Коноплев и др., 2012).

В качестве материала для исследований летом 2008 года были отобраны образцы донных отложений (полоса прибоя) в черте г. Анадырь, паромная переправа через Анадырский лиман. Отбор проб осуществлялся в стерильные пробирки. Образцы хранились при температуре $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВМКМС), г. Березники. Калийные предприятия компании ПАО “Уралкалий” осуществляют разработку одного из крупнейших в мире месторождений солей “Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей” (ВМКМС). ВМКМС является основой калийной промышленности РФ и вторым в

мире по величине запасов хлористого калия (содержит 31,4 % мировых запасов) (Щукова, Крутик, 2019).

Основной спецификой калийного производства является накопление значительного количества отходов в шламохранилищах и солеотвалах с рассолоборниками. Отходы представлены легкорастворимыми компонентами (хлоридами калия, натрия и магния) и содержат большое количество микроэлементов (стронций, марганец, никель, кобальт, хром, цинк и др.), а также реагентов, используемых для обогащения полезных ископаемых (Лисенко, 2016). На территории разработок ВМКМС накоплено более 270 млн. т. галитовых отходов и более 30 млн м³ глинисто-солевых шламов (Бачурин, Бабошко, 2008). Стоки и фильтрация из солеотвалов и шламохранилищ являются основными источниками загрязнения окружающей среды. Добыча и переработка руды на калийных предприятиях связана с образованием значительного количества пород-отходов. Например, на каждую тонну хлористого калия, получаемого в процессе переработки сильвинитовой и карналлитовой руды, образуется 0,1–0,5 т. глинисто-солевых шламов и 3,5–4,5 т. (в зависимости от степени извлечения) твердых галитовых отходов (солеотходов). Образующиеся ежегодно на калийных предприятиях млн. т. жидких и твердых отходов складываются на поверхности в солеотвалы и рассоло-шламохранилища (Лисенко, 2016). Нельзя не отметить, что горная промышленность является отраслью, в которой наиболее широко применяется электрооборудование, содержащее ПХБ, это было документально зафиксировано в ходе проверок, проведенных за последние двадцать лет. Установлено, что ПХБ встречаются в трансформаторах, емкостях с отработанным трансформаторным маслом, конденсаторах и флуоресцирующих веществах осветительных приборов. Трансформаторы и конденсаторы могут располагаться на стационарных электроподстанциях или устанавливаться на рудничных вагонетках. Конденсаторы, содержащие ПХБ, могут также встречаться в электровозах (<https://mining-media.ru/ru/article/prombez/1374-polikhlorirovannyye-bifenily-opasnye-zagryazniteli-ukryvaemye-v-shakhtakh-i-karerakh>).

Из района разработок ВМКМС, на территории соледобывающего предприятия Березниковского рудоуправления (БКПРУ-1 и БКПРУ-3), расположенного в окрестностях г. Березники (Пермский край), в весенне-летний период 2015, 2016 гг. сотрудниками лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН были отобраны десять образцов: донные отложения промышленных стоков – Промканал (образцы В1, В13); ризосфера, бескильница расставленная (образец В8); донные отложения рассолосборника, около солеотвала, БКПРУ-3 (образец В10); донные отложения р. Зырянка, БКПРУ-1 (образцы В11, В12); поверхность шламохранилища, БКПРУ-3 (образцы В17, В18); почва вблизи солеотвала, БКПРУ-3 (образцы В22, В23).

Отбор проб осуществлялся в стерильные пробирки. Образцы хранились при температурном режиме $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Накопительные культуры, полученные на минеральной среде с бифенилом в качестве единственного источника углерода и энергии, с образцом поверхностного слоя шламохранилища БКПРУ-3 (В18) и образцом почвы вблизи солеотвала БКПРУ-3 (В22) характеризовались наличием активного бактериального роста (см. раздел 4.2) и были отобраны для более детального исследования.

Органические загрязнители в образцах В18 и В22 определяли в хлороформных экстрактах проб с использованием метода хромато-масс-спектрометрии (см. раздел 2.2). Химический анализ показал присутствие алифатических углеводородов (алканов) в образцах: В18 – 9154,9 мг/кг и В22 – 2,1 мг/кг. В образце из шламохранилища (В18) также были выявлены такие загрязняющие вещества как дибутилфталат – 1,6 мг/кг, бутилоктилфталат – 0,1 мг/кг, нафталин – 32,6 мг/кг. Вблизи солеотвала (В22) не были обнаружены ароматические соединения, эфиры фталевой кислоты (фталаты).

В пробах В22 и В18 была определена общая минерализация и концентрация водорастворимых солей (см. раздел 2.2). В образце поверхностного слоя

шламохранилища (В18) общая минерализация составляла 3,2 %, что превышает уровень минерализации в образце почвы вблизи солеотвала (В22) – 2 %. Исследуемые пробы характеризовались высоким содержанием катионов, так, для В18 эти значения достигали (мг/кг): Na^+ – 11079,3; K^+ – 5805,2; Ca^{2+} – 1056,2; Mg^{2+} – 112. Содержание катионов растворимых солей в образце почвы В22 соответствовало (мг/кг): Na^+ – 3864,5; K^+ – 948,7; Ca^{2+} – 1535,7; Mg^{2+} – 76,2.

Таким образом, химический анализ отобранных в районе промышленных разработок ВМКМС образцов (В18, В22) показал высокую степень их засоленности, а также присутствие загрязняющих органических веществ.

Предприятие ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь). ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей (СОЖ)” был одним из первых заводов по переработке нефтепродуктов в г. Перми (запуск производства – 1943 г.), а также являлся крупнейшим поставщиком смазочных материалов на предприятия металлургии, машиностроения, нефтегазовой отрасли, железнодорожного транспорта, горнодобывающей промышленности и военно-промышленного комплекса. Предприятие выпускало смазочно-охлаждающие жидкости, смазочные масла, пластичные смазки, технические, гидравлические и автомобильные жидкости, специализированные масла для низких температур, в состав которых входили ПХБ и другие (хлор)ароматические углеводороды. Таким образом, территория предприятия ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” длительное время (более 60 лет) загрязнялась нефтепродуктами (ПАУ), а также (хлор)ароматическими соединениями (<http://www.nge.ru/passport-description-161.htm>).

В качестве материала для исследования с территории завода ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” в 2016 году были отобраны образцы почв с глубины 5–10 см с двух участков и хранились при температуре $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию. Для дальнейшего исследования использовали суммарную почву, полученную при тщательном перемешивании отобранных образцов.

АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь). Основной производственной деятельностью АО “Сибур-Химпром” является переработка широкой фракции легких углеводородов и производство целого ряда продуктов нефтехимии. К продукции предприятия относятся сжиженные углеводородные газы, бутиловые спирты, 2-этилгексанол, этилбензол технический, стирол, метил-трет-бутиловый эфир и другие вещества (<https://www.sibur.ru/SiburKhimprom/services/>). Очистка сточных вод является обязательным этапом в использовании водного ресурса на предприятиях химической промышленности. В зависимости от технологических особенностей сточные воды могут содержать органические и неорганические примеси, которые при попадании в окружающую среду наносят урон экологии.

В качестве материала для исследований из очистных сооружений предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь) в декабре 2016 года было отобрано 2 пробы сточных вод (обозначенные как SIB1 и SIB2). Отбор образцов осуществлялся в стерильные пробирки. Хранение проводилось при температурном режиме $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ исследуемых образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Наличие органических загрязнителей в отобранных пробах сточных вод определяли в хлороформенных экстрактах с использованием хромато-масс-спектрометрии (см. раздел 2.2). В образце SIB1 обнаружены ароматические соединения (толуол, этилбензол, диметилбензолы, 2,5-бис(1,1-диметиэтил)фенол), алканы C10-C19. Во втором образце SIB2 выявлены ароматические соединения, спирты (пентанол, бензиловый спирт (бензометанол), ацетофенон, 2,5-бис(1,1-диметиэтил)фенол), алканы C16-C22 (Отчет по х/д №СПХ.1745 “Подбор штаммов микроорганизмов для увеличения эффективности биологической очистки сточных вод АО “Сибур-Химпром”, Пермь, 2016).

ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” (г. Чапаевск). Одним из наиболее загрязненных хлорорганическими соединениями городов России является г. Чапаевск (Самарская область). В XX веке в течение нескольких

десятилетий до конца 80-х годов на территории города Чапаевска на химическом предприятии “Средне-Волжский завод химикатов” (ОАО “СВЗХ”) осуществлялся выпуск различных хлороорганических соединений, таких как линдан (смесь гексахлорциклогексанов), гексахлорбензол, пентахлорфенол, а также 1,2,4-трихлорбензол, который использовался для изготовления ПХБ смеси – “Совтол-10”. В результате интенсивной производственной деятельности произошло загрязнение территории предприятия, реки Чапаевки, протекающей вдоль территории завода и прилегающих городских территорий токсичными поллютантами. В 2005 году завод был ликвидирован, однако из-за устойчивости и способности хлорароматиков (в том числе ПХБ), к аккумуляции в почвах/грунтах, донных отложениях территория завода до настоящего времени остается источником загрязнения и неблагоприятного воздействия на людей (Назаров и др., 2016).

Объектом исследования являлись отобранные в 2013 году образцы донных отложений реки Чапаевки, протекающей вдоль территории ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (г. Чапаевск, Самарская область). Пробы отбирались в стерильные пробирки и хранились при $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

В исследуемом образце донных отложениях (обозначенном как Ch) реки Чапаевки методом хромато-масс-спектрометрии были обнаружены ПХБ в количестве 0,213 мг/кг, а также эфиры фталевой кислоты (дибутилфталат, диоктилфталат), хлорсодержащие органические загрязнители (линдан, алохлор, триалат), в том числе и имеющие ароматическое строение (хлорбензолы и дихлорбифенил трихлорметилметан (ДДТ)) (Отчет по х/д №1 “Выделение из аборигенной микрофлоры техногенно нарушенных почв активных штаммов бактерий-деструкторов хлорароматических соединений (полихлорированных бифенилов)”, Пермь, 2013).

Порт города Евпатория (п-ов Крым). Евпаторийский торговый порт расположен в центре города Евпатория. Навигация осуществляется непрерывно,

так как в зимний период Каламитский залив Черного моря не покрывается льдом (<http://evtrp.ru/>). В результате активной эксплуатации порта в окружающую среду попадают различные загрязняющие элементы, такие как нефть, мазут, технические масла и смазки, которые выступают в качестве источников токсичных ароматических соединений. В июне 2017 года на п-ове Крым в порту города Евпатории были отобраны образцы морских донных отложений. Образцы отбирались в стерильные пробирки и хранились при температуре $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами (Нефтебаза). Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами функционирует как государственный морской порт, способный осуществлять перевалку до 40 тыс. т. нефтегрузов в сутки. (http://krumology.info/index.php/Феодосийское_предприятие_по_обеспечению_нефтепродуктами). В качестве материала для исследований в сентябре 2017 года были отобраны образцы почв с территории Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами. Пробы отбирались с глубины 5–10 см в стерильные пробирки. Хранение образцов осуществлялось при температуре: $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Дальнейшие исследования (микробиологические и молекулярно-генетические) проводились непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Перевал Кыртыкауш (республика Кабардино-Балкария). Горные регионы традиционно считаются наиболее экологически чистыми территориями, вследствие снижения антропогенных и техногенных факторов загрязнения. Тем не менее, в последние годы появляются данные о загрязнении высокогорных районов стойкими органическим загрязнителями. Эти вещества подвергаются атмосферному переносу на большие расстояния и способны накапливаться в отдаленных районах. Накопление СОЗ в холодных регионах может быть обусловлено процессом конденсации, вызванной пониженными температурами и наличием снежного покрова. Следовательно, высокогорные регионы вызывают

растущий интерес и рассматриваются как акцепторы для переносимых на большие расстояния загрязняющих воздух веществ (Guzzella *et al.*, 2016).

Кавказские горы являются наивысшей точкой Российской Федерации. С территории центрального района Кавказа (Северный Кавказ), республики Кабардино-Балкарии, на высоте 3232 метров (перевал Кыртыкауш, GPS: 43.3911111, 42.6336111; рисунок 10), в качестве материала для исследования в августе 2016 года были отобраны образцы почв. Пробы отбирались с глубины 5–10 см в стерильные пробирки и хранились при температуре $+4 \pm 1^\circ\text{C}$. Микробиологический и молекулярно-генетический анализ образцов осуществлялся непосредственно после доставки проб в лабораторию.

Анализ наличия загрязняющих веществ в хлороформенных экстрактах образцов с использованием метода хромато-масс-спектрометрии показал отсутствие органических загрязнителей.

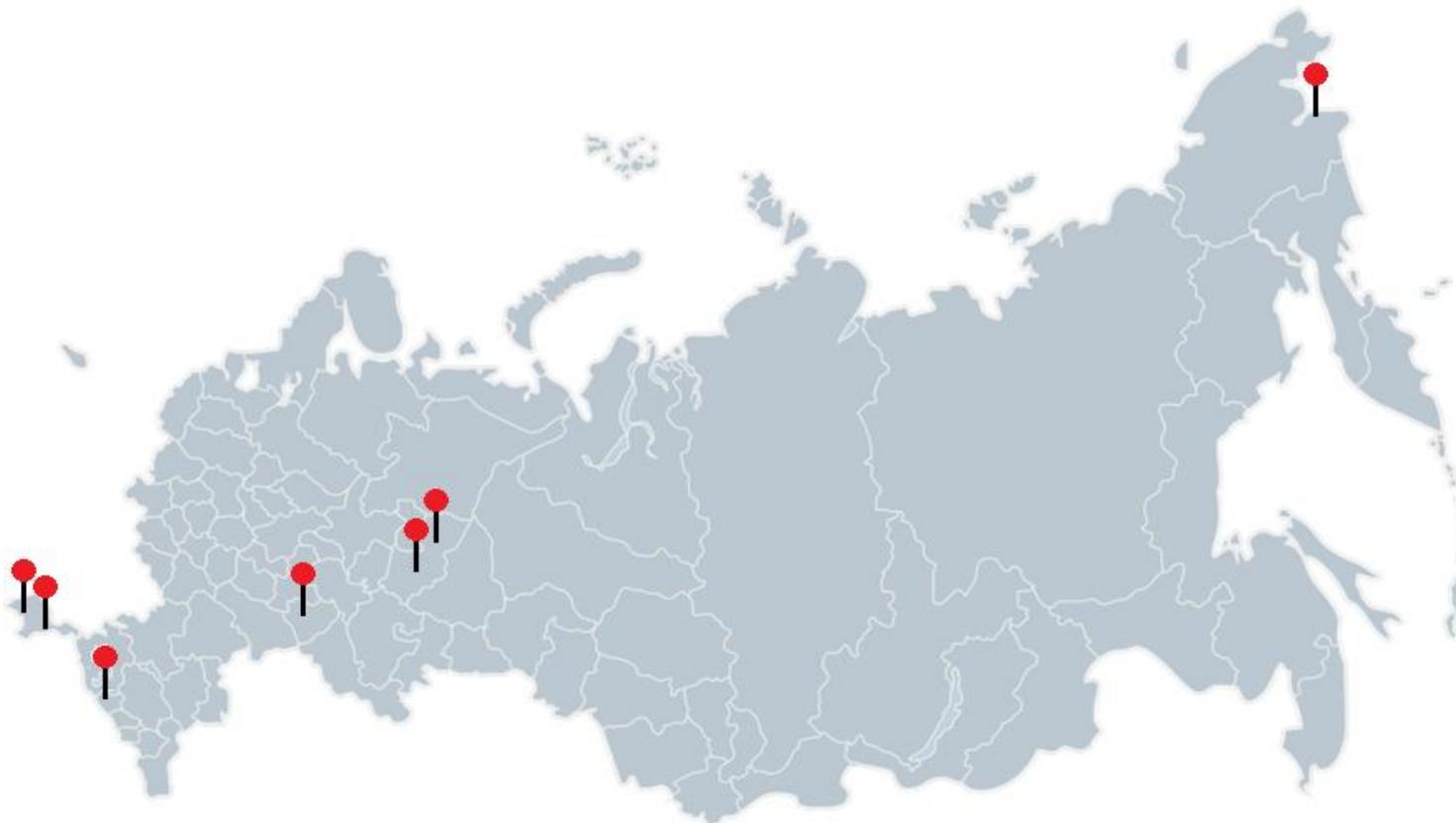


Рисунок 10 – Географическое расположение мест отбора образцов для исследования. Прибрежная зона порта Анадырь; Пермский край: Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВМКМС) (г. Березники), ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь), АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь); Самарская область: ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” (г. Чапаевск); п-ов Крым: Порт города Евпатория, Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами; республика Кабардино-Балкария (Перевал Кыртыкауш).

2.2. Анализ исследуемых образцов

Определение органических загрязнителей в исследуемых образцах осуществляли в хлороформенных экстрактах проб с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent 6890/5973N (“Agilent”, США), хроматограммы анализировали в программе MSD Productivity ChemStation (“Agilent”, США), идентификацию веществ проводили по масс-спектрам с применением библиотеки NIST 98. Количественное определение органических веществ осуществляли методом градуировки по площадям пиков.

Определение содержания катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} проводили методом водной вытяжки (приготовленной согласно ГОСТу 26423-85) с последующей детекцией на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 (“Shimadzu”, Япония).

2.3. Среды и условия культивирования

Для выделения штаммов-деструкторов и изучения их биodeградационных свойств была использована минеральная среда K1, следующего состава (мг/л): K_2HPO_4 – 3180; NaH_2PO_4 – 350; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 500; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,29; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,18; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,98; дополненная 1 мл/л раствора микроэлементов, содержащего (г/л): ЭДТА – 2,50; $\text{ZnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 10,95; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,0; $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,54; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,39; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,24; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ – 0,17; pH среды 7,3 (Зайцев, Карасевич, 1981).

Бактерии-деструкторы из образцов донных отложений Анадырского залива выделяли на минеральной среде (искусственная морская вода), следующего состава (г/л): NaCl – 20,0; MgCl_2 – 3,0; MgSO_4 – 2,0; KCl – 1,0; CaCl_2 – 0,5; FeSO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0.

Для выделения бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ в качестве субстрата, в виде порошка, вносили в среду – бифенил (Biphenyl, 99 %) (“ACROS Organics”, США), в концентрации 1 г/л.

При культивировании бактериальных штаммов в неселективных условиях использовали среду Luria-Bertrani (LB) следующего состава (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10 (Маниатис и др., 1984).

Агаризованные среды получали путем внесения агара (“Difco”, США) до конечной концентрации 15 г/л. Далее чашки Петри с бактериальными культурами инкубировали в термостате при $+28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для изучения ростовых характеристик микроорганизмов при изменении осмолярности среды использовали минеральную среду Раймонда следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 7,56; NH_4NO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,41; Na_2CO_3 – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,013; дополненную 1 % раствором $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 мл/л и 1 % раствором $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 мл/л среды (Розанова, Назина, 1982), с добавлением NaCl в концентрации 0, 30, 50, 70 г/л. Для приготовления богатой среды Раймонда (БСР) в минеральную среду Раймонда (МСР) добавляли 5 г/л триптона и 2,5 г/л дрожжевого экстракта в качестве ростовых субстратов.

Бактериальное культивирование в жидких средах проводили в колбах Эрленмейера (объемом 250 мл) в 50 мл среды при температурном режиме $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ с аэрацией на термошейкере (“Biosan”, Латвия) – 120 об/мин, культивирование ассоциации микроорганизмов образца донных отложений Анадырского залива проводили при температуре $+10 \pm 2^\circ\text{C}$. Культивирование бактерий на агаризованных минеральных и богатых средах осуществляли в термостате при температуре $+28 \pm 1^\circ\text{C}$.

При клонировании отбор рекомбинантных клонов осуществляли на основании “бело-голубого” теста, высевая трансформанты на среду LB, содержащую: 50 мкг/мл ампициллина, для обеспечения роста плазмидсодержащих клеток *E.coli*; 1 мМ IPTG, в качестве индуктора промотора в составе вектора pTZ57R/T (“Thermo Scientific”, США); 20 мкг/мл X-gal, в качестве субстрата (“Fermentas”, Литва).

2.4. Накопительные культуры и выделение бактерий-деструкторов

В работе были получены и исследованы 18 накопительных культур образцов почв, донных отложений и сточных вод, отобранных с загрязненных территорий Российской Федерации.

В колбы Эрленмейера с 50 мл минеральной среды К1 добавляли бифенил (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии, далее вносили исследуемые образцы весом 0,5 г. Инкубацию проводили от 1 до 3 месяцев при оптимальных температурных условиях: для донных отложений Анадырского залива – $+10 \pm 2^\circ\text{C}$, для остальных культур – $+28 \pm 1^\circ\text{C}$. Для получения ассоциаций бактерий-деструкторов осуществляли “последовательное селективное культивирование” – многократные пересевы накопительных культур и культивирование при вышеперечисленных условиях.

Из накопительных культур с активным бактериальным ростом выделяли штаммы-деструкторы, путем высева на агаризованную минеральную среду К1 с бифенилом. Чистоту культур контролировали высевом на агаризованную среду LB.

2.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

При исследовании отобранных образцов на наличие бактериальных генов 16S рРНК, а также генов, кодирующих ферменты, ответственные за разложение различных ароматических углеводов (ПАУ и ПХБ), был использован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для оценки состава микробного сообщества исследуемых образцов были выбраны гены, кодирующие 16S рРНК и α -субъединицу гидроксилирующих диоксигеназ (P4H-RHD $_{\alpha}$), участвующий в окислении различных полициклических ароматических углеводов, бифенила/ПХБ. При амплификации генов 16S рРНК были использованы праймеры Eub338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') и Eub518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Fierer *et al.*, 2005). Для детекции генов, кодирующих α -субъединицу гидроксилирующих диоксигеназ (P4H-RHD $_{\alpha}$) использовали два набора

бактериальных праймеров: 1) PАН-RHD_αGPF (5'-CGGCGCCGACAAATTYGTNGG-3') и PАН-RHD_αGPR (5'-GGGGAACACGGTGC CRTGDATRAA-3'), разработанных для различных типов генов, общих у грамположительных бактерий-деструкторов ПАУ и ПХБ; 2) PАН-RHD_αGNF (5'-GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-3') и PАН-RHD_αGNR (5'-AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT-3'), сконструированных для детекции генов, общих у грамотрицательных бактерий-деструкторов ПАУ и ПХБ (Cébron *et al.*, 2008).

ПЦР-РВ выполняли в присутствии красителя Sybr Green I в наборах реактивов производства фирмы “Синтол” (Россия) и 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (“Thermo Scientific”, США) на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories”, США) согласно стандартной методике (Jurelevicius *et al.*, 2012).

2.6. Денатурирующий градиентный гель-электрофорез

Для характеристики таксономического состава бактерий в исследуемых образцах и полученных накопительных культурах (бифенил, 1 г/л) был использован метод ДГГЭ, основанный на разделении амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК в химическом денатурирующем градиенте (Muzyer *et al.*, 1993). Амплификация фрагмента гена 16S рРНК была проведена с применением праймера 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3'), включающего на 5'-конце GC-хвост (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'), и праймера 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3').

Реакционная смесь, рассчитанная на одну пробу (12,5 мкл), следующего состава (мкл): вода деонизированная – 6,75; 10x буфер с MgCl₂ DreamTaq™ (“Thermo Scientific”, США) – 2; dNTPs (2,5 мМ) – 1,25; праймеры (10 мкМ): прямой – 0,5; обратный – 0,5; DreamTaq™ DNA Polymerase (“Thermo Scientific”, США) – 0,5; образец матричной ДНК – 1.

Процедура ПЦР включала начальный денатурирующий шаг при 95°C в течение 5 минут и 30 циклов: 94°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 3 минут; затем 72°C в течение 10 минут.

Электрофорез проводили в 6 % полиакриламидном геле, содержащем линейный денатурирующий химический градиент от 40 до 50 %, где 100 % составляет 7М мочевины и 40 % – формамид, согласно протоколу (Muyzer *et al.*, 1993). Разгонку осуществляли в течение 10,3 часа при 130 V и 60°C на Dcode™ Universal Mutation System (“Bio-Rad Laboratories”, США). ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0,5 мкг/мл) UV-трансиллюминацией, и документирована системой BioDocAnalyze (“Bio-Rad Laboratories”, США).

2.7. Клонирование и изучение генов деструкции бифенила/ПХБ

2.7.1. Выделение и подготовка тотальной ДНК для клонирования

Выделение тотальной ДНК из исследуемых образцов проводили при помощи коммерческого набора реактивов “MP Biomedicals” (США). Концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer (“Invitrogen”, США) с использованием реактивов производителя.

2.7.2. Амплификация *bphA1*-генов с тотальной ДНК

С матрицы тотальной ДНК проводили амплификацию *bphA1*-генов с праймерами специфичными к гену, кодирующему α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (таблица 3) (Iwai *et al.*, 2010; Шумкова и др., 2015) на приборе MyCycler (“Bio-Rad Laboratories”, США) в следующем режиме:

1. предварительная денатурация при 95°C – 3 минуты;
2. 30 циклов: 95°C в течение 45 секунд, 60°C в течение 45 секунд, 72°C в течение 40 секунд;
3. конечная элонгация: 72°C – 4 минуты.

Реакционная смесь, рассчитанная на одну пробу (12,5 мкл), следующего состава (мкл): вода деионизированная – 8,2; буфер 10x с MgCl₂ – 1,25 (“Eurogen”, Россия); dNTPs (2,5 мМ) – 1,25; праймеры (10 мкМ): прямой – 0,5;

обратный – 0,5; *Taq*-полимераза (“Eurogen”, Россия) – 0,3; образец матричной ДНК – 0,5.

Аmplификацию *bphA1*-генов с использованием альтернативных пар праймеров (таблица 3) проводили для каждого образца тотальной ДНК.

Таблица 3 – Олигонуклеотидные праймеры для амплификации участков *bphA1*-генов

Участок <i>bphA1</i> -гена	Праймеры	Ссылка
Активный центр фермента БДО	F: 5'-AACTGGAARTTYGCIGCVGA-3' R: 5'-ACCCAGTTYTCICCRTCGTC-3'	Iwai <i>et al.</i> , 2010
Кластер Риске [2Fe-2S]	F: 5'-CCGGCGACTTYATSACSAMSTACAT-3 R: 5'-TCSGCDGCRAWYTTCCAGTT-3'	Шумкова и др., 2015

В ходе дальнейших исследований отбирался тот набор праймеров, при использовании которого происходил процесс наилучшего отжига (праймеров) на матрице тотальной ДНК, благодаря чему наблюдалась наработка большого количество ПЦР-продукта.

2.7.3. Электрофорез амплифицированных фрагментов

Для обнаружения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в горизонтальном агарозном геле (1 %) в трис-боратном буфере х 1 (Трис – 10,8 г/л; борная кислота – 5,5 г/л; 0,5М ЭДТА – 4 мл; вода дистиллированная – 79,7 мл/л); напряжении 100 В/см в течение 20 минут, при комнатной температуре. Окрашивание агарозных гелей осуществляли раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 10–15 минут. Фотографировали в УФ-свете с помощью системы гель-документирования BioDocAnalyze (“Bio-Rad Laboratories”, США). Для определения размеров фрагментов ДНК использовали следующие маркеры молекулярных масс: O'GeneRuler TM 100bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва), O' GeneRuler TM 1kb DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

2.7.4. Клонирование фрагментов *bphA1*-генов

При детекции *bphA1*-генов в тотальной ДНК исследуемых образцов осуществляли наработку ПЦР-продукта, с последующей постановкой препаративного электрофореза. ПЦР фрагмент вырезали и экстрагировали из агарозного геля, используя набор для выделения ДНК из геля GeneJET Gel Extraction Kit (“Thermo Scientific”, США), согласно инструкциям производителя. После элюирования фрагментов *bphA1*-генов была измерена концентрация ДНК при помощи прибора Qubit Fluorometer (“Invitrogen”, США).

Полученные ПЦР-фрагменты *bphA1*-генов клонировали в клетках *E. coli* JM109 в составе вектора pTZ57R/T с использованием коммерческого набора InsTAclone PCR Cloning Kit (“Thermo Scientific”, США).

Лигирование ПЦР-фрагментов *bphA1*-генов с pTZ57R/T вектором. Исследуемые фрагменты *bphA1*-генов были лигированы с вектором pTZ57R/T. Лигирующая смесь представлена следующим составом (мкл): деионизированная вода – 3,2; 5x лигирующий буфер – 2; вектор pTZ57 R/T – 1; ПЦР-продукт – 3,5; T4-ДНК лигаза – 0,3. Аналитическую смесь для контроля готовили аналогично, с добавлением 3,5 мкл Control PCR-product (коммерческий набор – InsTAclone PCR Cloning Kit, “Thermo Scientific”, США) взамен исследуемого ПЦР-продукта. Инкубацию лигазной смеси проводили при $+4 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18–20 часов. Полученную лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

Трансформация клеток *E. coli* и получение рекомбинантных клонов. В качестве компетентных клеток использовали штамм *E. coli* JM109. Трансформацию проводили с использованием коммерческого набора реактивов фирмы “Thermo Scientific” (США) согласно инструкции производителя. Последующий отбор рекомбинантных клонов (белого цвета) осуществляли на основании “бело-голубого” теста, высевая трансформанты на среду Luria-Bertrani (LB) (Маниатис и др., 1984), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, 100 мМ IPTG, 20 мкг/мл X-gal (“Fermentas”, Литва), инкубацию проводили при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18–20 часов. С ДНК-матрицы отобранных рекомбинантных клонов

осуществляли амплификацию фрагментов *bphA1*-генов со специфичными праймерами (таблица 3).

2.7.5. ПДРФ-анализ клонированных фрагментов *bphA1*-генов

Для выявления сходства и различий между амплифицированными (клонированными) участками гена *bphA1* был проведен анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ-анализ) полученных ампликонов с использованием эндонуклеазы рестрикции *HhaI* (“Fermentas”, Литва) согласно рекомендациям производителя. Реакцию осуществляли при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1 часа в объеме реакционной смеси 7 мкл на одну пробу следующего состава (мкл): деионизированная вода – 0,7; 10x буффер Tango – 0,7 (“Fermentas”, Литва); эндонуклеаза рестрикции *HhaI* – 0,6 (“Fermentas”, Литва). Полученные препараты ПЦР-рестрикции разделяли методом электрофореза в агарозном геле (3 %) при напряжении 10 В/см, окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете с использованием системы гель-документирования BioDocAnalyze (“Bio-Rad Laboratories”, США).

2.7.6. Секвенирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *bphA1*

Для подготовки к секвенированию клонированных в составе вектора pTZ57R/T фрагментов ДНК проводили амплификацию вставки с использованием универсальных праймеров M13 (прямого 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' и обратного 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Johny, Bhat, 2017), для которых имеются сайты связывания в векторе pTZ57R/T по обеим сторонам от полилинкера.

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли в Лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественнонаучного института при Пермском государственном национальном исследовательском университете с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystems”, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирующую реакцию проводили при следующем режиме: 30 циклов, включающих 94°C – 20 секунд; 55°C – 15 секунд; 60°C – 1 мин. Состав реакционной смеси на одну пробу (10 мкл) включал (мкл): деионизированную воду (MiliQ) – 5,2; BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (“Applied Biosystems”, США) – 2; 5x Sequencing Buffer (“Applied Biosystems”, США) – 1; праймер – 0,6; очищенную матричную ДНК – 1,2. Продукты секвенирующей реакции подвергали очистке при помощи набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (“Applied Biosystems”, США).

Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ: Sequence Scanner v 1.0. и MEGA X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетических деревьев проводили при помощи пакета программ MEGA X с использованием метода “neighbor-joining” Статистическую достоверность ветвления (“bootstrap-анализ”) оценивали при помощи соответствующей функции программы MEGA X на основе 1000 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности генов *bphA1* депонированы в базу данных GenBank, под номерами: MF084200.1, MF084201.1, MF084202.1, MF084203.1, MF084204.1, MN099028.1, MN099029.1, MN099030.1, MN099031.1, MN099032.1, MN099033.1, MN099034.1, MN099035.1, MN153170.1, MN153172.1, MN153173.1, MN153171.1, MN153169.1 (приложение 1).

2.8. Изучение морфологических и физиолого-биохимических характеристик активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ

Морфологию колоний изучали у 72 часовых культур, выращенных на агаризованной богатой среде LB. Описание морфологии полученных чистых штаммов проводили по основным показателям: форма, размер, профиль, поверхность, прозрачность, цвет, структура, консистенция и форма края.

Грампринадлежность определяли методом теста с КОН (Смирнов, Киприанова, 1990). Небольшое количество суточной культуры бактерий наносили на предметное стекло и размешивали платиновой петлей в капле 3 % КОН. Через 1–2 минуты проверяли наличие лизиса. Грамотрицательные бактерии лизировались и капля становилась желеобразной. Суспензии грамположительных микроорганизмов сохраняли свой прежний вид.

Рост микроорганизмов при изменении осмолярности среды изучали при добавлении NaCl в концентрации (г/л): 0, 30, 50, 70, на следующих средах: агаризованная минеральная среда Раймонд с добавлением бифенила в качестве субстрата и богатая агаризованная среда Раймонд. Культивировали микроорганизмы в термостате при $+28 \pm 1^\circ\text{C}$, в течение 7 суток.

Рост при разных температурах ($+45 \pm 1^\circ\text{C}$, $+28 \pm 1^\circ\text{C}$, $+4 \pm 1^\circ\text{C}$) на агаризованных средах: минеральной K1 с добавлением бифенила и богатой LB, оценивали на 7 сутки.

2.8.1. Определение ростовых характеристик

Изучение кинетики роста активных штаммов-деструкторов проводили в минеральной среде K1 в колбах объемом 250 мл при $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ с аэрацией на термошейкере 120 об/мин., в течение 14 суток. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали бифенил в концентрации 1 г/л, субстрат вносили однократно. В качестве инокулята выступала культура, выращенная на среде K1 с бифенилом.

Рост бактериальных культур оценивали спектрофотометрически (спектрофотометр UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония)), определяя оптическую плотность при длине волны 600 нм в кюветах с длиной оптического пути 1,0 см. При выращивании в жидких средах ОП₆₀₀ 0,1–0,3 единицы, оценивали как “+”, ОП₆₀₀ 0,4–0,6 единицы – “++”, ОП₆₀₀ 0,6 единицы и выше – “+++”. Чистоту культур контролировали высевом микроорганизмов на чашки Петри с агаризованной богатой средой LB.

2.8.2. Определение субстратной специфичности бактерий

Субстратную специфичность бактериальных штаммов определяли в жидкой минеральной среде К1 с внесением следующих субстратов (г/л): 2-ХБК; 3-ХБК; 4-ХБК – 0,7; фенол; толуол; бензол; дибутилфталат; нафталин; фенантрен; *орто*-фталат; бензойная кислота; протокатеховая кислота; *пара*-оксибензойная кислота – 1,0; салициловая кислота – 0,5, в качестве единственного источника углерода и энергии. Бактериальный рост культур регистрировали спектрофотометрически: ОП₆₀₀ 0,1–0,3 единиц, оценивали как “+”, ОП₆₀₀ 0,4–0,6 единицы – “++”, ОП₆₀₀ 0,6 единиц и выше – “+++”.

При выращивании бактерий на агаризованной среде К1 субстраты (бифенил, нафталин, толуол, бензол, фенол, дибутилфталат) добавляли на крышку перевернутой чашки Петри. Рост штаммов на вышеперечисленных субстратах оценивали по образованию колоний диаметром более 2 мм. Колонии размером 0,2 см оценивали, как “+”, 0,2–0,4 см – “++”, 0,5 и выше – “+++”. Контроль чистоты бактериальных культур проводили на агаризованной среде Luria-Bertrani (LB) (Маниатис и др., 1984).

2.9. Изучение штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ молекулярно-генетическими методами

2.9.1. Выделение ДНК из чистых культур бактерий

ДНК из чистых культур бактерий выделяли методом “щелочного лизиса” (Методы общей бактериологии, 1983). С помощью платиновой петли единичную колонию бактерий помещали в пробирку типа “эппендорф”, содержащую 80 мкл 0,05М NaOH. Далее проводили инкубацию в течение 3-х циклов: 15 мин при $+95 \pm 1^\circ\text{C}$, затем 15 мин при охлаждении $-20 \pm 1^\circ\text{C}$. Не разрушенные клетки и крупные фрагменты удаляли центрифугированием – 12000 об/мин в течение 2 минут. Супернатант использовали для амплификации генов 16S рРНК и функциональных генов.

2.9.2. ДНК – типирование

Предварительную группировку выделенных штаммов бактерий (генетическое сходство/различие) осуществляли методом ВОХ-ПЦР (полимеразная цепная реакция повторяющихся ВОХ-элементов) с использованием праймера ВОХА1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic *et al.*, 1994).

Реакционная смесь, рассчитанная на одну пробу (25 мкл), имела следующий состав (мкл): вода деонизированная –13,45; 5x buffer Gitscher (Versalovic *et al.*, 1994) – 5; бычий сывороточный альбумин (BSA) (“Fermentas”, Литва) – 0,2; ДМСО (“Sigma-Aldrich”, США) – 2,5; dNTPs (25 мМ) – 1,25; праймер (10 мкМ) – 1; Colored *Taq* Polymerase (“Силекс”, Россия) – 0,6; образец матричной ДНК – 1. Амплификацию осуществляли на приборе MyCycler (“Bio-Rad Laboratories”, США) при следующих условиях:

1. предварительная денатурация при 95°C – 6 минут;
2. 34 цикла: 94°C в течение 1 минуты, 53°C в течение 1 минуты, 65°C в течение 8 минут;
3. конечная элонгация: 65°C – 16 минут.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в 2 % агарозном геле на 0,5 х буфере TBE (89 мМ Трис-НСl, 89 мМ борная кислота, 2,5 мМ ЭДТА, рН 8,2) в течение 2 часов при напряженности электрического поля 5,7 В/см., а затем сравнивали полученные ВОХ-профили исследуемых штаммов.

2.9.3. Амплификации генов 16S рРНК

Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') на амплификаторе MyCycler (“Bio-Rad Laboratories”, США) в следующем режиме:

1. предварительная денатурация при 95°C – 5 минут;
2. 30 циклов: 94°C в течение 30 секунд; 55°C в течение 30 секунд; 72°C в течение 1 минуты 20 секунд;
3. конечная элонгация: 72°C – 5 минут.

Реакционная смесь, рассчитанная на одну пробу (12,5 мкл), следующего состава (мкл): вода деонизированная – 8,2; 10x буфер с MgCl₂ DreamTaq™ (“Thermo Scientific”, США) – 1,25; dNTPs (2,5 мМ) – 1,25; праймер 27F (10 мкМ) – 0,5; праймер 1492R (10 мкМ) – 0,5; DreamTaq™ DNA Polymerase (“Thermo Scientific”, США) – 0,3; образец матричной ДНК – 0,5.

2.9.4. Амплификации *bphA1*-генов с матрицы ДНК чистых культур

С ДНК-матрицы выделенных штаммов проводили амплификацию *bphA1*-генов со специфичными праймерами (таблица 3) (Iwai *et al.*, 2010; Шумкова и др., 2015), на приборе MyCycler (“Bio-Rad Laboratories”, США) при условиях, описанных в разделе 2.7.2.

2.9.5. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей и построение деревьев

Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystems”, США) (см. раздел 2.7.6).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых *bphA1*-генов и построение филогенетического дерева проводили, как описано в разделе 2.7.6.

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК анализировали с использованием программ: Sequence Scanner v 1.0. и MEGA X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в международной базе данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>).

У 9 исследуемых штаммов-деструкторов, выделенных из загрязненных экосистем РФ, нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *bphA1* депонированы в базу данных GenBank, под номерами: KY971637.1/KY978889.1, KY977422.1/KY978890.1, MN078966.1/MN037960.1, MN094599.1/MN037963.1, MT317124.1/MN037957.1, MT317178.1/MN037958.1, MT317307.1/MN037959.1, MN079075.1/MN037961.1, MN080146.1/MN037962.1 (приложение 2).

2.9.6. Детекция плазмидной ДНК

Наличие плазмидной ДНК выявляли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II (“Bio-Rad Laboratories”, США). Бактерии выращивали на минеральной среде K1 (10 мл) с добавлением бифенила (1 г/л) до $ОП_{600} = 1,0$. Клетки осаждали центрифугированием (13000 об/мин в течение 5 мин) и отмывали дважды PIV-буфером (1М NaCl; 10мМ трис/HCl, pH 7,6). Агарозные блоки готовили согласно рекомендациям производителя (“Bio-Rad Laboratories”, США), обрабатывали лизирующим буфером (10 мМ трис/HCl, pH 7,2; 20 мМ NaCl; 50 мМ ЭДТА, pH 8,0; N-лаурилсаркозин – 0,6 мг/мл; лизоцим – 1 мг/мл) при $+37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5–16 ч. Затем отмывали блоки Wash-буфером (20 мМ трис/HCl, pH 8; 50 мМ ЭДТА) и добавляли ES-буфер (1 % N-лаурилсаркозин; 0,5М ЭДТА) с протеиназой K (1 мг/мл), инкубацию проводили при $+50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 12–18 ч.

Электрофорез образцов осуществляли в 1 %-ном агарозном геле Pulsed Field Certified Agarose (“Bio-Rad Laboratories”, США) в 0,5 TBE-буфере при $14 \pm 1^\circ\text{C}$, 6 В/см, время пульсации от 60 с до 120 с в течение 24 ч. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л, 10 мин) и фотографировали в ультрафиолете с использованием системы гель-документации (“Bio-Rad Laboratories”, США). Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США).

2.10. Деструкция хлорированных бифенилов бактериальными штаммами

При изучении деградации ПХБ бактериальные клетки исследуемых штаммов выращивали на минеральной среде K1, используя в качестве единственного источника углерода и энергии бифенил (1 г/л), при температурном режиме $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ с аэрацией на шейкере (200 об/мин), до $ОП_{600} = 1,0$. Отмытые дважды в среде K1 клетки (1 мл, $ОП_{600} = 2,0$) переносили во флаконы с тифлоновыми крышками, добавляя один из субстратов: моноХБ (2-ХБ, 4-ХБ) до

конечной концентрации 94,2 мг/л или 250 мг/л, диХБ (2,4'-ХБ) – 44,6 мг/л. Далее инкубировали на шейкере при $+28 \pm 1^\circ\text{C}$. Каждый вариант опыта был проведен в трех повторностях.

Для выделения хлорированных бифенилов культуральную жидкость экстрагировали смесью: концентрированная серная кислота (H_2SO_4); 12,5 %-ный ДДС- Na ; гексан (1:10:25), при $+30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 минут на термошейкере (200 об/мин), затем инкубировали образцы в течение ночи при комнатной температуре. Экстракты обезвоживали Na_2SO_4 и анализировали на газовом хромато-масс-спектрометре GC7890A (“Agilent Technology”, США) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0,25 мм. (“Agilent Technology”, США) при программировании температуры. Газ-носитель – гелий (1 мл/мин), деление потока 1:50, расход через колонку 1,0 мл/мин, температура испарителя 250°C . Объем пробы 0,2 мкл. Количественное содержание выделенных хлорбифенилов оценивали на основании сравнения величины полученных пиков и стандартных соединений.

Накопление *хлорбензойных кислот* в среде культивирования регистрировали методом ВЭЖХ, очищенную от бактериальных клеток культуральную жидкость (20 мкл) вносили в установку хроматографа “LKB Bromma” (Швеция) с колонкой (RP-18 250x4.6 мм; Alltech, с диаметром частиц 10 мкм) (Maltseva *et al.*, 1999). Подвижной фазой являлась смесь 0,1 % H_3PO_4 : метанол (40:60), скорость протока составляла 1,25 мл/мин. Продукты деградации хлорбифенилов определяли в УФ при длине волны 254 нм. Идентификацию продуктов метаболизма проводили при сравнении “времени выхода” пиков образовавшихся соединений со стандартами (2-ХБК, 4-ХБК, 2,4-ХБК).

Наличие других продуктов трансформации хлорбифенилов, *2-гидрокси-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновых кислот (ГОФДК)*, определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при λ_{max} от 280 нм до 450 нм.

Динамику *дегалогенирования субстрата* контролировали измерением оптической плотности раствора хлорида серебра, полученного после реакции ионов хлора с азотнокислым серебром, при длине волны 460 нм и 540 нм в культуральной жидкости, освобожденной от клеток.

2.11. Статистическая обработка результатов

Повторность опытов трехкратная. При статистической обработке определяли среднюю арифметическую, стандартное отклонение, доверительный интервал. Для обработки результатов использовали статистический модуль Excel 2019 и программу GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>).

Глава 3. РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ БИФЕНИЛА/ПХБ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ЭКОТОПОВ

Для характеристики разнообразия генов деструкции бифенила/ПХБ в экотопах с техногенной (антропогенной) нагрузкой в различных природных зонах Российской Федерации в качестве объектов исследования выбраны и изучены следующие образцы:

1. донные отложения водных объектов: Анадырский лиман (порт г. Анадырь, полоса прибоя); река Чапаевка, протекающая по территории ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (г. Чапаевск); Каламитский залив Черного моря, торговый порт (г. Евпатория);

2. почва/грунт с территорий предприятий: ПАО “Уралкалий” (г. Березники); ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь); Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами (г. Феодосия);

3. сточные воды предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь);

4. почва/грунт с перевала Кыртыкауш (3242 м), республика Кабардино-Балкария.

Из исследуемых образцов, а также накопительных культур, полученных в ходе эксперимента, выделены препараты ДНК. Методом ПЦР проведен скрининг наличия генов, кодирующих α -субъединицы ферментов подсемейства бензол/толуол диоксигеназ (Б/Т ДО), которые принимают участие в начальном этапе разложения ароматических соединений (в том числе бифенила и хлорированных бифенилов). Со всех препаратов ДНК с использованием специфичных праймеров (Iwai *et al.*, 2010, Шумкова и др., 2015) к генам Б/Т ДО (*bphA1*-генам) получены ПЦР-продукты, за исключением ДНК матрицы из образца почвы с перевала Кыртыкауш. На основании полученных результатов было высказано предположение о наличии в исследуемых микробных сообществах (подвергшихся длительному техногенному загрязнению) бактерий, ассоциированных с деструкцией ароматических соединений, в том числе бифенила/ПХБ.

3.1. Гены деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*) в микробном сообществе донных отложений прибрежной зоны порта Анадырь

Методом накопительного культивирования с образцом донных отложений Анадырского залива (порт г. Анадырь, полоса прибоя) на минеральной среде, имитирующей состав морской воды (см. раздел 2.2) с внесением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии получена ассоциация микроорганизмов. Культивирование осуществлялось на шейкере с аэрацией при температуре $+10 \pm 2^\circ\text{C}$, данный критерий обусловлен температурными показателями воды Анадырского лимана (от $+10^\circ\text{C}$ до $+16^\circ\text{C}$) в летний период *in situ* (<https://novomariinsk.ru/>).

Из полученной накопительной культуры выделена тотальная ДНК, в составе которой в результате ПЦР с использованием праймеров ВРНД-f3 и ВРНД-r1 (Iwai *et al.*, 2010) выявлены участки *bphA1*-генов, кодирующие активный центр БДО. Далее проведено клонирование и создана библиотека *bphA1*-генов бактерий-деструкторов, входящих в состав микробного сообщества накопительной культуры. Для анализа отобрано 64 рекомбинантных клон. Методом ПЦР с использованием праймеров (Iwai *et al.*, 2010) к гену *bphA1* показано, что все они содержали клонированный фрагмент ДНК размером ~ 500 п.н.

ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеазы *HhaI* позволил выявить три типа амплифицированных нуклеотидных последовательностей. На рисунке 11 представлено 14 произвольно выбранных ампликонов (из исследованных 64), обработанных эндонуклеазой *HhaI*. Дополнительный рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов генов *bphA1* с использованием эндонуклеазы *HaeIII* свидетельствовал в пользу предположения о сходстве генов внутри каждой группы (данные не приведены).

Определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов ДНК из трех выявленных геномогрупп и проведен филогенетический анализ при сравнении с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank.

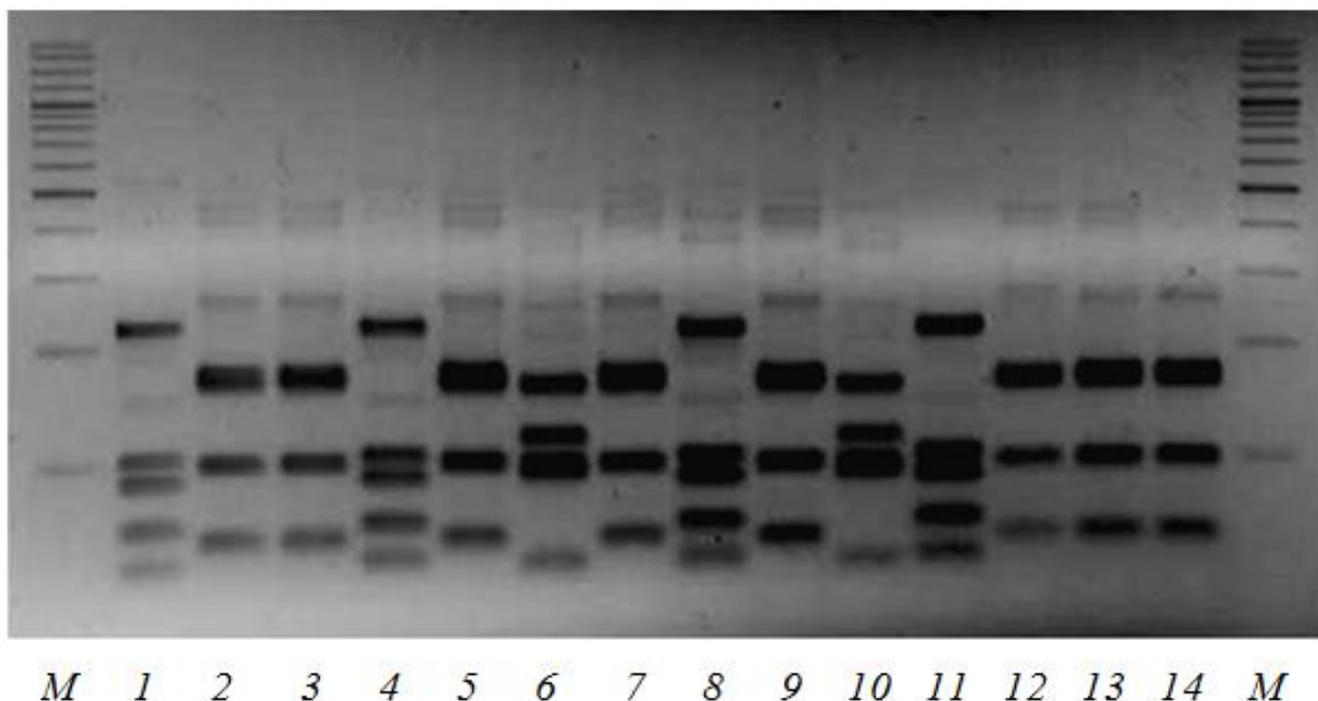


Рисунок 11 – Электрофореграмма рестрикционных фрагментов *bphA1*-генов после обработки эндонуклеазой *HhaI*. Рекомбинантные клоны, геномогруппа I – 2, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 14; геномогруппа II – 1, 4, 8, 11; геномогруппа III – 6, 10. M – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Полученные результаты показали, что на ДНК-матрице, выделенной из исследуемой накопительной культуры, преимущественно амплифицировались гены бактерий порядка *Actinomycetales*. Выявленные нуклеотидные последовательности имели сходство 69–91 % с генами, кодирующими α -субъединицы диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо (таблица 4).

Ранее S. Gallego с соавторами (2014) исследовали накопительную культуру, полученную после культивирования на пирене морского грунта, загрязненного нефтью. Молекулярно-генетическими методами было показано, что актинобактерии составляли 16 % от общего количества бактерий в микробном сообществе, но представителей этой группы не удалось выделить в чистые культуры, при этом актинобактерии являлись основными деструкторами пирена (Gallego *et al.*, 2014).

Таблица 4 – Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон (геномо-группа)	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
9b (I) 491 п.н.*	Ген α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо; <i>Rhodococcus</i> sp. ABRD24	CP035319.1	82,7	Донные отложения пресного водоема (Южная Корея)	Jin <i>et al.</i> , 2019
	Ген α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо; <i>Rhodococcus soli</i> 102-Na5	MF785301.1	82,3	Донные отложения, Желтое море (Республика Корея)	Lee <i>et al.</i> , 2018
	Ген α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо; <i>Rhodococcus hoagie</i> 002-8	MF785295.1	81,7	Донные отложения, Желтое море (Республика Корея)	Lee <i>et al.</i> , 2018
8i (II) 518 п.н.*	Ген α -субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Janibacter</i> sp. TYM3221	AB733643.1	91,3	Почва, загрязненная 1,1-дихлор-2,2-бис (4-хлорфенил) этиленом (ДДЭ)	Nguyen <i>et al.</i> , 2011
	Ген α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо; <i>Terrabacter</i> sp. DDE-1	FJ770334.1	90,8	Почва, загрязненная 1,1-дихлор-2,2-бис (4-хлорфенил) этиленом (ДДЭ)	Aislabie <i>et al.</i> , 1999
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); клон NS7, некультивируемая бактерия	JN675903.1	77,5	Почва карьеров – “La Brea Tar Pit” (США, Лос-Анджелес)	н.д.
5b (III) 506 п.н.*	Ген α -субъединицы гипотетической диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо; клон 4S.1, некультивируемая морская бактерия	FJ770337.1	68,9	н.д.	н.д.

Примечание. * – количество сравниваемых пар нуклеотидов; н.д. – нет данных.

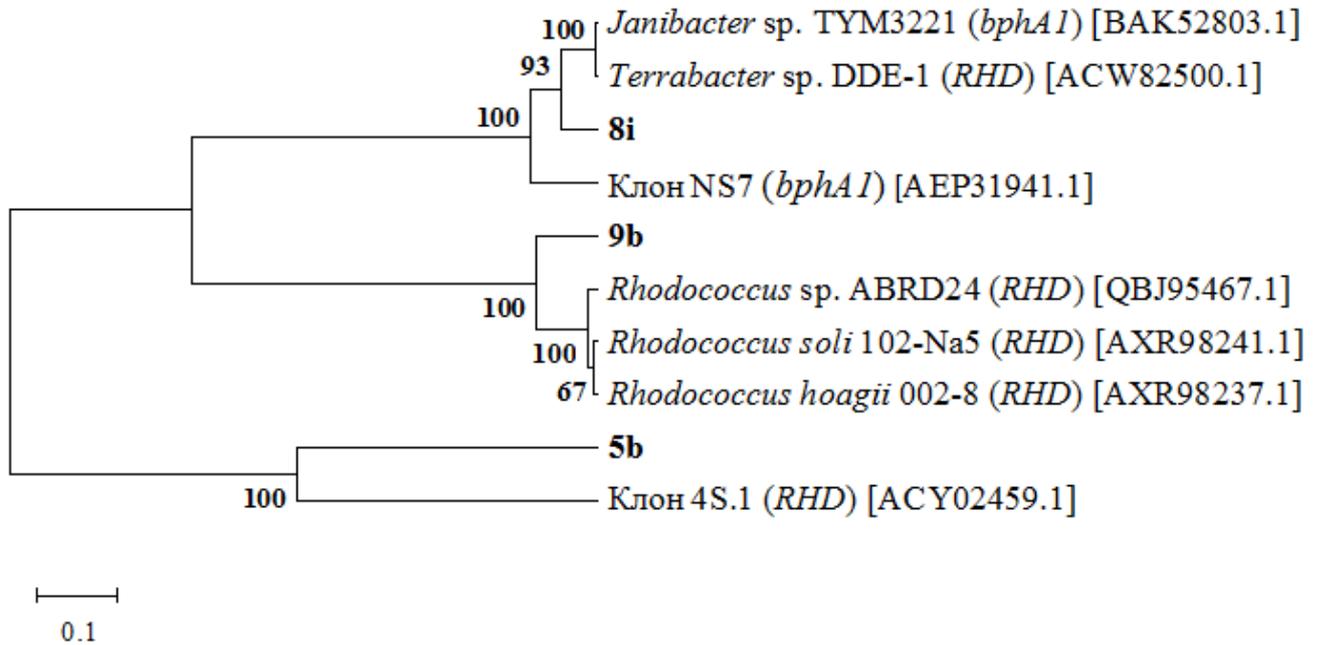


Рисунок 12 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

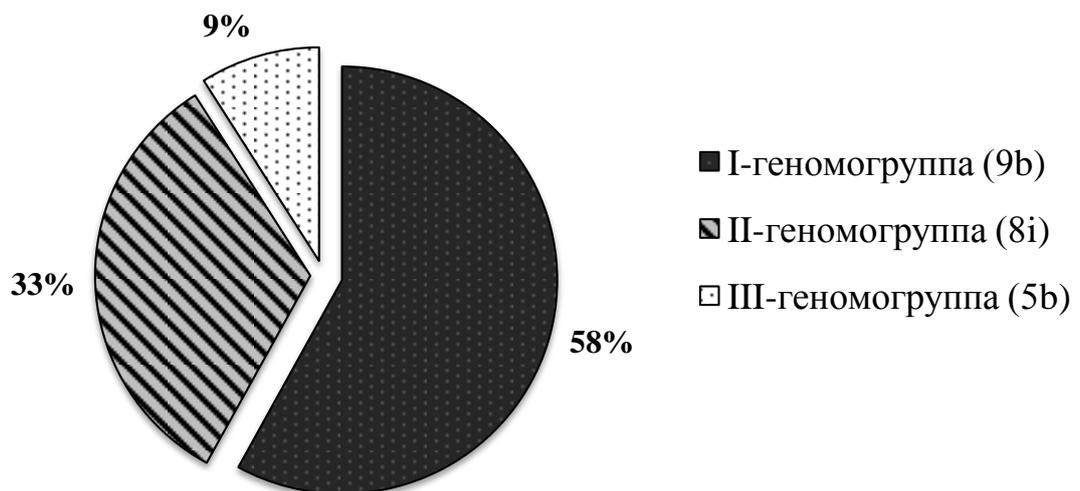


Рисунок 13 – Процентное соотношение исследуемых рекомбинантных клонов. Микробное сообщество донных отложений порта Анадырь.

В ходе биоинформационного анализа полученных данных, было установлено, что клон 9b (I геномгруппа, ~ 58 % от общего количества рекомбинантных клонов (рисунок 13)) содержал последовательность, сходную с генами α -субъединицы ДО, гидроксимирующей ароматическое кольцо, бактерий рода *Rhodococcus*. Наибольшее сходство с генами α -субъединицы БДО (*bphA1*) наблюдалось для нуклеотидной последовательности клона 8i (II геномгруппа, 33 % от общего количества рекомбинантных клонов) представителей родов *Janibacter* и *Terrabacter*. Клон 5b (III геномгруппа, ~ 9 % от общего количества) имел нуклеотидную последовательность на 68,9 % сходную с геном α -субъединицы ароматической ДО некультивируемой морской бактерии (GenBank FJ770337). Относительно невысокий процент сходства говорит о том, что гены III геномгруппы могут кодировать α -субъединицу неизвестной ранее БДО или другой ароматической диоксигеназы со сходной структурой, либо представляют собой псевдоген ароматической диоксигеназы.

Следовательно, гены, выявленные в бактериальной ассоциации донных отложений района порта Анадырь, детерминируют ферменты специфичные к ароматическим соединениям (АС) (в т.ч. бифенилу, ПХБ). Можно предположить, что в исследуемом микробном сообществе основная роль в деструкции АС принадлежит трем типам бактериальных генов, в том числе генам *bphA1*. Однако в ходе дальнейшего исследования из микробного сообщества донных отложений прибрежной зоны порта Анадырь не удалось выделить штаммы-деструкторы.

3.2. Характеристика бактериального сообщества и анализ *bphA1*-генов поверхностного слоя шламохранилища калийного предприятия (г. Березники)

ПЦР-РВ-анализ. Наличие копий бактериальных генов 16S рРНК и РАН-RND α , кодирующих гидроксимирующие диоксигеназы, в тотальной ДНК, выделенной из образца поверхностного слоя шламохранилища БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” (В18) определяли с использованием метода количественного анализа (ПЦР-РВ). В результате эксперимента получены данные, анализ которых

позволил заключить, что в исследуемом бактериальном сообществе присутствовали гены 16S рРНК в количестве $1,31 \times 10^{11}$ ($\pm 1,28 \times 10^8$) копий гена на 1 г образца, в то время как количество копий РАН-RHD α GN-генов составило $3,8 \times 10^7$ ($\pm 5,7 \times 10^7$) на 1 г образца. Следует отметить, что набор праймеров, с помощью которого был получен ПЦР-продукт гена РАН-RHD α GN, сконструирован для детекции генов (*nahAc*, *nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* и *arhA1*) грамотрицательных бактерий-деструкторов ароматических соединений родов *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* и *Sphingomonas* (Cébron *et al.*, 2008). Копии РАН-RHD α GP-генов диоксигеназ грамположительных бактерий не детектированы в тотальной ДНК исследуемого образца. Таким образом, полученные результаты указывают на присутствие в исследуемом микробном сообществе шламоохранилища грамотрицательных бактерий-деструкторов полициклических ароматических углеводов, в том числе бифенила/ПХБ.

Доля бактерий способных к деградации ПАУ, бифенил/ПХБ (представленная соотношением количества копий гена РАН-RHD α к количеству копий гена 16S рРНК) в исследуемом микробном сообществе довольно высока и составляет около 10^{-4} . Наличие значительного количества бактерий-деструкторов ароматических соединений можно объяснить присутствием в отобранных пробах высоких концентраций органических загрязнителей, в том числе ароматических углеводов, фталатов (см. раздел 2.1).

Для дальнейшего исследования разнообразия *bphA1*-генов и выявления бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ в микробном сообществе поверхностного слоя шламоохранилища проведены эксперименты по клонированию генов, кодирующих α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы.

Клонирование *bphA1*-генов. С матрицы тотальной ДНК получен ПЦР-продукт фрагмента гена *bphA1*, кодирующего активный центр БДО, при использовании специфичных праймеров (Iwai *et al.*, 2010). Методом клонирования исследуемых ПЦР-фрагментов в клетки *E. coli* JM109 в составе плазмиды рTZ57R/Г создана библиотека *bphA1*-генов. При помощи ПДРФ-

анализа с использованием эндонуклеазы *HhaI* было отобрано 33 рекомбинантных клон, которые отнесены к 5 геномогруппам. На рисунке 14 представлено 10 произвольно выбранных рекомбинантных клонов (из 33 клонов).

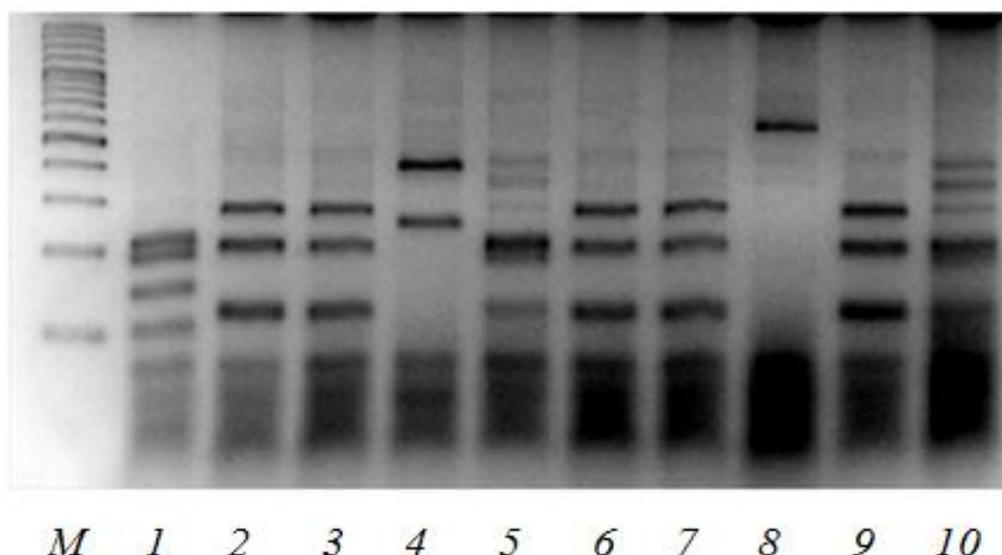


Рисунок 14 – Электрофореграмма рестрикционных фрагментов *bphA1*-генов после обработки эндонуклеазой *HhaI*. Рекомбинантные клоны, геномогруппа I – 1; геномогруппа II – 2, 3, 6, 7, 9; геномогруппа III – 4; геномогруппа IV – 5, 10; геномогруппа V – 8. M – маркер O’GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

В микробном сообществе шламохранилища предприятия БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” выявлены нуклеотидные последовательности, имеющие наибольший уровень сходства с таковыми некультивируемых бактериальных клонов, в частности, имеющими 85,51–86,72 % сходства с геном бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA*) и 86,12–86,32 % сходства с геном катехол 2,3-диоксигеназы. Анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых клонов выявил наибольшее сходство с генами бактерий рода *Pseudomonas* (~ 80 % анализируемых последовательностей). Секвенированный фрагмент ДНК клона 16В (I геномогруппа, ~ 5 % от общего количества рекомбинантных клонов) имел

85,51–86,72 % процент сходства с генами бифенил 2,3-диоксигеназ (*bphA*) некультивируемых бактерий (Koubek *et al.*, 2013; Uhlik *et al.*, 2009).

Таблица 5 – Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон (геномо- группа)	Наиболее близкие гомологичные гены	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
1	2	3	4	5	6
16В (I) 497 п.н.*	Гены бифенил диоксигеназы (<i>bph</i>); клоны С11, В16, В6, некультивируемые бактерии	HQ158286.1,	86,7	н.д.	Koubek <i>et al.</i> , 2013
		HQ158278.1,	85,9		
		HQ158275.1	85,5		
	Гены α -субъединицы бифенил диоксигеназы (<i>bphA</i>); клоны BS-22, HR-07, некультивируемые бактерии	FJ532314.1,	86,5	Свалка отходов ПХБ (Чехия)	Uhlik <i>et al.</i> , 2009
		FJ532315.1	85,9		
	Гены катехол 2,3-диоксигеназы (<i>c23o</i>); клоны НКТ-CD40, НКТ-CD34, НКТ-CD31, НКТ-CD28, НКТ-CD11, НКТ-CD39, НКТ-CD14, некультивируемые бактерии	HE608935.1,	86,1	н.д.	н.д.
		HE608929.1,	–		
		HE608927.1,	86,3		
		HE608924.1,			
		HE608915.1,			
		HE608934.1,			
		HE608917.1			
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas alcaligenes</i> В-357	EF596934.1	85,9	Активный ил	Vézina <i>et al.</i> , 2008
21В (III) 497 п.н.* / 31В (V)	Ген α -субъединицы кумол диоксигеназы (<i>cumA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. PWD32	KT160226.1	81,2 /	н.д.	н.д.
			81,2 / 81,2		
497 п.н.* / 38В (II) 502 п.н.*	Ген бифенил диоксигеназы (<i>bph</i>); клон К16, некультивируемая бактерия	HQ158296.1	81,09 /	н.д.	Koubek <i>et al.</i> , 2013
			81,09 / 80,48		

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
	Ген α -субъединицы алкилбензол диоксигеназы (<i>ebdAa</i>); <i>Pseudomonas putida</i> ORF1	AJ293587.1	80,8 / 80,8 / 80,8	Почва, загрязненная толуолом	Chablain <i>et al.</i> , 1997
	Ген α -субъединицы этилбензол диоксигеназы (<i>edoA1</i>); <i>Pseudomonas fluorescens</i> CA-4	AF049851.1	80,7 / 80,7 / 80,3	Биореактор	Corkery, Dobson, 1998
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. JR1	U53507.1	80,7 / 80,7 / 80,3	н.д.	Pflugmacher <i>et al.</i> , 1996
	Ген α -субъединицы изопропилбензол диоксигеназы (<i>ipbAa</i>); <i>Pseudomonas putida</i> RE204	AF006691.1	80,4 / 80,4 / 80,4	Донные отложения р. Рона (Швейцария)	Eaton, Timmis, 1986
	Ген α -субъединицы негемового железосерного белка ISP; <i>Pseudomonas</i> sp. 3YdVTEX2, 1YB2, 1XB1	DQ336944.1, DQ336937.1, DQ336933.1	80,4, 80,4, 80,6 / 80,4, 80,4, 80,6 / 80,9, 80,9, 81,1	Почва, загрязненная бензолом, толуолом, этилбензолом и ксилолами (Чехия)	Witzig <i>et al.</i> , 2006
30В (IV) 475 п.н.*	Гены α -субъединицы гидроксимирующих диоксигеназ; клоны GV2, B18, некультивируемые бактерии	AF125913.1, AF125908.1	77,1, 72,6	Загрязненная почва	Yeates <i>et al.</i> , 2000

Примечание. * – количество сравниваемых пар нуклеотидов; н.д. – нет данных.

Наиболее высокий процент сходства (85,92 %) наблюдался с геном большой α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*) штамма-деструктора бифенила/ПХБ *Pseudomonas alcaligenes* B-357 (Vézina *et al.*, 2008). Штамм *P. alcaligenes* B-357 был выделен из активного ила и характеризовался активным ростом на бифениле и 4-хлорбифениле, используя данные соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Результаты исследования показали,

что штамм *P. alcaligenes* В-357 способен осуществлять трансформацию 4-ХБ в 4-хлорбензойную кислоту (Ahmad *et al.*, 1990).

Клон 30В (IV геномогруппа, ~ 5 % от общего количества рекомбинантных клонов (рисунок 15)) имел наибольший, но относительно не высокий процент сходства (< 80 %) с генами некультивируемых бактерий, которые были обнаружены С. Yeates с соавторами (2000) в ходе изучения разнообразия генов, кодирующих ароматические диоксигеназы (RHDs – Ring-Hydroxylating Dioxygenases) в загрязненной почве с территории электростанции (г. Сидней, Австралия) (Yeates *et al.*, 2000).

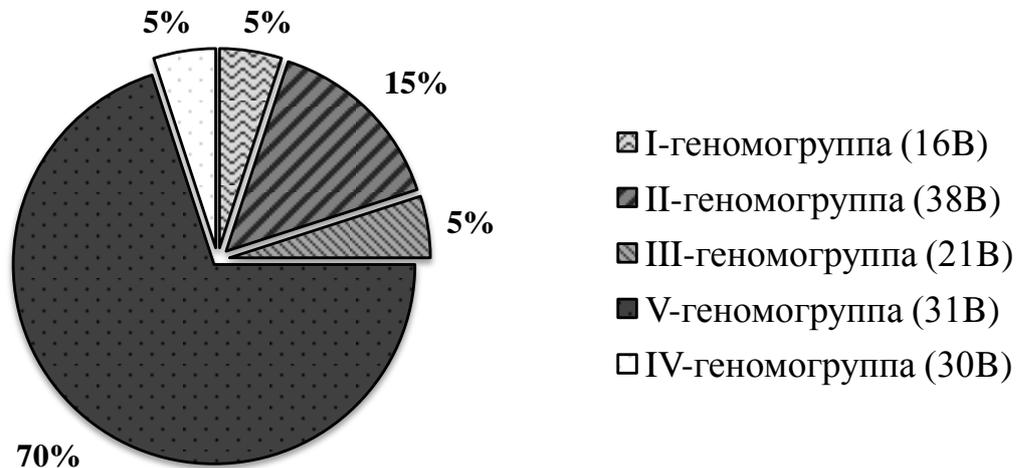


Рисунок 15 – **Процентное соотношение исследуемых рекомбинантных клонов.** Микробное сообщество поверхностного слоя шламохранилища калийного предприятия (г. Березники, Пермский край).

На дереве, определяющем положение генов *bphA1* анализируемых клонов (с использованием транслированных аминокислотных последовательностей этих генов) наблюдается формирование отдельной ветви, включающей клоны GV2, B18 (гены α -субъединицы гидроксилирующих диоксигеназ) некультивируемых бактерий и исследуемого клона 30В (рисунок 16). Наряду с этим можно предположить, что выявленный в микробном сообществе шламохранилища клон

30В относится к неизвестной ранее ароматической диоксигеназе (не исключено, БДО).

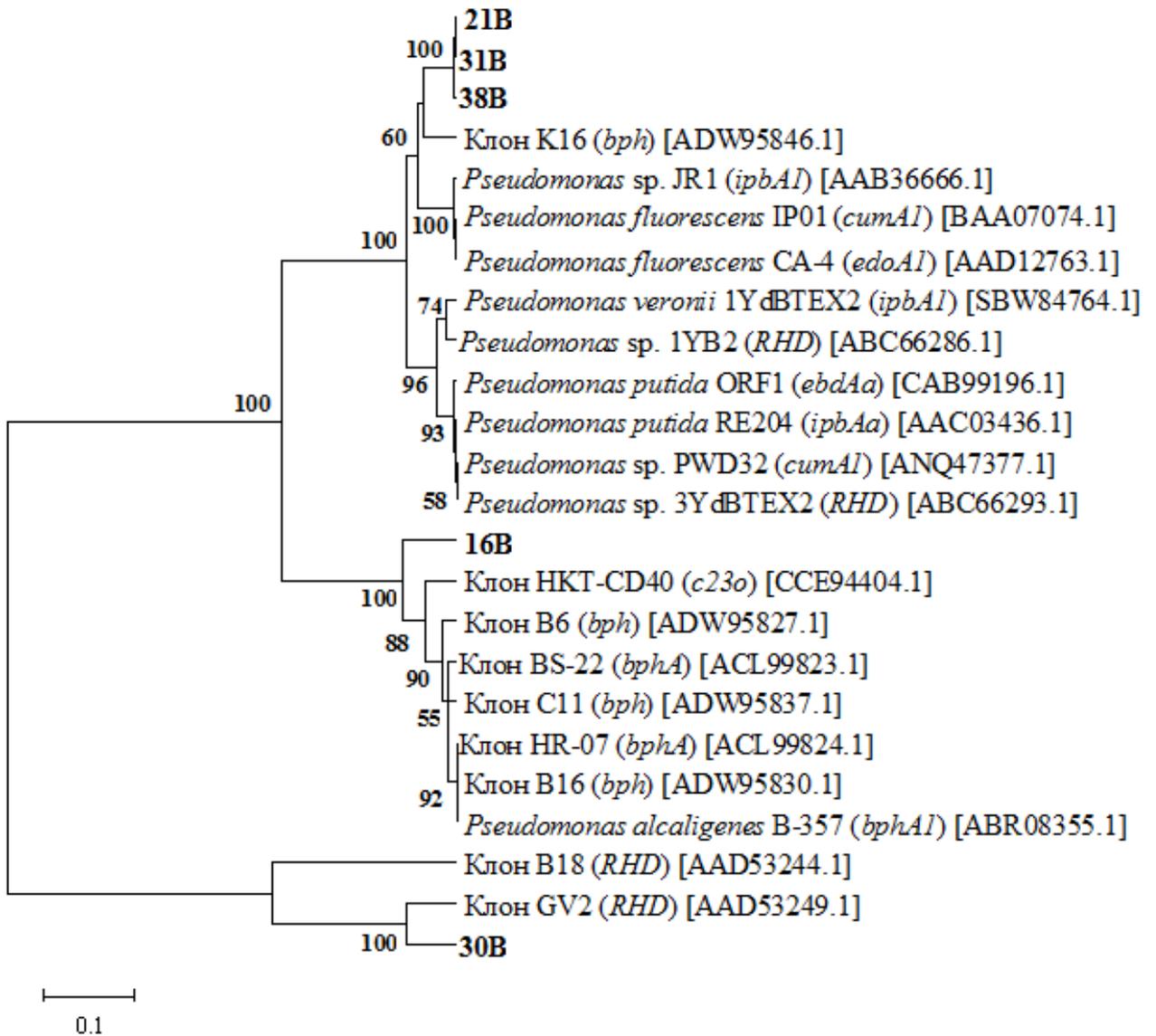


Рисунок 16 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

J. Koubek с соавторами (2013) исследовали микробное сообщество ПХБ-загрязненного Стразского канала (Словакия). Авторами статьи проанализирована популяция бактерий с использованием метода стабильного изотопного

зондирования (DNA-SIP). В качестве меченых субстратов выступали ^{13}C -бифенил и ^{13}C -4-хлорбифенил. Далее, с тотальной ДНК, выделенной из исследуемых накопительных культур, методом ПЦР с праймерами к *bphA1*-генам были получены ПЦР-фрагменты, которые в дальнейшем клонировали в клетках *E. coli* DH5a. В результате клонирования было получено 11 уникальных последовательностей (в том числе С11, К16, В6, В16). В ходе филогенетического анализа проведено сравнение *bphA1*-генов клонов с известными активными штаммами-деструкторами бифенила/ПХБ *R. eutropha* H850, *P. pseudoalcaligenes* KF707 и *B. xenovorans* LB400. Наиболее высокий процент сходства наблюдался со штаммом *P. pseudoalcaligenes* KF707. Данный штамм является уникальным благодаря своей способности к утилизации ди-*n*-пара-хлорированных бифенилов (Koubek *et al.*, 2013).

При сравнении ПЦР-фрагмента исследуемого клона 16В с таковыми некультивируемых бактериальных клонов и штаммом-деструктором *P. alcaligenes* В-357 показан наивысший процент сходства с генами бифенил 2,3-диоксигеназ, в то же время, клоны 21В, 31В и 38В характеризуются наличием сходства с генами, кодирующими α -субъединицы кумол диоксигеназы (*cumA1*), этилбензол диоксигеназы (*edoA1*), изопропилбензол диоксигеназы (*ipbA1*), алкилбензол диоксигеназы (*ebdAa*) (таблица 5), ответственными за деградацию ароматических соединений представителей рода *Pseudomonas*. Присутствие в микробном сообществе шламохранилища предприятия БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” генов различных кольцевых гидроксимирующих диоксигеназ (RHDs) может указывать на то, что на исследуемой территории присутствуют бактерии-деструкторы не только бифенила, но и других ароматических соединений.

Данное предположение подтверждается проведенным ранее исследованием бактериальных сообществ шламов и почв/грунтов с территории калийных предприятий БКПРУ-1 и БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” (г. Березники, Пермский край), в результате которого было выявлено присутствие ключевых генов деструкции ароматических соединений. Так, методом ПЦР проведен скрининг РАН-RHD α -генов, кодирующих α -субъединицу диоксигеназ, гидроксимирующих

ароматическое кольцо (Cébron *et al.* 2008). По итогам амплификации обнаружены искомые ПЦР-фрагменты (302 п.н.). Далее был выбран образец шлама предприятия БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” и методом клонирования создана библиотека РАН-RHD α -генов бактерий-деструкторов, входящих в состав исследуемого микробного сообщества. Последующее секвенирование рекомбинантных клонов и биоинформационный анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что в образце шлама присутствуют гены α -субъединицы нафталин диоксигеназы (*narAa*) и α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо углеводов (RHDs), преимущественно некультивируемых форм бактерий и ряда штаммов рода *Pseudomonas* (Корсакова и др., 2017).

Таким образом, анализируя все полученные нами результаты при исследовании разнообразия *bphA1*-генов микробного сообщества шламохранилища калийного предприятия, можно предположить, что в представленном экотопе присутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений (в том числе, бифенила/ПХБ). Данное предположение не противоречит результатам ПЦР-РВ анализа (см. выше).

Исследуемые нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов *bphA1*-генов депонированы в международную базу GenBank (приложение 1).

3.3. Характеристика бактериального сообщества и анализ *bphA1*-генов почвы/грунта около солеотвала (г. Березники)

С образцом грунта В22, отобранного на расстоянии 5 метров от солеотвала “Уралкалий” БКПРУ-3, поставлено накопительное культивирование (НК) на среде К1 с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии. Для дальнейшего изучения исследуемого микробного сообщества непосредственно из почвы, а также из НК, получены препараты ДНК.

ПЦР-РВ-анализ. В образце грунта (В22), отобранного вблизи солеотвала БКПРУ-3, с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени обнаружено наличие копий бактериальных генов 16S рРНК в количестве $6,6 \times 10^{10}$ ($\pm 8,87 \times 10^7$) на 1 г грунта. Количество копий РАН-RHD $_{\alpha}$ -генов грамотрицательных бактерий составило $2,83 \times 10^9$ ($\pm 5,21 \times 10^8$) на 1 г образца. При использовании праймеров РАН-RHD $_{\alpha}$ GPF и РАН-RHD $_{\alpha}$ GPR (см. раздел 2.5) не зафиксировано присутствие генов гидроксилирующих диоксигеназ грамположительных бактерий.

При сравнительном анализе результатов ПЦР-РВ двух микробных сообществ калийного предприятия БКПРУ-3 (ПАО “Уралкалий”) следует отметить, что в грунте вблизи солеотвала (образец В22) общее количество бактерий, рассчитанное на основании выявленных копий генов 16S рРНК, ниже, чем в поверхностном слое шламахранилища (образец В18), в то время как в отношении количества бактерий-деструкторов ароматических соединений (копий генов РАН-RHD $_{\alpha}$) действует обратная закономерность – в микробном сообществе образца В22 это значение выше почти на 2 порядка.

Денатурирующий градиентный гель электрофорез (ДГГЭ).

Для характеристики таксономического состава бактерий образца почвы/грунта, а также накопительной культуры (НК) на бифениле, полученной на основе этого образца, использовали метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ-метод), основанный на разделении амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК в химическом денатурирующем градиенте. При проведении ДГГЭ-анализа установлено, что исследуемое микробное сообщество характеризуется таксономическим разнообразием, а ДГГЭ-профили НК и бактериального сообщества почвы отличались наличием мажорных (доминантных) полос. Можно предположить, что в НК, в процессе продолжительного культивирования на селективном субстрате (бифениле), увеличивается численность бактерии-деструкторов, пропорционально увеличивая исследуемый генетический материал (гены 16S рРНК). На электрофореграмме образца НК наблюдаются мажорные (доминантные) полосы (рисунок 17).

В ряде работ показано, что при загрязнении почвенных экосистем ароматическими углеводородами менялась видовая структура микробных

сообществ, при этом не снижалось бактериальное разнообразие (Feris *et. al.*, 2004; Vinas *et. al.*, 2005). Из других исследований известно, что загрязнение почвы нефтепродуктами приводило к снижению видового разнообразия микробных сообществ при увеличении общей численности бактерий (Castle *et. al.*, 2006; Панов и др., 2013).

Фрагменты гена 16S рДНК, отличающиеся электрофоретической подвижностью при разгонке ДГГЭ, были элюированы из геля и реамплифицированы. У 9 фрагментов 16S рДНК были определены нуклеотидные последовательности и осуществлен филогенетический анализ (рисунок 17, таблица 6).



Рисунок 17 – ДГГЭ продуктов амплификации генов 16S рРНК: 1 – штамм *Rhodococcus* sp. KBV16, выделенный из образца почвы/грунта, отобранного вблизи солеотвала (образец В22; см. раздел 4.2); 2 – накопительная культура образца В22 с бифенилом в качестве субстрата; 3 – препарат totalной ДНК образца В22.

Таблица 6 – Результаты филогенетического анализа элюированных из геля фрагментов гена 16S рРНК

№ полосы ДГГЭ	Штамм ближайшего родственного вида	Номер в базе данных GenBank	Сходство фрагмента гена 16S рРНК, %	Кол-во анализированных нуклеотидов
1-4	Некультивируемый бактериальный клон <i>Acidobacterium</i> sp. mrtpkts1	JQ065958.1	99	408
	<i>Acidobacteria bacterium</i> A24 SHP 5 238 ^T	KX443571.1	97	
5	Некультивируемый бактериальный клон <i>Acidobacterium</i> sp. mrtpkts1	JQ065958.1	99	400
	<i>Tellurimicrobium multivorans</i> Ac_18_E7 ^T	NR_146026.1	97	
6	Некультивируемый бактериальный клон класса <i>Verrucomicrobia</i> AUVE 05A08	EF651189.1	99	349
	<i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428 ^T	NR_115225.1	86	
7	Некультивируемый бактериальный клон <i>Sphingobacterium</i> sp. RLBp5164	KC453719.1	97	429
	<i>Flavitalea antarctica</i> AQ6-291 ^T	KX146487.1	95	
8	<i>Burkholderia fungorum</i> LMG 16225 ^T	NR_025058.1	85	481
9	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> DSM 44107 ^T	NR_118605.1	100	470

Установлено, что в тотальной ДНК образца В22 (накопительная культура) присутствуют гены 16S рРНК, имеющие 100 % сходство с генами типового штамма *Rhodococcus wratislaviensis* DSM 44107^T – полоса №9 (рисунок 17).

Из образца грунта около солеотвала был выделен штамм КВВ16 – деструктор бифенил/ПХБ рода *Rhodococcus*, близкородственный виду *Rhodococcus wratislaviensis* (см. раздел 4.2). На рисунке 17 полоса разгонки продукта амплификации гена 16S рРНК штамма КВВ16 совпадает с полосой №9.

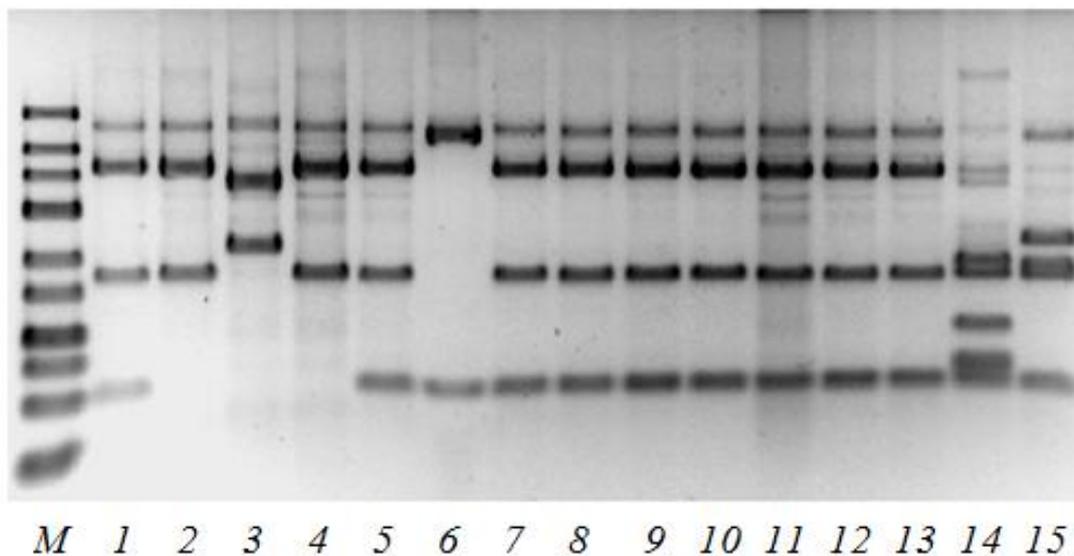
В то же время, на этом уровне не наблюдалось полосы при разгонке тотальной ДНК (дорожка 3), выделенной из образца грунта, что может свидетельствовать об увеличении количества клеток бактерий-деструкторов при культивировании на бифениле.

Кроме того, филогенетический анализ показал, что в микробном сообществе присутствовали некультивируемые бактерии родов *Acidobacterium* (99 % сходства), *Sphingobacterium* (97 % сходства) и класса *Verrucomicrobia* (уровень сходства 99 %) (таблица 6).

Клонирование *bphA1*-генов. В ходе дальнейшего исследования с выделенной ДНК из накопительной культуры, при использовании праймеров к участку гена α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, кодирующему кластер Риске [2Fe-2S], (Шумкова и др., 2015), получен ПЦР-продукт, который трансформировали в клетки *E coli* JM109 в составе плазмиды pTZ57R/T. В результате клонирования ПЦР-продукта создана библиотека *bphA1*-генов бактерий-деструкторов исследуемого микробного сообщества. Для последующего анализа отобраны рекомбинантные клоны в количестве 73. При выявлении сходства и различий между клонированными участками гена *bphA1* проведен ПДРФ-анализ полученных ампликонов. По результатам гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции *HhaI* исследуемые клоны разделили на 9 геномогрупп (рисунок 18, рисунок 20). У представителей каждой геномогруппы определили нуклеотидные последовательности участков *bphA1*-генов и провели филогенетический анализ, заключающийся в сравнении с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank (таблица 7).

Результаты исследований показали, что в микробном сообществе грунта вблизи солеотвала предприятия БКПРУ-3 (г. Березники) присутствуют бактерии-деструкторы, содержащие гены, наиболее сходные с генами 5 типов диоксигеназ: бифенил 2,3-диоксигеназой (*bphA1*), изопропилбензол 2,3-диоксигеназой (*ipbA1*), бензотрифторид 2,3-диоксигеназой (*btfA1*), бензол 2,3-диоксигеназой (*bnzA1*) и толуол 2,3-диоксигеназой (*terpA*) бактерий рода *Rhodococcus*, семейства *Burkholderiaceae* и некультивируемых бактерий (таблица 7).

А



Б

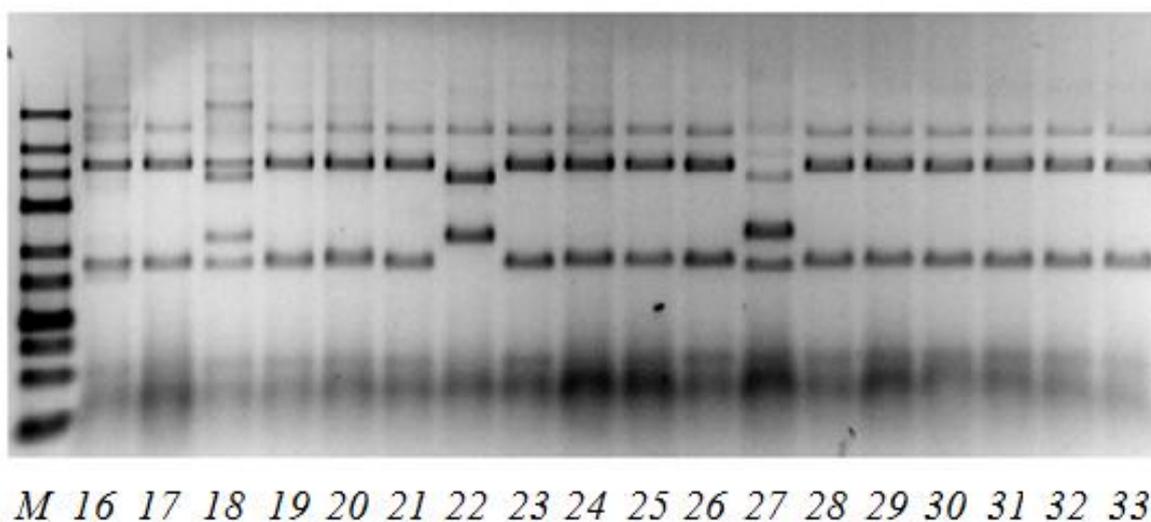


Рисунок 18 – Электрофореграммы рестрикционных фрагментов *bphA1*-генов после обработки эндонуклеазой *HhaI* (А, Б). Рекомбинантные клоны, геномогруппа I – 1, 5, 7-13, 17, 19-21, 23-26, 28-33; геномогруппа II – 2, 4; геномогруппа III – 3, 22; геномогруппа IV – 6; геномогруппа V – 14; геномогруппа VI – 15; геномогруппа VII – 16; геномогруппа VIII – 18; геномогруппа IX – 27. М – маркер O’GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Таблица 7 – Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон, (геномо- группа)	Наиболее близкие гомологичные гены	Номер GenBank	Сход-ство, %	Место выделения	Ссылка
1	2	3	4	5	6
2а (I), 434 п.н.*/	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA</i>); <i>Rhodococcus</i> <i>wratislaviensis</i>	JX569344.1	99,3 / 99,7 / 99,3 / 98,8 / 98,8 /	н.д.	н.д.
3а (II), 434 п.н.*/	IFP2016		99,3 / 99,5		
13а (IV), 434 п.н.*/	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> BD2	U24277.1	99,3 / 99,7 / 99,3 / 98,8 / 98,8 /	н.д.	Kessler <i>et al.</i> , 1996
36а (VI), 434 п.н.*/			99,3 / 99,5		
41b (IX), 434 п.н.*/	Ген α -субъединицы бензотрифторид 2,3- диоксигеназы (<i>btfA1</i>); <i>Rhodococcus</i> sp.	AB970510.1	99 / 99,5 / 99 / 98,6 / 98,6 /	н.д.	Yano <i>et al.</i> , 2015
4а (III), 442 п.н.*/	065240		99,1 / 99,3		
35b (VIII), 442 п.н.*	Ген α -субъединицы бензол диоксигеназы (<i>bnzA1</i>); <i>Rhodococcus</i> <i>opacus</i> B4 (pROB02)	AP011117.1	99 / 99,5 / 99 / 98,6 / 98,6 / 99,1 / 99,3	Территория химических заводов (Хиросима, Япония)	Na <i>et al.</i> , 2005
	Ген α -субъединицы толуол диоксигеназы (<i>terpA</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. L4	EF527236.1	99 / 99,5 / 99 / 98,6 / 98,6 / 99,1 / 99,3	Ил из очистных сооружений химического завода (Тайланд)	н.д.

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	D32142.1	98,6 / 99 / 98,6 / 98,1 / 98,1 / 98,6 / 98,8	Загрязненная почва (Япония)	Masai <i>et al.</i> , 1995
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P20	KC832467.1	99,7 / 99,7 / 99,7 / 98,9 / 99,2 / 99,7 / 99,7	Территория завода ОАО “Галоген”, (г. Пермь)	Шумкова и др., 2015
18b (VII), 455 п.н.*	Ген α -субъединицы бифенил диоксигеназы (<i>bphA</i>); <i>Pandoraea pnotenus</i> B-356	U47637.1	86,6	н.д.	Sylvestre <i>et al.</i> , 1996
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Burkholderia</i> sp. JB1	AJ010057.1	86,6	н.д.	н.д.
35a (V), 440 п.н.*	Ген бифенил диоксигеназы (<i>bph</i>); клон - fosmid K404-431, некультивируемая бактерия	KX576333.1	81,3	Почва, загрязненная ПАУ	Duarte <i>et al.</i> , 2017

Примечание. * – количество сравниваемых пар нуклеотидов; н.д. – нет данных.

Следует отметить, что с ДНК-матрицы, выделенной из исследуемой почвы, амплифицировались преимущественно гены бактерий рода *Rhodococcus* (~ 97 % от общего количества рекомбинантных клонов), показывающие наибольшее сходство с генами *ipbA1*, *btfA1*, *bnzA1*, *terpA*, а также с генами *bphA1* широко известного активного штамма-деструктора *R. jostii* RHA1 (Masai *et al.*, 1995) и, выделенного из загрязненной почвы города Перми, деструктора *R. wratislaviensis* P20 (Шумкова и др., 2015).

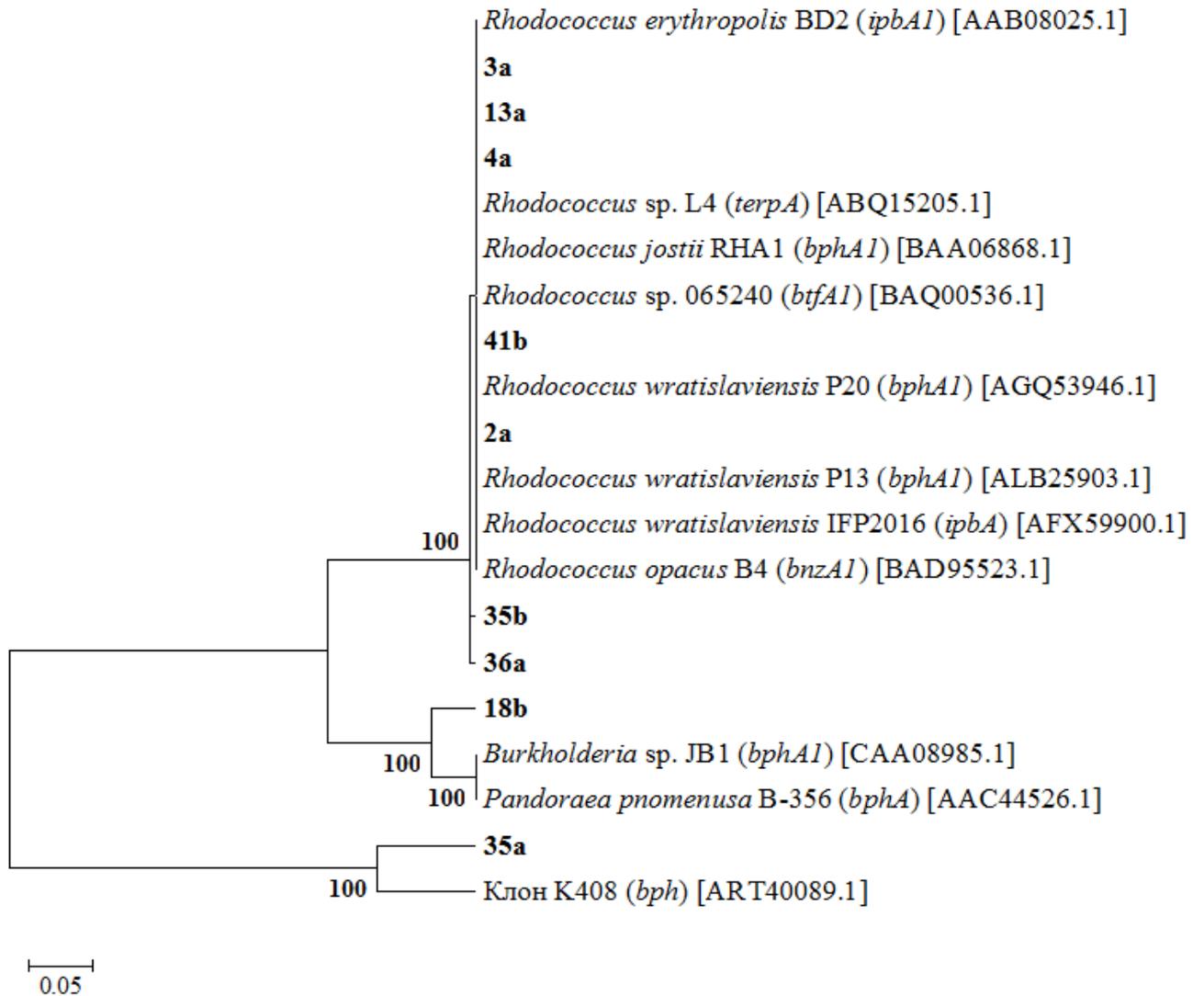


Рисунок 19 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

Наличие в исследуемом образце ДНК нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам гидрокселирующих диоксигеназ родоккоков, может указывать на присутствие в микробном сообществе бактерий-деструкторов ароматических соединений, в том числе и бифенила, с большой вероятностью бактерий рода *Rhodococcus*. Полученные результаты согласуются с данными

ДГГЭ (рисунок 17). Кроме того, из образца В22 был выделен активный штамм-деструктор бифенила/ПХБ рода *Rhodococcus* (см. раздел 4.2).

Рекомбинантный клон 18b (таблица 7) содержал нуклеотидную последовательность, на 86,65 % сходную с геном α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*), грамотрицательных бактерий родов *Burkholderia* и *Pandoraea* (класс *Betaproteobacteria*, семейство *Burkholderiaceae*). В результате накопительного культивирования на бифениле методом ДГГЭ в микробном сообществе образца В22 выявлено присутствие бактерий, наиболее близкородственных роду *Burkholderia* (полоса 8, рисунок 17; таблица 6). Клон 35a имел 81,35 % сходства с геном, кодирующим бифенил диоксигеназу некультивируемой бактерии (Duarte *et al.*, 2017).

С использованием программы MEGA X (<http://www.megasoftware.net>) осуществлено выравнивание и сравнительный анализ исследуемых нуклеотидных последовательностей рекомбинантных клонов, на основании которого можно сделать вывод, что клонированные участки клонов 18b и 35a имеют гетерогенную структуру и отличаются по нуклеотидному составу как между собой, так и от других клонов. Клоны 35b и 4a характеризуются высокой гомологией исследуемых генов между собой, но имеют в нуклеотидных последовательностях единичные замены, тоже можно сказать и о клонах 2a, 3a, 13a, 36a, 41b. Следовательно, можно сделать вывод, что каждая исследуемая (клонированная) нуклеотидная последовательность (*bphA1*) является уникальной. Далее, нуклеотидные последовательности транслировали в аминокислотные и осуществляли повторный сравнительный анализ, который показал высокую степень идентичности аминокислотного состава у сравниваемых клонов (2a, 3a, 4a, 13a, 36a, 35b и 41b) (рисунок 19). По результатам анализа филогенетического дерева, построенного с использованием аминокислотных последовательностей *bphA1*-генов, наблюдалось сходство большей части исследуемых клонов, расположенных на одной ветви с родококками, в то время как клоны 18b и 35a, имеющие ~ 3 % от общего количества рекомбинантных клонов (рисунок 20),

находились на разных ветвях, с представителями грамотрицательных и некультивируемых бактерий (рисунок 19).

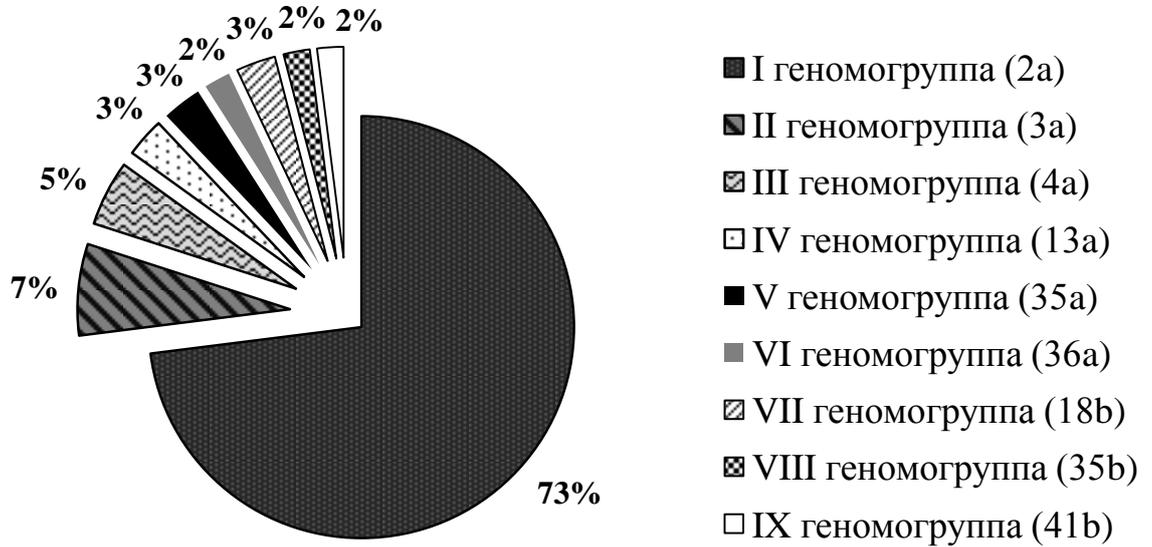


Рисунок 20 – **Процентное соотношение исследуемых рекомбинантных клонов.** Микробное сообщество почвы/грунта около солеотвала (г. Березники, Пермский край).

Таким образом, полученные результаты указывают на гетерогенность генов, контролирующих первый этап разложения бифенила/ПХБ (и ряда других ароматических соединений), в бактериальном сообществе почвы/грунта вблизи солеотвала предприятия БКПРУ-3 (ПАО “Уралкалий”, г. Березники). Несмотря на наличие мутаций в исследуемых генах (*bphA1*) родококков, указывающих на эволюционные процессы, аминокислотная структура транслируемых участков белков не изменилась и филогенетически близка кластеру Риске [2Fe-2S] гидроксигенирующих диоксигеназ (ДО): бифенил 2,3-ДО, изопропилбензол 2,3-ДО, бензотрифторид 2,3-ДО, бензол 2,3-ДО и толуол 2,3-ДО, родококков (таблица 7, рисунок 19). В микробном сообществе выявлены новые функциональные гены, имеющие наибольшее сходство с генами бифенил 2,3-ДО бактерий семейства *Burkholderiaceae* и некультивируемых бактерий на уровне 86,6 %, однако

количество клонов, содержащих эти генетические структуры, невелико и составляет около 6 % от всех исследуемых рекомбинантных клонов. Клонирование *bphA1*-генов осуществлялось с использованием ДНК, выделенной из накопительной культуры, полученной путем селекции на бифениле. Можно предположить, что для представителей рода *Rhodococcus* экспериментальные условия культивирования были более благоприятны, чем для других групп бактерий. В то же время, в общей ДНК, выделенной из нативного образца грунта (образец В22), количество копий генов диоксигеназ, гидроксимирующих ароматическое кольцо (РАН-RHD_α), грамотрицательных бактерий было значительным и составляло $2,83 \times 10^9 (\pm 5,21 \times 10^8)$ на 1 г образца, а РАН-RHD_α-гены грамположительных бактерий методом ПЦР-РВ не были детектированы. Вероятно, родококки не входят в основную группу деструкторов ароматических соединений в микробном сообществе исследуемого экотопа (грунт вблизи солеотвала). Аналогичные данные были получены и при исследовании микробного сообщества образца шлама (шламохранилище БКПРУ-3, г. Березники), где количество копий генов РАН-RHD_α, грамотрицательных бактерий составляло $3,8 \times 10^7 (\pm 5,7 \times 10^7)$ на 1 г образца (см. раздел 3.1.2).

Нуклеотидные последовательности фрагментов *bphA1*-генов исследуемых клонов депонированы в международную базу данных GenBank (приложение 1).

3.4. Гены деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*) в микробном сообществе почвы с территории “Пермского завода смазок и СОЖ”

ПЦР-РВ-анализ. С использованием метода количественного анализа (ПЦР-РВ) в тотальной ДНК, выделенной из почвы, отобранной на территории завода ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ”, выявлено наличие бактериальных генов 16S рРНК в количестве $1,05 \times 10^{11} (\pm 1,59 \times 10^8)$ копий гена на 1 г почвы, обнаружено значительное количество копий РАН-RHD_α-генов ($2,41 \times 10^8 (\pm 3,57 \times 10^7)$ на 1 г почвы), участвующих в окислении ПАУ, бифенила грамотрицательными бактериями. В то же время, при использовании праймеров РАН-RHD_αGPF и РАН-RHD_αGPR не зафиксировано присутствие генов

гидроксимирующихся диоксигеназ грамположительных бактерий. Доля бактерий способных к деградации ПАУ, бифенил/ПХБ (представленная соотношением количества копий гена PAH-RHD_α к количеству копий гена 16S рРНК) в исследуемом микробном сообществе довольно высока и составляет около 10⁻³. Результаты, полученные в данном эксперименте, согласуются с литературными данными. Так, в почвах, подверженных длительному загрязнению фенантеном (полициклическим ароматическим углеводородом), даже при значительном снижении подобного рода техногенного воздействия соотношение бактерий-деструкторов оставалось на прежнем уровне (Nierceron *et al.*, 2014).

Представленные выше результаты указывают на то, что в микробном сообществе исследуемой загрязненной почвы обнаружены бактериальные гены, контролирующие начальные этапы деструкции полиароматических соединений (ПАУ, бифенила/ПХБ).

Клонирование *bphA1*-генов. Для более точного определения наличия бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ и исследования разнообразия генетических систем разложения этих соединений в микробном сообществе использовали олигонуклеотидные праймеры, специфичные к участку гена, кодирующего активный центр α-субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (Iwai *et al.*, 2010). С матрицы тотальной ДНК почвы получен ПЦР-продукт искомого размера (около 500 п.н.), который далее клонирован в клетках *E. coli*. В результате создана библиотека из 72 рекомбинантных клонов, содержащих *bphA1*-гены. Для выявления сходства и различий между клонированными фрагментами гена *bphA1* проведен ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *HhaI*, результаты которого показали, что рестрикционный профиль клонированных участков ДНК отличался размером и числом рестрикционных фрагментов (рисунок 21).

Всего на основании ПДРФ-анализа выявлено четыре геномные группы клонированных *bphA1*-генов, у представителей, которых определены нуклеотидные последовательности и проведен сравнительный анализ с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank (таблица 8).

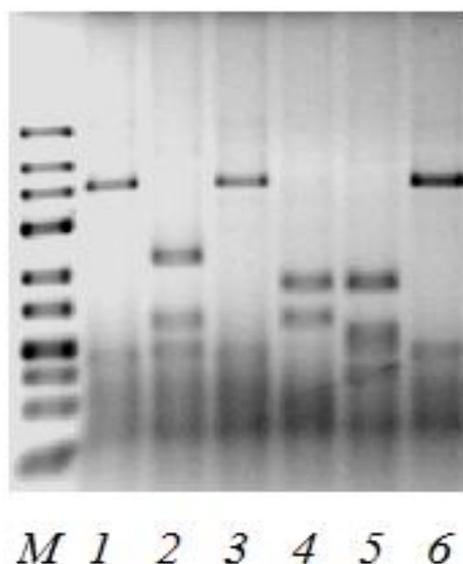


Рисунок 21 – Электрофореграмма рестриционных фрагментов *bphA1*-генов после обработки эндонуклеазой *HhaI*. Рекомбинантные клоны, геномогруппа I – 1, 3, 6; геномогруппа II – 2; геномогруппа III – 4; геномогруппа IV – 5. M – маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Большинство клонированных фрагментов ДНК, отнесенных на основании ПДРФ-анализа к четырем разным геномогруппам и составляющих ~ 89 % от общего количества полученных рекомбинантных клонов, имели высокий процент сходства (97,8–99,5 %) с генами α -субъединиц гидроксигенирующих диоксигеназ некультивируемых бактерий из почвы, длительное время загрязненной ПХБ (Cárcer *et al.*, 2007) (рисунок 22). Секвенированный фрагмент ДНК клона Pp105 (VI геномогруппа ~ 11 % от общего количества рекомбинантных клонов) имел высокий процент сходства (98,4–99,3 %) с генами большой α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (ген *bphA1*) некультивируемых бактерий (Vézina *et al.*, 2008) и 91 % с подобными генами бактерий рода *Pseudomonas* (*P. putida* плазмиды pKF715A, *Pseudomonas* sp. Cam-1, *P. alcaliphila* JAB1, *P. pseudoalcaligenes* KF707) (таблица 8, рисунок 23).

Таблица 8 – Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон, (геномо- группа)	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Рр64 (I) 451 п.н.*	Гены, кодирующие кластер Риски α -субъединицы ДО; клоны LhIspA24, LhIspA20, LhIspA21; некультивируемые бактерии	EF565833.1, EF565845.1, EF565830.1	97,8 – 99,5	н.д.	Cárcer <i>et al.</i> , 2007
Рр116 (II) 427 п.н.*					
Рр123 (III) 448 п.н.*					
Рр105 (IV) 466 п.н.*	Ген фенилпропионат ДО (<i>hca</i>); клон AN-11, некультивируемая бактерия	DQ521968.1	99,3	н.д.	н.д.
	Ген бифенил ДО (<i>bph</i>); клон AN-70, некультивируемая бактерия	DQ521951.1	99,0	н.д.	н.д.
	Ген α -субъединицы бифенил ДО (<i>bphA1</i>); клон G7-12, некультивируемая бактерия	EF596918.1	98,4	н.д.	Vézina <i>et al.</i> , 2008
	Ген α -субъединицы бифенил ДО (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas putida</i> KF715, плазида рKF715A	AP015030.1	90,7	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Suenaga <i>et al.</i> , 2017
	Ген α -субъединицы бифенил ДО (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas furukawaii</i> KF707	AP014862.1	90,7	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Kimura <i>et al.</i> , 2018
	Ген бифенил ДО (<i>bph</i>); <i>Pseudomonas alcaliphila</i> JAB1	GU112766.1	90,7	Почва, загрязненная ПХБ (Чехия).	Ridl <i>et al.</i> , 2018
	Ген бифенил ДО (<i>bph</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. Cam-1	AY027651.1	90,5	Почва (Арктика)	Master, Mohn, 2001
	Ген бифенил ДО (<i>bph</i>); клон C22, некультивируемая бактерия	HQ158291.1	90,3	н.д.	Koubek <i>et al.</i> , 2013

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5	6
	Ген α -субъединицы бифенил ДО (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. B4	AJ544519.1	90,6	Донные отложения, загрязненные ПХБ (Германия)	Kahl, Hofer, 2003

Примечание. * – количество сравниваемых пар нуклеотидов; н.д. – нет данных.

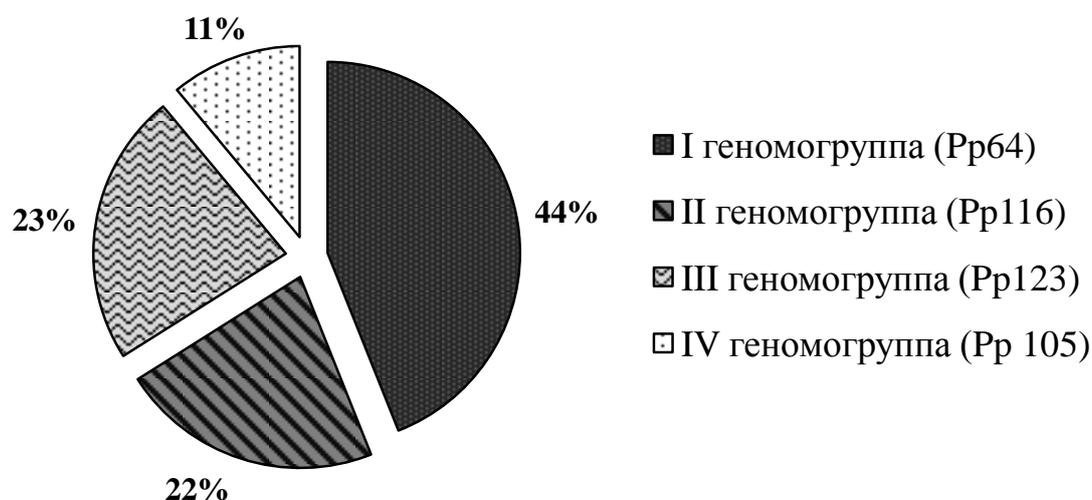


Рисунок 22 – **Процентное соотношение исследуемых рекомбинантных клонов.** Микробное сообщество почвы с территории “Пермского завода смазок и СОЖ”.

Полученные результаты указывают на присутствие гетерогенных генетических систем бактерий в микробном сообществе почвы, отобранной на территории предприятия ОАО “Пермского завода смазок и СОЖ”, которые кодируют ферменты, принимающие участие в разложении полиароматических соединений. Результаты исследований, проведенных с использованием молекулярно-биологических методов, включающих высокопроизводительное секвенирование, свидетельствуют об огромном разнообразии ароматических диоксигеназ, в том числе бифенил диоксигеназ (БДО), в почве и других компонентах окружающей среды. Показано, что диоксигеназы культивируемых бактерий составляют лишь небольшую часть по сравнению с многообразием БДО

в метагеноме микробного сообщества почвы (Cárcer *et al.*, 2007; Iwai *et al.*, 2010; Standfuss-Gabisch *et al.*, 2012; Jureleviciusa *et al.*, 2012).

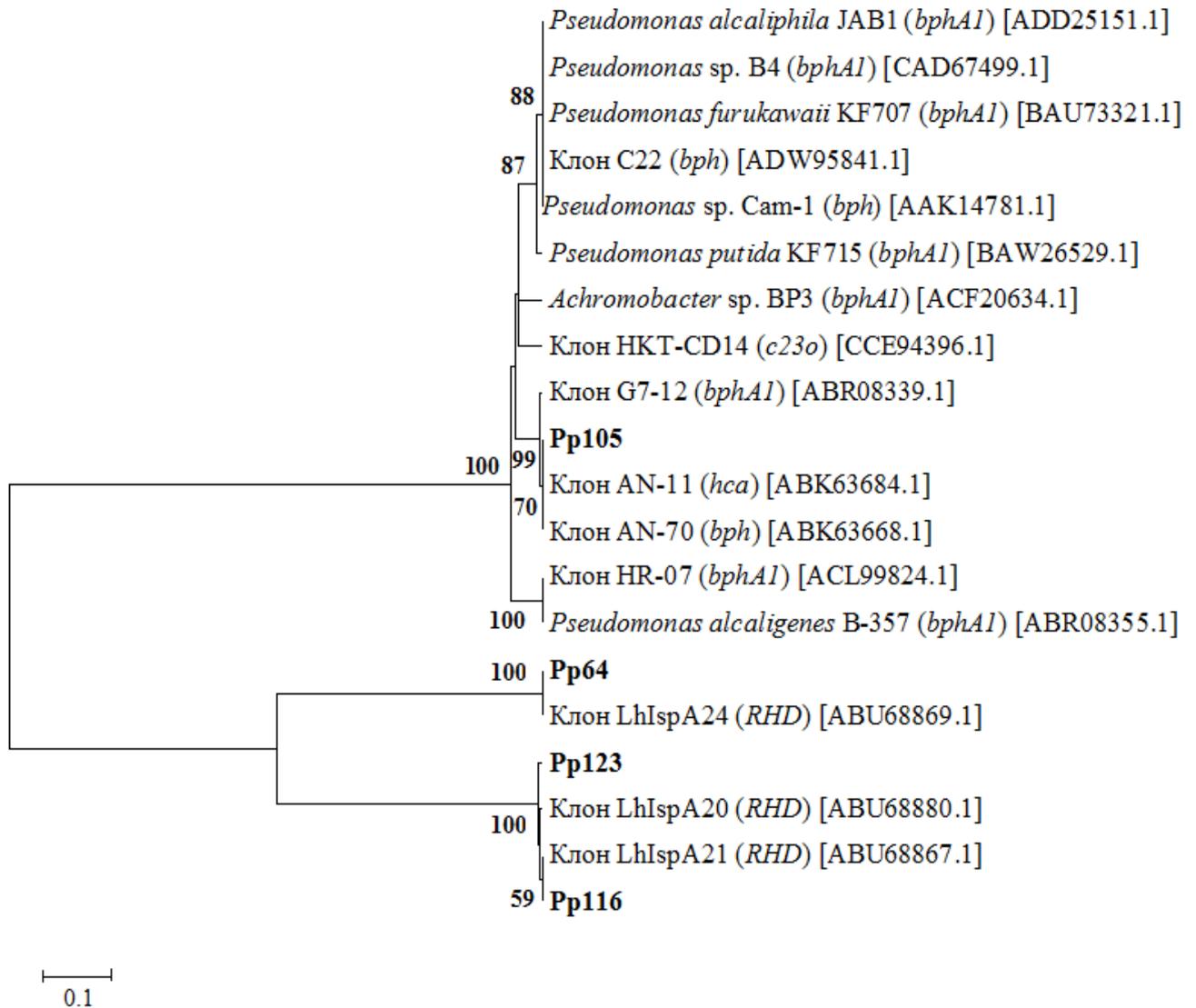


Рисунок 23 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов *bphA1*-генов депонированы в международную базу GenBank (приложение 1).

Наличие в выделенных образцах ДНК нуклеотидных последовательностей гомологичных генам α -субъединицы БДО псевдомонад, указывает на присутствие в исследуемом микробном сообществе бактерий-деструкторов бифенила, с большой вероятностью – бактерий рода *Pseudomonas*.

В ходе дальнейшего исследования из накопительной культуры были выделены и изучены активные штаммы-деструкторы рода *Pseudomonas* (раздел 4.1.).

3.5. *bphA1*-Гены в сточных водах предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)

Методом накопительного культивирования с образцом сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь) была получена ассоциация микроорганизмов (SIB), способная использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии (активный бактериальный рост на среде K1 с бифенилом: ОП₆₀₀ $0,50 \pm 0,20$). Из исследуемой бактериальной ассоциации (накопительной культуры, НК) выделена тотальная ДНК. Скрининг тотальной ДНК с праймерами (Iwai *et al.*, 2010) на наличие нуклеотидных последовательностей (генов-*bphA1*), кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, показал наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины (~ 500 п.н.) (рисунок 24).

На основании полученных результатов нами было сделано предположение, что в исследуемом микробном сообществе сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” присутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений, в том числе и бифенила.

В ходе дальнейших исследований из НК образца сточных вод были выделены штаммы-деструкторы, способные использовать бифенил в качестве субстрата (единственный источник углерода и энергии) (раздел 4.2).

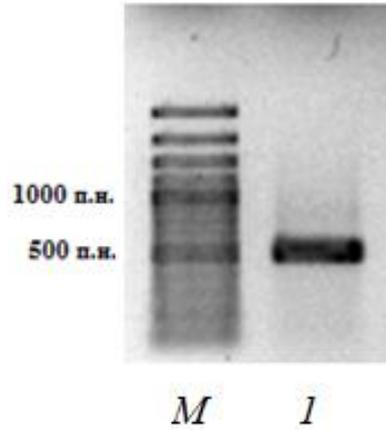


Рисунок 24 – Электрофореграмма продукта амплификации генов *bphA1* с тотальной ДНК накопительной культуры. *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва); *I* – НК сточной воды (АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)) на бифениле.

3.6. Разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе донных отложений реки Чапаевки (территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов”)

Клонирование *bphA1*-генов. Методом накопительного культивирования донных отложений реки Чапаевки на бифениле была получена ассоциация микроорганизмов, из которой выделена тотальная ДНК. С использованием праймеров к участку гена (*bphA1*), кодирующему активный центр БДО (Iwai *et al.*, 2010), проведена амплификация и получен ПЦР-продукт размером ~ 500 п.н. Данный ПЦР-фрагмент (*bphA1*) был клонирован в составе вектора pTZ57R/T клетках *E. coli* и создана библиотека *bphA1*-генов, включающая 88 клонов. Методом ПДРФ-анализа среди исследуемых клонов выявлены две геномогруппы (рисунок 25), у представителей каждой группы (клонов Ch9, Ch14) были определены нуклеотидные последовательности клонированных участков и проведен филогенетический анализ (таблица 9, рисунок 27, рисунок 28).

При филогенетическом анализе клонов Ch9 (геномогруппа I, ~ 8 % от общего количества рекомбинантных клонов (рисунок 26)) и Ch14 (геномогруппа II, ~ 92 %) обнаружено высокое сходство (98,9–99,2 %) с *bphA1*-подобными

генами штаммов рода *Rhodococcus*, а также с генами α -субъединиц БДО (бензол/толуол подсемейство ДО, Б/Т ДО) (*bphA1*) некультивируемых бактериальных клонов (таблица 9).

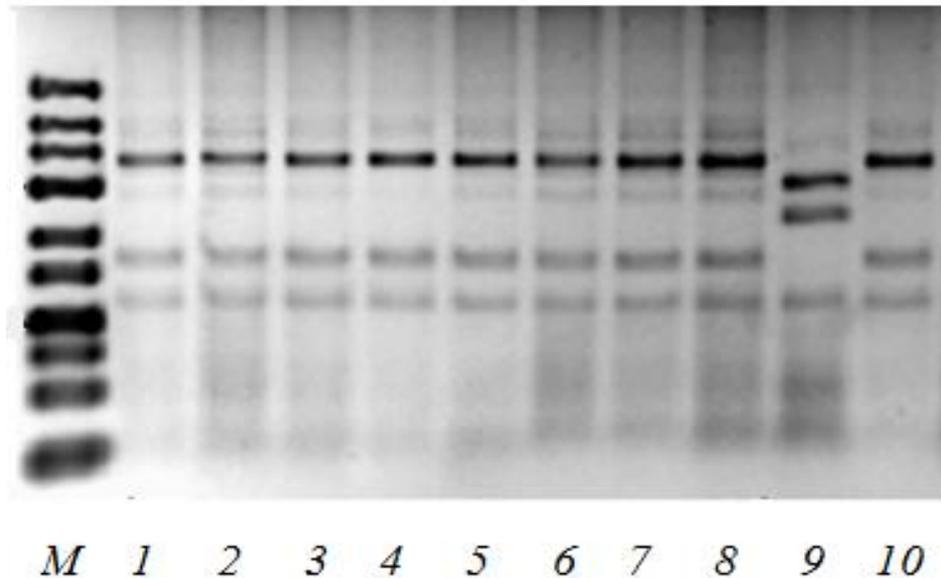


Рисунок 25 – Электрофореграмма рестрикционных фрагментов генов *bphA1* после обработки эндонуклеазой *HhaI*. Рекомбинантные клоны, геномогруппа I – 1-8 и 10; геномогруппа II – 9. M – маркер молекулярных масс O’GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Полученные данные указывают на присутствие в микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки генов *bphA1* и *bphA1*-подобных генов. Также результаты филогенетического анализа показали высокое процентное сходство (99,2–98,1 %) *bphA1*-генов исследуемых клонов с генами бензотрифторид ДО (*btfA1*), толуол ДО (*terpA*) и 1,2-дигидробензол 1,2-диолдегидрогеназы (*bnzB*). Это может быть обусловлено сходством большинства БДО с другими диоксигеназами подсемейства “бензол/толуол ДО” (к которому принадлежат вышеперечисленные ДО), благодаря чему БДО характеризуются способностью деградировать соединения со сходной химической структурой, обладая широкой субстратной специфичностью (Gibson, Parales, 2000).

Таблица 9 – Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон, (геномо- группа)	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сход- ство, %	Место выделения	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Ch9 (I) 387 п.н.* / Ch14 (II) 373 п.н.*	Гены α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>); клоны HS7, HS8, NS7, NS8, некультивируемые бактерии	JN675903.1, JN675902.1, JN675900.1, JN675901.1	99,2- 98,9 / 99,1- 98,6	Почва карьеров – “La Brea Tar Pit” (США, Лос- Анджелес)	н.д.
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus</i> <i>wratislaviensis</i> P20	KC832467.1	99,7 / 99,7	Территория завода ОАО “Талоген”, (г. Пермь)	Шумкова и др., 2015
	Ген α -субъединицы бензотрифторид 2,3- диоксигеназы (<i>btfA1</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	AB970510.1	99,2 / 98,9	н.д.	Yano <i>et</i> <i>al.</i> , 2015
	Ген 1,2-дигидробензол 1,2-диолдегидрогеназы (<i>bnzB</i>); <i>Rhodococcus opacus</i> B4 (pROB02)	AP011117.1	99,2 / 98,9	Территория химических заводов. (Хиросима, Япония)	Na <i>et al.</i> , 2005
	Ген α -субъединицы бифенил диоксигеназы (<i>bphA</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> 3B12	LT986350.1	99,1 / 98,9	Ризосфера	н.д.
	Ген α -субъединицы толуол диоксигеназы (<i>terpA</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. L4	EF527236.1	98,9 / 98,6	Ил из очистных сооружений химического завода (Таиланд)	н.д.
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20	AJ544524.1	99,2 / 98,3	н.д.	Kahl, Hofel, 2003
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3- диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2 (pBD2)	AY223810.1	98,4 / 98,1	н.д.	Stecker <i>et</i> <i>al.</i> , 2003

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3- диоксигеназы (<i>ipbA</i>); <i>Rhodococcus</i> <i>wratislaviensis</i> IFP2016	JX569344.1	98,4 / 98,1	н.д.	н.д.
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	D32142.1	95,8 / 96,2	Загрязненная почва (Япония)	Masai <i>et al.</i> , 1995

Примечание. * – количество сравниваемых пар нуклеотидов; н.д. – нет данных.

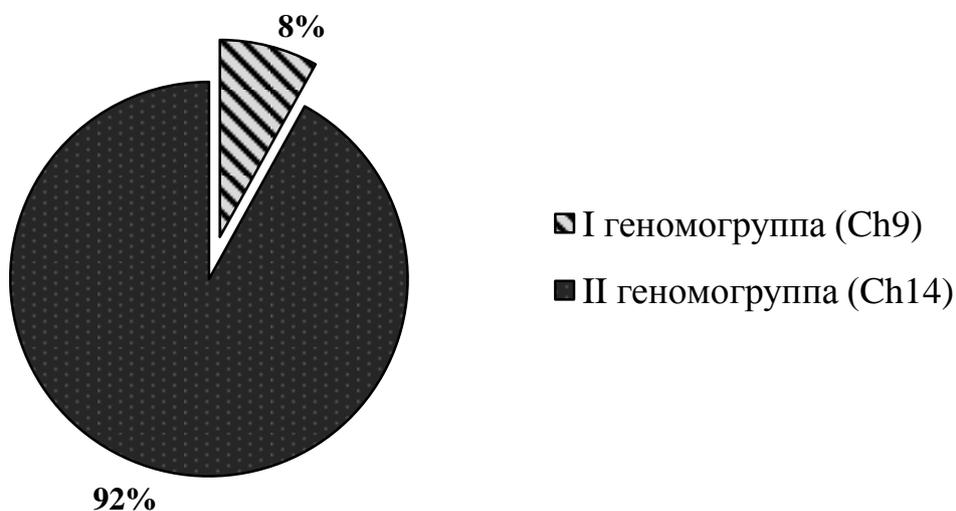


Рисунок 26 – Процентное соотношение исследуемых рекомбинантных клонов. Микробное сообщество донных отложений реки Чапаевки (Самарская область).

Следует отметить, что при сравнении нуклеотидных последовательностей двух исследуемых клонов (Ch9 и Ch14) с гомологичными последовательностями в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) процентное сходство и перечень представителей бактериальных штаммов оказались одинаковыми (таблица 9), в тоже время (в процессе выравнивания) между собой участки сравниваемых нуклеотидных последовательностей клонов являются гетерогенными. В процессе построения филогенетического дерева, нуклеотидные последовательности клонов транслировали в аминокислотные, а дальнейший

анализ (выравнивание и сравнение) последовательностей показал их идентичность (рисунок 27).

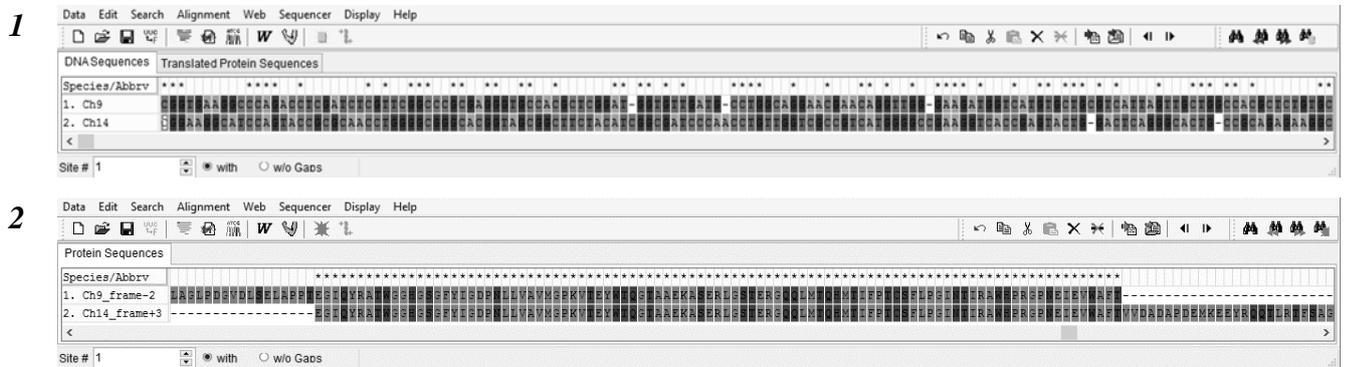


Рисунок 27 – Выравнивание и сравнительный анализ нуклеотидных (1) и аминокислотных (2) последовательностей клонов Ch9 и Ch14 в программе MEGA X (<http://www.megasoftware.net>).

На филогенетическом дереве исследуемые клоны формируют отдельную ветвь с активным штаммом-деструктором бифенила/ПХБ – *Rhodococcus wratislaviensis* P20, изолированным из загрязненной почвы территории предприятия ОАО “Галоген”, г. Пермь (Шумкова и др., 2015) (рисунок 28).

Исследуемые нуклеотидные последовательности клонов (фрагменты *bphA1*-генов) депонированы в международную базу GenBank (приложение 1).

Наличие в общей ДНК, выделенной из полученной накопительной культуры (образец донных отложений р. Чапаевки), нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам α -субъединицы БДО родококков, может указывать на присутствие в исследуемом микробном сообществе деструкторов бифенила, в том числе рода *Rhodococcus*.

Из исследуемой накопительной культуры были выделены и охарактеризованы 3 штамма рода *Rhodococcus*, способные использовать бифенил/ПХБ в качестве единственного источника углерода и энергии (раздел 4.2).

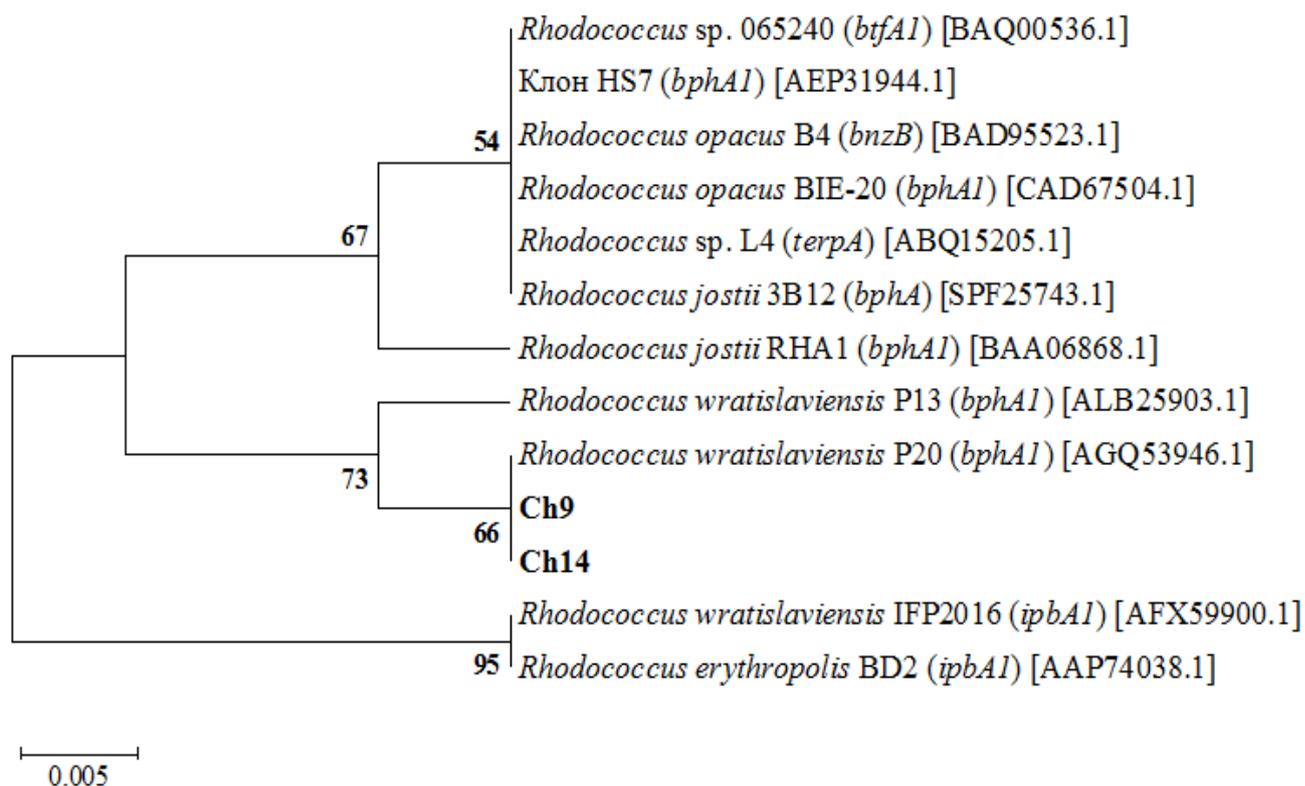


Рисунок 28 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

3.7. Скрининг *bphA1*-генов в загрязненных экосистемах полуострова Крым

Методом накопительного культивирования на бифениле получены две микробные ассоциации, обозначенные как EV (образец донных отложений порта г. Евпатория) и FEO (образец почвы с территории Феодосийского предприятия по обеспечению нефтепродуктами, г. Феодосия). С матриц ДНК, выделенных из накопительных культур, была проведена амплификация *bphA1*-генов (Iwai *et al.*, 2010), в результате которой получены ПЦР-продукты ожидаемой длины (~ 500 п.н.) (рисунок 29).

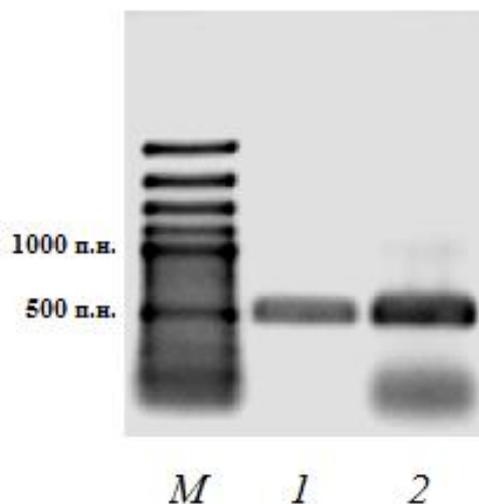


Рисунок 29 – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *bphA1*. *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва); *1* – накопительная культура донных отложений порта г. Евпатория; *2* – накопительная культура почвы с территории Феодосийского предприятия по обеспечению нефтепродуктами.

Секвенирование и дальнейший анализ амплифицированных *bphA1*-генов с тотальной ДНК накопительной культуры образца почвы с территории нефтебазы г. Феодосия выявил высокую гомологию (100 %) с аналогичными генами некультивируемого бактериального клона HR-07 (FJ532315.1) (метагеномный анализ ПХБ-загрязненной почвы с территории свалки (Чехия) (Uhlik *et al.*, 2009)) и высокий процент сходства (99,78 %) с типовым штаммом *Pseudomonas alcaligenes* В-357^T (EF596934.1), который является активным деструктором бифенила и 4-хлорбифенила (Vézina *et al.*, 2008). Можно предположить, что в исследуемом микробном сообществе присутствуют деструкторы бифенила рода *Pseudomonas*.

В то же время, нуклеотидная последовательность ампликона, полученная с тотальной ДНК образца донных отложений порта г. Евпатория, имела не высокую гомологию с генами, кодирующими α -субъединицы диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо, следующих штаммов: 72,64 % сходства с аэробным грамположительным штаммом *Conexibacter woesei* DSM

14684 (класс *Actinobacteria*) (Pukall *et al.*, 2010) и 71,92 % – со штаммом-деструктором *Pigmentiphaga* sp. H8, который относится к семейству *Alcaligenaceae* и способен осуществлять полное разложение 3,5-дибром-4-гидроксибензоата (0,20 мМ за 6 часов) (Chen *et al.*, 2018). Что касается известных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ, филогенетический анализ показал очень низкий процент сходства (65,63 %) секвенированной последовательности с геном α -субъединицы этилбензол диоксигеназы (*etbAa*) штамма *R. jostii* RHA1 (Takeda *et al.*, 2010).

Таким образом, в результате проведенного исследования (скрининга *bphA1*-генов) можно говорить о присутствии в микробных сообществах п-ова Крым (загрязненные экотопы) бактерий-деструкторов, имеющих диоксигеназные активности, ответственные за гидроксирование ароматических колец (в том числе, бифенила/ПХБ).

3.8. Исследование почвы с перевала Кыртыкауш (республика Кабардино-Балкария) на наличие *bphA1*-генов

При постановке накопительного культивирования с образцом почвы с перевала Кыртыкауш на минеральной среде с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии бактериальный рост не наблюдался. Кроме того, в ходе дальнейшего исследования методом ПЦР установлено, что в тотальной ДНК исследуемого образца отсутствуют гены деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*-гены).

Из вышеизложенного следует, что в микробном сообществе почвы с перевала Кыртыкауш, вероятно, отсутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений (бифенила/ПХБ). Химический анализ (метод хромато-масс-спектрометрии) не выявил ароматических загрязнителей в исследуемом образце почвы. Полученные данные указывают на то, что перевал Кыртыкауш на сегодняшний день является экологически чистой территорией.

Глава 4. БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА/ПХБ

4.1. Бактерии-деструкторы рода *Pseudomonas*

Методом накопительного культивирования с образцами почв, отобранных с загрязненной территории завода ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь), на минеральной среде К1 с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии, выделено 2 активных штамма-деструктора.

Путем селективного отбора при высеве на агаризованную среду К1 с бифенилом из микробного сообщества образца суммарной почвы выделены чистые культуры, способные использовать бифенил в качестве субстрата. В ходе выявления активных штаммов-деструкторов проанализирована ростовая активность выделенных культур на бифениле. В результате, только два штамма, обозначенные VRP2-2 и VRP2-6, показали потенциально активный рост (ОП₆₀₀ 0,20–1,50) и, следовательно, способность эффективно использовать в качестве ростового субстрата незамещенный бифенил. Штаммы VRP2-2 и VRP2-6 были выбраны для дальнейших исследований.

4.1.1. Идентификация, морфо-физиологические и генетические характеристики штаммов VRP2-2 и VRP2-6

Клетки штаммов представляли собой грамотрицательные подвижные палочки, не образующие спор. При росте на среде LB колонии изолята VRP2-2 были круглые, желтые, выпуклые, гладкие, блестящие, размером 1–3 мм. Колонии штамма VRP2-6 имели размер 2–4 мм, были кремово-желтого цвета, круглые, выпуклые, с волнистым краем, матовые. Клетки изолированных штаммов – подвижные палочки правильной формы с закругленными концами, оксидазо- и каталазоположительные.

Выделенные штаммы активно росли в диапазоне температур от +4°C до +45°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) на богатой среде (LB) и от +4°C до +37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) на минеральной среде К1 с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода. Ростовые эксперименты при изменении осмолярности среды показали, что штамм VRP2-2 способен к активному росту при концентрации NaCl до 50 г/л (как на

богатой среде Раймонда (БСР), так и на минеральной (МСР) с добавлением бифенила). У штамма VRP2-6 не наблюдался рост на минеральной среде с бифенилом при концентрации NaCl 30 г/л, но осуществлялось проявление незначительных ростовых показателей на богатой среде при той же концентрации соли. У исследуемых штаммов отсутствовал бактериальный рост при NaCl – 50 г/л и более, что, вероятно, обусловлено адаптационными процессами, протекающими в бактериальных клетках (таблица 10).

Таблица 10 – Рост штаммов VRP2-2 и VRP2-6 при изменении осмолярности среды

Среда	Штамм	
	VRP2-2	VRP2-6
МСР*, бифенил, без NaCl	++	++
БСР**, без NaCl	+++	+++
МСР, бифенил, 3% NaCl	++	–
БСР, 3% NaCl	+++	+
МСР, бифенил, 5% NaCl	–	–
БСР, 5% NaCl	–	–
МСР, бифенил, 7% NaCl	–	–
БСР, 7% NaCl	–	–

Примечание. * – минеральная среда Раймонда; ** – богатая среда Раймонда; “–” – не обнаружено; “+” – ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,3 ед.; “++” – ОП₆₀₀ от 0,4 до 0,7 ед.; “+++” – ОП₆₀₀ выше 0,7 ед.

Проведено ДНК-типирование исследуемых штаммов с использованием метода ВОХ-ПЦР (Versalovic *et al.*, 1994). Сравнение ВОХ-ПЦР фингерпринтов показало, что штаммы VRP2-2 и VRP2-6 отличаются друг от друга на молекулярно-генетическом уровне (рисунок 30).

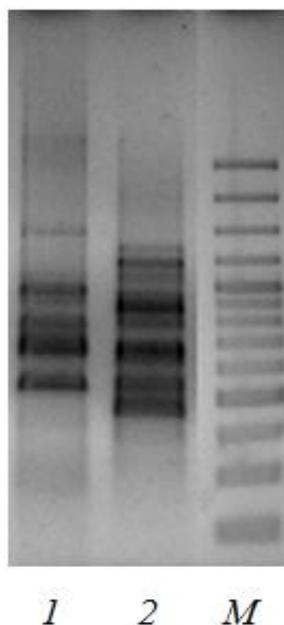


Рисунок 30 – **BOX-ПЦР-профили штаммов VRP2-2 (1) и VRP2-6 (2).** *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Отличия двух штаммов выявлены и при сравнении данных по наличию плазмид. Анализ экстрахромосомальной ДНК (методом пульс-электрофореза) показал, что в клетках штамма VRP2-6, выращенном на среде K1 с бифенилом, обнаружена плазида размером около 280 т.п.н. В другом штамме VRP2-2 плазмидной ДНК выявлено не было (рисунок 31).

На основе анализа гена 16S рРНК штаммы VRP2-2 и VRP2-6 отнесены к роду *Pseudomonas* и имеют наибольшее сходство с типовым штаммом *Pseudomonas alcaligenes* NBRC 14159^T (100 % сходства) и с типовым штаммом *Pseudomonas taiwanensis* BCRC 17751^T (99 % сходства), соответственно. В литературе описан ряд штаммов псевдомнад – активных деструкторов бифенила и ПХБ (Adebusoye *et al.*, 2007; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2014; Chakraborty, Das, 2016; Ridl *et al.*, 2018), среди которых наиболее изученными являются штаммы (обозначенные KF), выделенные из загрязненной почвы с территории завода по производству бифенила в Японии (Furukawa *et al.*, 1989). Установлено, что штаммы KF принадлежат к разным видам рода

Pseudomonas, в том числе *P. furukawaii* (штамм KF707), *P. putida* (штаммы KF703, KF715), *P. toyotomiensis* (штамм KF710), *P. aeruginosa* (штамм KF702). Проведено полное секвенирование геномов KF штаммов, что позволило определить и проанализировать генетические структуры, лежащие в основе уникального метаболического потенциала, отвечающего за способность разлагать бифенил и ПХБ до безопасных соединений (Watanabe *et al.*, 2015a; Fujihara *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018).



Рисунок 31 – Электрофореграмма плазмидных ДНК исследуемых штаммов, выращенных на среде К1 с бифенилом. *M* – маркер молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США); *1* – штамм VRP2-2; *2* – штамм VRP2-6.

4.1.2. Биодegradационные свойства *Pseudomonas* spp. VRP2-2 и VRP2-6

Установлено, что штаммы VRP2-2 и VRP2-6 используют в качестве единственного источника углерода и энергии не только бифенил, а также

моноароматические углеводороды: *орто*-фталевую, бензойную кислоты. Штамм VRP2-6 активно рос на *пара*-оксибензойной, протокатеховой, салициловой кислотах, в то время как штамм VRP2-2 не утилизировал эти соединения, но осуществлял трансформацию протокатеховой кислоты (таблица 11). Исследуемые штаммы не были способны к росту на нафталине, фенантрене, феноле, толуоле.

Таблица 11 – Рост штаммов *Pseudomonas* spp. VRP2-2 и VRP2-6 на ароматических соединениях

Субстрат	Штамм	
	VRP2-2	VRP2-6
Бифенил	++	+++
Нафталин	–	–
Фенантрен	–	–
Фенол	–	–
Толуол	–	–
<i>орто</i> -Фталева кислота	+	++
Салициловая кислота	–	+++
<i>пара</i> -Оксибензойная кислота	–	+++
Протокатеховая кислота	– (т.о.с.)	+++
Бензойная кислота	+++	+++

Примечание. “–” – не обнаружено; “т.о.с.” – темное окрашивание среды культивирования; “+” – ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,3 ед.; “++” – ОП₆₀₀ от 0,4 до 0,7 ед.; “+++” – ОП₆₀₀ выше 0,7 ед.

На основании проведенных исследований можно предположить, что деградация бифенила штаммами VRP2-2 и VRP2-6 осуществляется по классическому пути через образование пентадиеновой и бензойной кислот, с последующим разложением бензойной кислоты (Pieper, Seeger, 2008). Установлено, что оба штамма активно растут на бензойной кислоте (таблица 11). Результаты ПЦР-анализа показали, что в геноме обоих штаммов присутствует ген

benA (~ 520 п.н.), кодирующий малую субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы – ключевого фермента разложения бензоата у бактерий, что может указывать на присутствие метаболического пути разложения бензоата через образование ключевого интермедиата – пирокатехина (Ridi *et al.*, 2018) (рисунок 32).

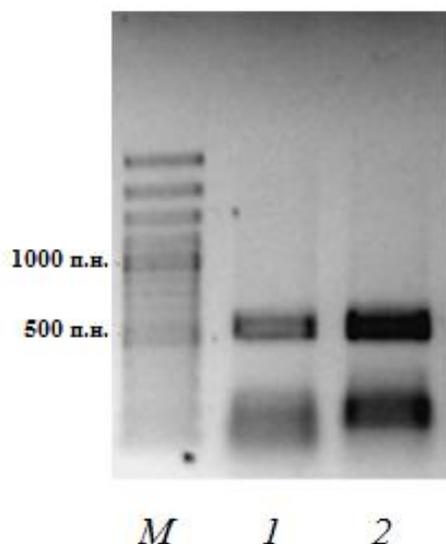


Рисунок 32 – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *benA* у исследуемых штаммов рода *Pseudomonas*. *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва); *1* – штамм VRP2-2; *2* – штамм VRP2-6.

Характер роста штамма VRP2-6 на *пара*-оксибензойной и протокатеховой кислотах (ПОБК и ПКК) (таблица 11) позволяет предположить, что штамм VRP2-6 способен также осуществлять разложение бензоата по пути деструкции ПОБК и ПКК. Для бактерий описано несколько путей разложения бензоата: через образование пирокатехина, а также через образование ПОБК и ПКК (<https://www.genome.jp>).

При выращивании в жидкой среде на бифениле штамм VRP2-6 демонстрировал более высокие ростовые показатели (скорость роста, прирост биомассы), чем штамм VRP2-2 (рисунок 33), и был проверен на способность осуществлять разложение хлорированных бифенилов.

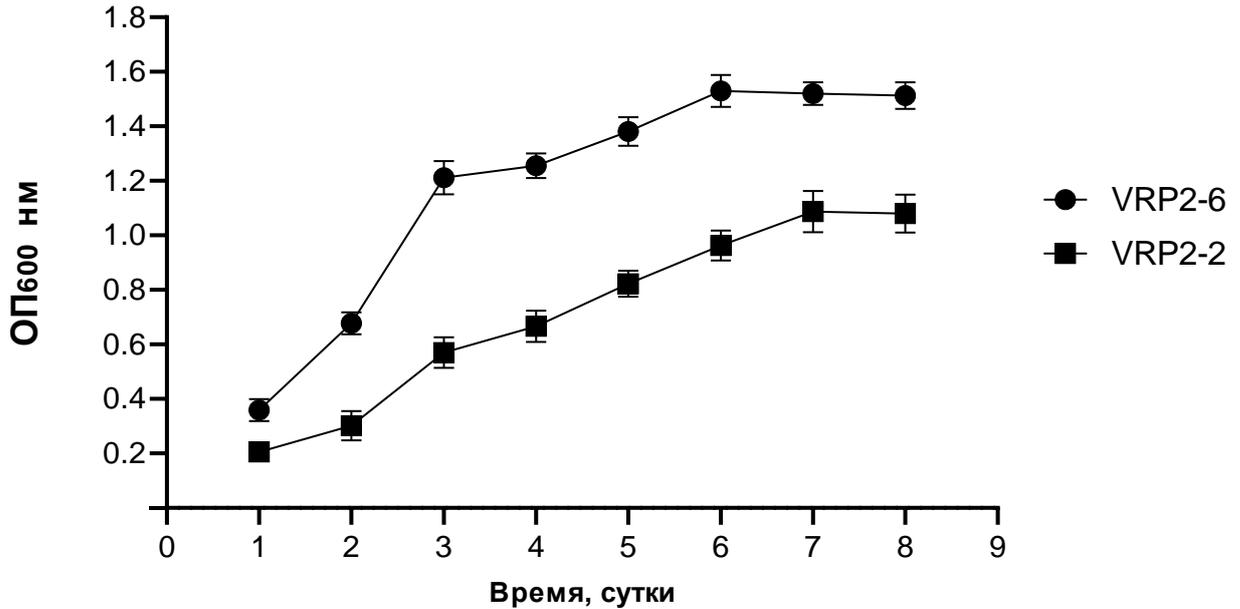


Рисунок 33 – Рост штаммов *Pseudomonas sp.* VRP2-2 и *Pseudomonas sp.* VRP2-6 на бифениле (1 г/л).

Показано, что штамм VRP2-6 эффективно утилизирует *орто*- и *пара*-моноХБ в высокой концентрации (250 мг/л), окисляя нехлорированное кольцо молекулы ХБ (таблица 12). При культивировании на 2-ХБ и 4-ХБ уже к 3 часам количество хлорбифенилов в среде уменьшалось в 4,9 и 4,3 раза, соответственно. За 24 часа инкубации 2-ХБ был практически полностью утилизирован (97,1 % от теорет. возможного), а разложение 4-ХБ осуществлено на 82,3 %. В среде не обнаружены промежуточные продукты метаболизма – 2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК), что может указывать на высокую активность ферментных систем деструкции моноХБ у штамма VRP2-6 (Maltseva *et al.*, 1999). В исследуемые периоды времени в среде зарегистрированы хлорбензойные кислоты в количестве 2,0–3,5 мг/л (таблица 12). Наличие таких небольших количеств ХБК (не более 2 % от теорет. возможного), может указывать на последующее разложение клетками штамма этих хлорсодержащих метаболитов. Известны немногочисленные штаммы рода *Pseudomonas*, способные полностью утилизировать образующиеся в процессе разложения

монохлорбифенилов соответствующие ХБК (Chae *et al.*, 2000; Kim, Picardal, 2001; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Таблица 12 – Деструкция хлорбифенилов штаммом *Pseudomonas sp. VRP2-6*

Субстрат	Время инкубации (ч)	Содержание субстрата		Продукт деструкции				
		мг/л	%*	ГОФДК		ХБК	мг/л	%*
				λ_{\max} , нм	ОП, ед.			
2-ХБ	0	250,00 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,36 ± 0,04	0,17
	3	51,45 ± 0,01	20,58	н.д.	н.д.	2-ХБК	2,45 ± 0,02	1,18
	24	7,43 ± 0,02	2,90	н.д.	н.д.		3,50 ± 0,05	1,68
4-ХБ	0	250,00 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,30 ± 0,03	0,16
	3	57,80 ± 0,03	23,12	н.д.	н.д.	4-ХБК	2,00 ± 0,03	0,96
	24	44,30 ± 0,01	17,7	н.д.	н.д.		2,35 ± 0,02	1,13
2,4'-ХБ	0	44,60 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		н.д.	н.д.
	3	40,80 ± 0,02	91,48	396	0,696	4-ХБК	0,09 ± 0,004	0,27
	24	35,70 ± 0,01	80,00	395	0,804		0,09 ± 0,002	0,28

Примечание. 2-ХБ – 2-монохлорбифенил; 4-ХБ – 4-монохлорбифенил; 2,4'-ХБ – 2,4'-дихлорбифенил; ХБК – хлорбензойная кислота; ГОФДК – 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота; “н.д.” – не детектировалось; %* от теоретически возможного.

Разложение штаммом VRP2-6 дихлорированного бифенила (2,4'-диХБ) осуществлялось менее активно, чем монохлорбифенилов. Так к 24 часам количество субстрата в среде культивирования составляло 80 % от теоретически возможного. Было зарегистрировано накопление продукта *мета*-расщепления дихлорбифенила – 3,8-С1 ГОФДК с $\lambda_{\max} = 395/396$ нм, что указывает на 2,3-диоксигенирование *пара*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ (Maltseva *et al.*, 1999). Кроме того, в среде культивирования происходило накопление небольшого количества 4-ХБК, что может свидетельствовать о трансформации 2,4'-диХБ по пути предпочтительного 2,3-диоксигенирования *орто*-хлорированного кольца (Maltseva *et al.*, 1999). Таким образом, БДО штамма VRP2-6 может осуществлять

окисление как *орто*-, так и *пара*-замещенного кольца молекулы 2,4'-диХБ. Ранее сообщалось, что штамм *Pseudomonas* sp. SA-6 использовал 2,4'-диХБ в качестве единственного источника углерода и энергии, окисляя *орто*-хлорированное кольцо молекулы бифенила, и, далее, осуществлял деструкцию образующейся 4-ХБК (Adebusoye *et al.*, 2007). Для выявления особенностей метаболизма деструкции хлорбифенилов, различающихся количеством и положением хлора (*орто*-, *пара*-, *мета*-) в молекуле, а также продуктов их разложения – хлорбензоатов, у штамма *Pseudomonas* sp. VRP2-6 необходимо проведение дальнейших исследований.

4.1.3. Гены *bphA1* бактерий-деструкторов рода *Pseudomonas*

Методом ПЦР со специфичными праймерами (Iwai *et al.*, 2010) установлено наличие у выделенных штаммов гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деструкции бифенила. Данный факт подтверждает, что в разложении бифенила/ПХБ участвуют ферменты, кодируемые кластером *bph*-генов классического “верхнего” пути деструкции бифенила, осуществляющие конверсию бифенила до бензойной кислоты (Pieper, Seeger, 2008). Анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных фрагментов гена *bphA1* штаммов VRP2-2 и VRP2-6 показал их идентичность и наибольшее родство (сходство на уровне 89,8–97,3 %) с генами α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназ бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ рода *Pseudomonas* (таблица 13, рисунок 34). Наиболее близкими (уровни сходства 97,3 и 97,1 %, соответственно) по *bphA1*-генам являются деструкторы бифенила *Pseudomonas putida* B6-2 (Li *et al.*, 2009b) и *Pseudomonas* sp. B3B (Kahl, Hofer, 2003). Данные по структуре генома штамма-деструктора ароматических соединений *P. putida* B6-2 указывают на наличие “классического” кластера *bph*-генов (*bphABCNHJID*) и генов (оперонов), ответственных за разложение бензоата, катехола, *пара*-гидроксибензоата и салицилата (Li *et al.*, 2009b).

Таблица 13 – Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) исследуемых штаммов рода *Pseudomonas* с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Номер в GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
1	2	3	4	5	6
VRP2-2, VRP2-6, 453 п.н*	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>P. putida</i> B6-2	CP015202.1	97,3	Почва (Китай)	Li <i>et al.</i> , 2009b
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. B3B	AJ544517.1	97,1	Донные отложения, загрязненные ПХБ (Германия)	Kahl, Hofer, 2003
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. B6K	AJ544520.2	93,0	Донные отложения, загрязненные ПХБ (Германия)	Kahl, Hofer, 2003
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas alcaligenes</i> B-357	EF596934.1	90,7	Активный ил	Vézina <i>et al.</i> , 2008
	Ген α -субъединицы бифенил диоксигеназы (<i>bphA</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. Cam-1	AY027651.1	90,0	Почва (Арктика)	Master, Mohn, 2001
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>P. putida</i> KF715, плазида рKF715A	AP015030.1	89,8	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Suenaga <i>et al.</i> , 2017
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>P. alcaliphila</i> JAB1	GU112766.1	89,8	Почва, загрязненная ПХБ (Чехия).	Ridl <i>et al.</i> , 2018
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>P. furukawaii</i> KF707	AP014862.1	89,8	Почва, загрязненная ПХБ (Япония)	Kimura <i>et al.</i> , 2018
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Pseudomonas</i> sp. B4	AJ544519.1	89,8	Донные отложения, загрязненные ПХБ (Германия)	Kahl, Hofer, 2003

Примечание. * - количество сравниваемых нуклеотидов.

Высокий процент сходства (около 90 %) *bphA1*-гены исследуемых штаммов имели с подобными генами хорошо охарактеризованных штаммов KF – *P. furukawaii* KF707 и *Ps. putida* KF715 (таблица 13, рисунок 34), которые являются высокоактивными деструкторами хлорированных бифенилов, содержащих различное количества атомов хлора (в *орто*-, *пара*- и *мета*-положении) в молекуле бифенила, а также смесей ПХБ (Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018).

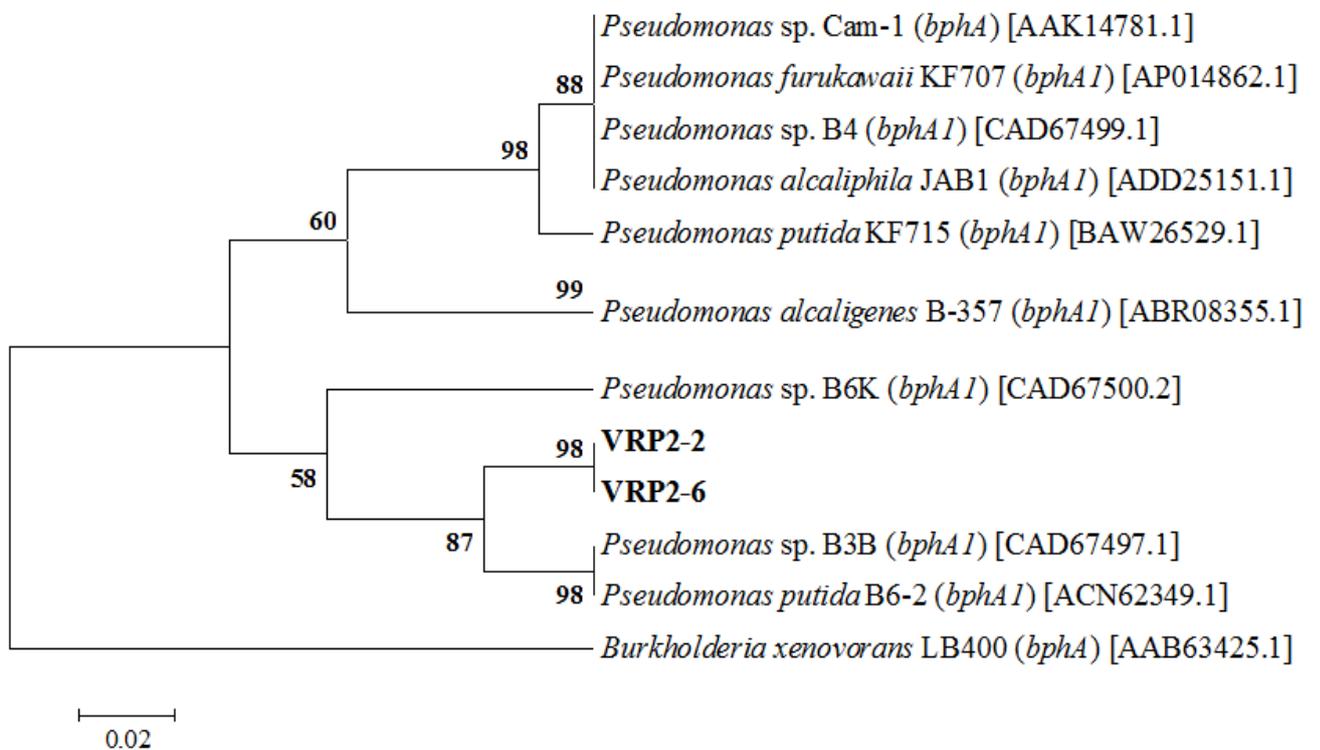


Рисунок 34 – Положение *bphA1*-генов штаммов *Pseudomonas* spp. VRP2-2 и VRP2-6 на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа. В качестве аутгруппы использована аминокислотная последовательность большой субъединицы бифенил 2,3-диоксигназы *Burkholderia xenovorans* LB400 (AAB63425.1).

Показано, что кластер *bph*-генов обнаружен в одной из четырех плазмид штамма *P. putida* KF715, плазмиде pKF715A размером 483 т.п.н., в то же время у бесплазмидного штамма KF707 идентичные *bph*-гены локализованы в хромосоме (Kimura *et al.*, 2018). Установлено, что мобильный элемент, содержащий *bph*-гены (плазмиды pKF715A) может интегрироваться в хромосому (Suenaga *et al.*, 2017).

Исследование наших штаммов выявило наличие плазмиды размером около 280 т.п.н. у штамма VRP2-6 (рисунок 31), что не исключает возможности нахождения *bph*-генов на плазмидной ДНК. Интересен факт наличия идентичных *bphA1*-генов у штамма VRP2-2 (сходство 100 %), однако в клетках штамма не было обнаружено плазмид, что указывает на локализацию этих генетических структур в хромосоме.

Нуклеотидные последовательности участков *bphA1*-генов штаммов-деструкторов VRP2-2 и VRP2-6 депонированы в международную базу данных GenBank (приложение 2).

4.2. Бактерии-деструкторы рода *Rhodococcus*

Методом накопительного культивирования с образцами загрязненных почв, отходов, донных отложений, отобранных на территории Российской Федерации (шламоохранилище и солетвал БКПРУ-3 “Уралкалий”, г. Березники); АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь); река Чапаевка (г. Чапаевск)), на минеральной среде К1 с добавлением субстрата – незамещенного бифенила, получены ассоциации микроорганизмов. Далее, путем последовательного селективного культивирования в жидкой среде (трехкратный пересев на среду К1 с бифенилом) ассоциаций с последующим их высевом на агаризованную среду К1 с бифенилом выделено 7 штаммов-деструкторов, у которых зарегистрирован активный бактериальный рост на данном субстрате (ОП₆₀₀ 0,5–1,0 о.е.) (рисунок 35).

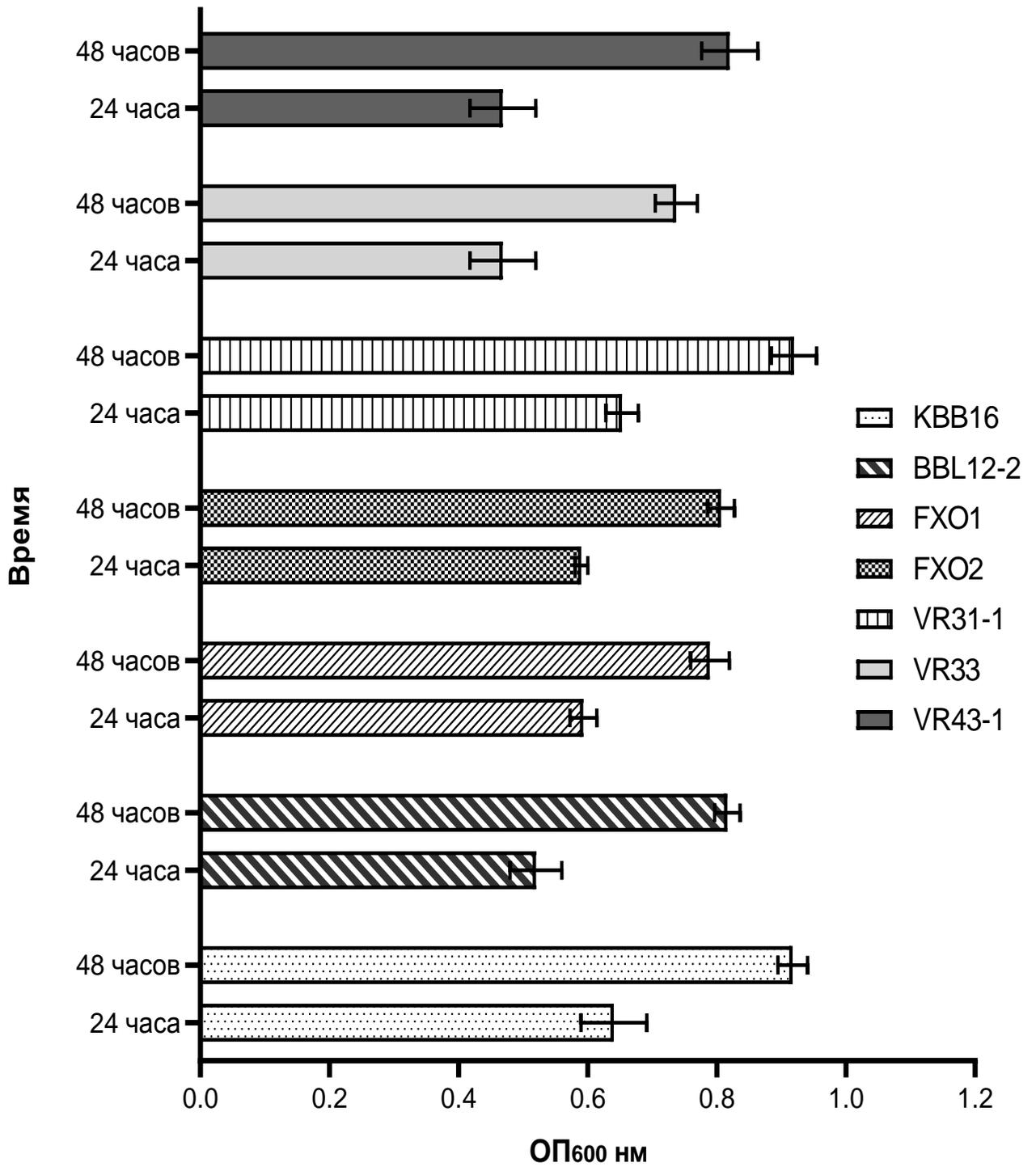


Рисунок 35 – Рост исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* в жидкой минеральной среде на бифениле (1 г/л).

4.2.1. Выделение и идентификация активных штаммов-деструкторов из образцов почв/грунтов, шламов района солеразработок (г. Березники)

Методом накопительного культивирования на бифениле, в качестве единственного источника углерода и энергии, из почв, грунтов, шламов района солеразработок получено десять ассоциаций микроорганизмов (обозначенных как В1, В8, В10, В11, В12, В13, В17, В18, В22 и В23). Скрининг *bphA1*-генов, кодирующих α -субъединицу БДО, путем амплификации со специфичными праймерами (Iwai *et al.*, 2010) показал наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины (около 500 п.н.) с матрицы тотальной ДНК образцов В8, В12, В13, В18 и В22. Однако, только из одного микробного сообщества – грунт вблизи солеотвала, образец В22 (см. раздел 3.3.), удалось выделить штамм (обозначенный КВВ16), способный использовать бифенил в качестве ростового субстрата (рисунок 35). Ранее, из образца поверхностного слоя шламохранилища (образец В18) был изолирован штамм ВВЛ12-2, также характеризующийся активным ростом на бифениле (Шипова, Шестакова, 2015).

При выращивании на агаризованной среде LB штаммы образуют округлые, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–3 мм. Клетки штаммов грамположительные, неподвижные, не образуют спор, характеризуются каталазной активностью.

В результате определения филогенетического положения на основании анализа генов 16S рРНК было установлено, что исследуемые штаммы относятся к роду *Rhodococcus*. При сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК штамма КВВ16 с гомологичными последовательностями, имеющимися в международной базе данных EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>), сходство с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T составило 100 %. Штамм ВВЛ12-2 имеет наибольший процент сходства – 99,73 % с типовым штаммом *Rhodococcus jostii* DSM 44719^T.

4.2.2. Выделение и идентификация штаммов-деструкторов бифенила из сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)

Методом накопительного культивирования на бифениле была получена ассоциация микроорганизмов сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” (SIB). При помощи ПЦР с праймерами (Iwai *et al.*, 2010) обнаружено наличие *bphA1*-генов в образце SIB (раздел 3.5., рисунок 24). Из полученной НК было выделено и охарактеризовано 2 активных штамма-деструктора (FXO1 и FXO2), способных использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии.

При выращивании в течение 3 суток на агаризованной среде LB штамм FXO1 образует округлые, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–3 мм; штамм FXO2 формирует круглые с фестончатым краем, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–4 мм. Клетки обоих штаммов являются аэробами с каталазной активностью, грамположительными, неподвижными, не образующими спор.

В ходе филогенетического анализа сравниваемых нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК исследуемых штаммов FXO1 и FXO2 с гомологичными последовательностями, имеющимися в международной базе данных EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>), обнаружено сходство (100 %) с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T.

4.2.3. Выделение и идентификация штаммов-деструкторов бифенила из образцов донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск)

Из образцов донных отложений реки Чапаевки, протекающей вдоль территории ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” методом накопительного культивирования на бифениле получено 4 ассоциации микроорганизмов (обозначенные как VR1, VR2, VR3, VR4). Методом ПЦР с использованием праймеров (Шумкова и др., 2015) проведено исследование образцов ДНК, выделенных из микробных ассоциаций, на наличие нуклеотидных последовательностей гена *bphA1*. Результаты анализа показали наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины (около 500 п.н.) при амплификации со всех четырех

ДНК матриц. Однако только из двух накопительных культур VR3 и VR4 (ранее НК VR4 исследовали методом клонирования гена *bphA1*, раздел 3.6.) были выделены активные штаммы-деструкторы бифенила, обозначенные как VR31-1, VR33, VR43-1.

Бактерии при выращивании на среде LB образовывали округлые, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–3 мм. Клетки изолятов – грамположительные, неподвижные, не образуют спор, каталазоположительные.

На основании анализа гена 16S рРНК штаммы отнесены к роду *Rhodococcus* (100 % сходства с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T).

4.2.4. Физиологические и генетические характеристики бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus*

Штаммы рода *Rhodococcus* (КВВ16, BBL12-2, FXO1, FXO2, VR31-1, VR33, VR43-1), выделенные из полученных накопительных культур, характеризовались активным ростом (ОП₆₀₀ выше 1,0 ед.) как на богатой среде LB, так и на минеральной среде К1 с бифенилом (в качестве субстрата) при температурном режиме $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ (рисунок 35). В ходе дальнейшего исследования показано, что выделенные штаммы активно растут (ОП₆₀₀ выше 1,0 ед.) при пониженной температуре ($+4 \pm 1^\circ\text{C}$) на среде LB, но не отличались хорошими ростовыми показателями на минеральной среде К1 с бифенилом (ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,5 ед.). Следует отметить, что при экстремально высокой температуре ($+45 \pm 1^\circ\text{C}$) рост не наблюдался ни у одного из исследуемых штаммов.

Ростовые эксперименты при изменении осмолярности среды показали, что все исследуемые культуры способны к росту на богатой агаризованной среде RL как без добавления NaCl, так и в присутствии повышенной концентрации соли (70 г/л). Однако на минеральной среде Раймонда с бифенилом в условиях повышенной солености среды (70 г/л NaCl) способность ряда штаммов (BBL12-2, FXO2, VR33, VR43-1) к активному росту значительно уменьшалась (таблица 15).

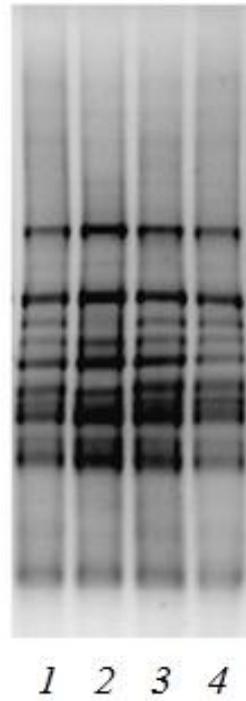
Таблица 15 – Рост штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* при изменении осмолярности среды

Штамм	NaCl (г/л), среда культивирования, субстрат							
	Без соли		30		50		70	
	БСР*	МСР** бифенил	БСР	МСР бифенил	БСР	МСР бифенил	БСР	МСР бифенил
КВВ16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BVL12-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
FXO1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
FXO2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
VR31-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
VR33	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
VR43-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Примечание. * – минеральная среда Раймонда; ** – богатая среда Раймонда; “–” – не обнаружено; “+” – ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,3 ед.; “++” – ОП₆₀₀ от 0,4 до 0,7 ед.; “+++” – ОП₆₀₀ выше 0,7 ед.

С применением метода ВОХ-ПЦР проведена сравнительная генетическая характеристика выделенных родококков. Анализ полученных ВОХ-профилей фрагментов геномной ДНК исследуемых бактерий показал, что штаммы КВВ16, BVL12-2, FXO1, FXO2, выделенные из образцов, отобранных на территории Пермского края (предприятий ОАО “Уралкалий” БКПРУ-3 (г. Березники) и АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)), обладали идентичными ВОХ-профилями (рисунок 36). Анализ фингерпринтов изолятов VR31-1, VR33, VR43-1, выделенных из образцов Самарской области (территория ОАО “Средне-Волжский завод химикатов”, г. Чапаевск), показал характерные отличия ВОХ-профилей: штаммы VR31-1 и VR43-1 содержали минорные фрагменты и имели отличия как от штамма VR33, так и между собой (рисунок 36). Таким образом, штаммы КВВ16, BVL12-2, FXO1, FXO2, идентичные по фингерпринтам, отнесены к одной геномной группе (I-геномная группа), штаммы VR31-1, VR33 и VR43-1 отнесены ко II, III и IV-геномным группам, соответственно.

А



Б

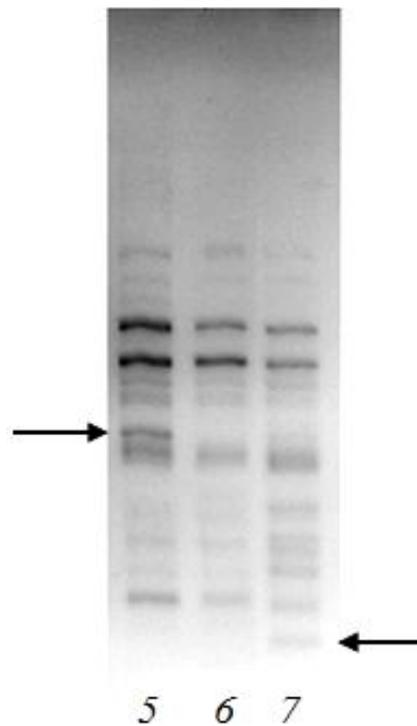
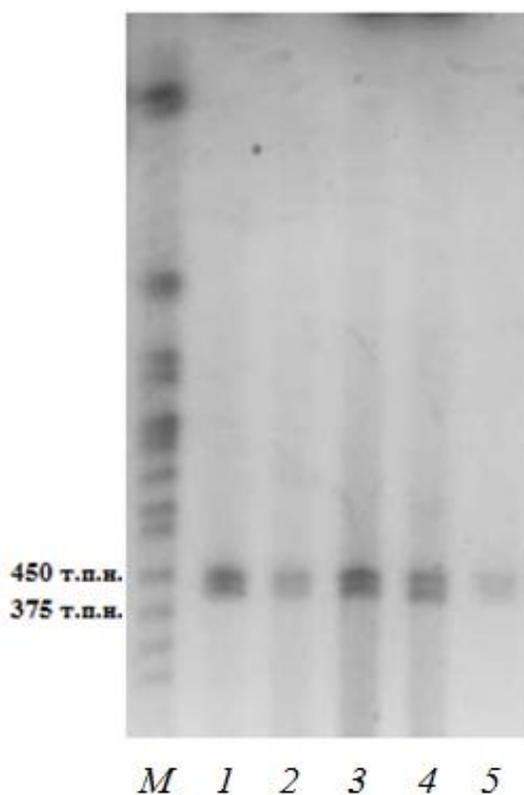


Рисунок 36 – **BOX-ПЦР-профилей** штаммов рода *Rhodococcus* (А, Б).
1 – штамм KBB16; 2 – штамм BBL12-2; 3 – штамм FXO1 и 4 – штамм FXO2 (I-геномогруппа); 5 – штамм VR31-1 (II-геномогруппа); 6 – штамм VR33 (III-геномогруппа); 7 – штамм VR41 (IV-геномогруппа).

А



Б

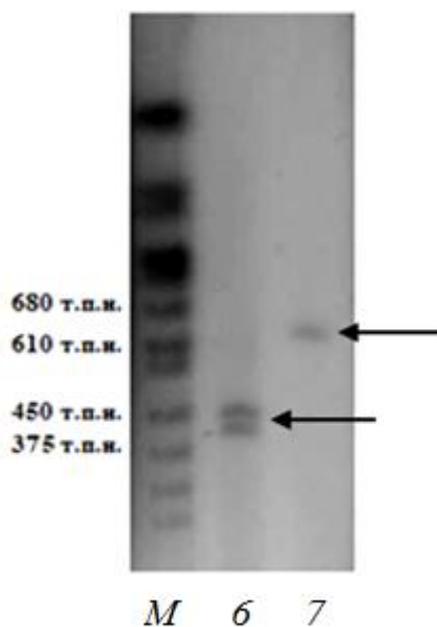


Рисунок 37 – Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов рода *Rhodococcus*, выращенных на среде К1 с бифенилом (А, Б). *M* – маркер молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США); 1 – штамм VR31-1; 2 – штамм VR33; 3 – штамм VR43-1; 4 – штамм FXO1; 5 – штамм FXO2; 6 – штамм KBB16; 7 – штамм BBL12-2.

При дальнейшем сравнении выделенных штаммов на молекулярно-генетическом уровне, с использованием метода пульс-электрофореза проведен скрининг на наличие плазмидной ДНК. Установлено, что преимущественно все исследуемые штаммы (КВВ16, FXO1, FXO2, VR31-1, VR33, VR43-1) характеризовались наличием двух плазмид размером ~ 400 т.п.н. и ~ 450 т.п.н., только в одном изоляте (штамм BBL12-2) обнаружена плазида размером ~ 650 т.п.н. (рисунок 37).

4.2.5. Биодеградационные свойства бактерий рода *Rhodococcus*

У семи бактерий-деструкторов бифенила рода *Rhodococcus* была определена способность использовать различные моно(поли)ароматические соединения в качестве субстратов. Помимо способности поддерживать эффективный рост на агаризованной и жидкой минеральной среде с бифенилом в качестве единственного источника углерода и энергии, штаммы демонстрировали хороший рост на агаризованных средах с такими моноароматическими субстратами как бензол, толуол, фенол и дибутилфталат (данные не приводятся). При культивировании в жидкой минеральной среде родококки характеризовались способностью использовать в качестве субстратов моноароматические кислоты: *орто*-фталевую, *пара*-оксибензойную, протокатеховую, бензойную (таблица 16). Что касается деструкции полиароматических соединений, в жидкой минеральной среде активный рост наблюдался на бифениле, нафталине и отсутствовал на фенантрене.

Анализируя полученные данные, можно сделать предположение, что деструкция бифенила исследуемыми штаммами рода *Rhodococcus* осуществляется по “верхнему пути” разложения бифенила с образованием пентадиеновой и бензойной кислот, с последующим разложением бензойной кислоты (Pieper, Seeger, 2008). Все штаммы продемонстрировали активный рост на бензойной кислоте (таблица 16). Вероятно, далее метаболический путь разложения бензоата идет по классическому пути с образованием пирокатехина.

Таблица 16 – Рост штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* в жидкой минеральной среде К1 на ароматических соединениях

Субстрат	Штамм						
	КВВ16	ВВЛ12-2	FXO1	FXO2	VR31-1	VR33	VR43-1
Бифенил	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Нафталин	+++	++	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+++	+++	+++
<i>орто</i> -Фталева кислота	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>пара</i> - Оксибензой- ная кислота	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Протокатехо- вая кислота	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+	++	+++	+++	+++
Бензойная кислота	+++	+++	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+++	+++	+++

Примечание. “–” – не обнаружено; “т.о.с.” – темное окрашивание среды культивирования; “+” – ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,3 ед.; “++” – ОП₆₀₀ от 0,4 до 0,7 ед.; “+++” – ОП₆₀₀ выше 0,7 ед.

Также установлено, что исследуемые штаммы имеют активный рост на *орто*-фталевой кислоте (*орто*-ФК). Расщепление *орто*-ФК происходит через стадию образования 3,4-дигидроксифталевой кислоты с последующей ее трансформацией до 3,4-дигидроксибензойной кислоты (3,4-ГБК). Далее, предположительно, 3,4-ГБК трансформируется ферментными системами штаммов до соединений основного обмена клетки (Егорова, 2014).

Активный рост КВВ16, ВВЛ12-2, VR31-1, VR33 и VR43-1 на *пара*-оксибензойной и протокатеховой кислотах (таблица 16) может указывать на способность данных штаммов осуществлять разложение бензоата не только по классическому пути с образованием пирокатехина, но и по пути деструкции ПОБК и ПКК (<https://www.genome.jp>).

Два штамма *Rhodococcus* sp. КВВ16 и *Rhodococcus* sp. VR31-1, выделенные из разных экотопов: поверхностного слоя шламохранилища (г. Березники) и донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск), соответственно, имеющие

различие по ВОХ-профилям, проверены на способность разлагать хлорированные бифенилы (таблица 17).

В ходе эксперимента показано, что штаммы эффективно осуществляют деструкцию *орто*- и *пара*-моноХБ в концентрации 96 мг/л, окисляя не хлорированное кольцо молекулы ХБ (таблица 17). При культивировании штаммов на 2-ХБ и 4-ХБ уже к 3 часам инкубации субстраты были полностью утилизированы. В среде с 2-ХБ не были обнаружены промежуточные продукты метаболизма – 2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК), что может указывать на высокую активность ферментных систем деструкции моноХБ у бактериальных штаммов КВВ16 и VR31-1 (Maltseva *et al.*, 1999). Следует отметить, что в среде культивирования с 2-ХБ и 4-ХБ были детектированы соответствующие хлорбензойные кислоты в количестве 0,22-1,05 мг/л (таблица 17). Наличие таких небольших количеств ХБК может указывать на последующее разложение клетками штаммов КВВ16 и VR31-1 этих хлорсодержащих метаболитов.

Разложение штаммами КВВ16 и VR31-1 дихлорированного бифенила (2,4'-диХБ) осуществлялось менее активно, чем монохлорбифенилов. Так, к 24 часам количество субстрата в среде культивирования штамма VR31-1 составляло 82,24 % от теоретически возможного (таблица 17). Штамм КВВ16 характеризовался большей активностью по отношению к дихлорированному бифенилу: остаточное количество 2,4'-диХБ в среде культивирования к 24 часам составляло 45,67 % от теоретически возможного. Для исследуемых штаммов КВВ16 и VR31-1 зарегистрировано накопление продукта *мета*-расщепления дихлорбифенила – 3,8-С1 ГОФДК ($\lambda_{\max} = 396$ нм), количество которого увеличивалось в процессе инкубации и достигало наибольших значений к 24 часам (таблица 17). Присутствие в среде 3,8-С1 ГОФДК указывает на то, что БДО обоих штаммов осуществляет 2,3-диоксигенирование *пара*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ (Maltseva *et al.*, 1999).

Таблица 17 – Деструкция хлорбифенилов штаммами *Rhodococcus* sp. KBV16 и VR31-1

Штамм	Субстрат	Время инкубации (ч)	Содержание субстрата		Продукт деструкции				
			мг/л	%*	ГОФДК		ХБК	мг/л	%*
					$\lambda_{\max, \text{нм}}$	ОП, ед.			
KBV16	2-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	392	0,336		0,49 ± 0,02	0,62
		3	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2-ХБК	1,05 ± 0,03	1,34
		24	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		1,05 ± 0,05	1,34
	4-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,22 ± 0,04	0,28
		3	н.д.	н.д.	416	0,298	4-ХБК	0,50 ± 0,03	0,63
		24	н.д.	н.д.	424	0,357		0,51 ± 0,04	0,65
	2,4'-ХБ	0	44,60 ± 0,01	100,00	396	0,340		0,007 ± 0,002	0,02
		3	36,38 ± 0,02	81,56	396	0,472	2-ХБК	0,009 ± 0,005	0,03
		24	20,37 ± 0,03	45,67	396	1,046		н.д.	н.д.
VR31-1	2-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	389	0,318		н.д.	н.д.
		3	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2-ХБК	0,96 ± 0,03	1,22
		24	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		1,01 ± 0,05	1,29
	4-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,31 ± 0,02	0,39
		3	н.д.	н.д.	411	0,317	4-ХБК	0,46 ± 0,05	0,58
		24	н.д.	н.д.	416	0,376		0,51 ± 0,02	0,65
	2,4'-ХБ	0	44,60 ± 0,01	100,00	396	0,340		0,015 ± 0,004	0,047
		3	40,20 ± 0,02	90,13	396	0,636	4-ХБК	0,024 ± 0,002	0,075
		24	36,68 ± 0,01	82,24	396	1,074		0,031 ± 0,002	0,099

Примечание. 2-ХБ – 2-моноклорбифенил; 4-ХБ – 4-моноклорбифенил; 2,4'-ХБ – 2,4'-дихлорбифенил; ХБК – хлорбензойная кислота; ГОФДК – 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота; “н.д.” – не детектировалось; *% от теоретически возможного.

В инкубационной среде со штаммом КВВ16 выявлены небольшие количества 2-ХБК (через 3 часа – 0,03 мг/л), однако через 24 часа наличия хлорбензоата в среде не наблюдается. Можно предположить, что штамм КВВ16 осуществляет разложение 2-ХБК. С другой стороны, в среде культивирования штамма VR31-1 происходило накопление небольшого количества 4-ХБК (0,031 г/л – через 24 часа), что может свидетельствовать о трансформации 2,4'-диХБ по пути 2,3-диоксигенирования *орто*-хлорированного кольца (Maltseva *et al.*, 1999). Таким образом, БДО штамма VR31-1 может осуществлять окисление как *пара*-, так и *орто*-замещенного кольца молекулы 2,4'-диХБ.

4.2.6. Гены *bphA1* штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus*

Известно, что α -субъединица БДО активного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 состоит из 460 АКО, которые образуют два домена. N-концевой домен включает в себя кластер Риске [2Fe-2S] с 57 по 156 АКО, атомы железа и серы координируют два остатка гистидина (His100 и His121) и два цистеина (Cys98 и Cys118). С-концевой домен (с 167–460 АКО) содержит каталитический карман, в котором находится негемовое железо (Fe II), координированное двумя остатками гистидина (His224 и His230) и одним остатком аспарагиновой кислоты (Asp378). Кластер Риске [2Fe-2S] принимает электроны и переносит к (Fe II), тем самым катализируя ключевую стадию аэробной деградации многих ароматических соединений (Colbert *et al.*, 2000; Furusawa *et al.*, 2004; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAA06868.1>). Предполагается, что размер и форма каталитического кармана напрямую влияют на спектр окисляемых ферментом субстратов и на эффективность взаимодействия, а пространственная структура белка и, соответственно, структура активного центра, в свою очередь, определяется взаимодействием аминокислот (Шумкова, Плотникова, 2012).

В ходе исследования на молекулярно-генетическом уровне у 7 штаммов родококков проведен скрининг *bphA1*-генов, кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, с использованием специфичных праймеров (таблица 3). При амплификации и изучении генов *bphA1* штаммов *Rhodococcus* VR31-1, VR33, VR43-1, выделенных из образцов донных отложений реки

Чапаевки (Самарская область), использовали праймеры VphA1F450 и VphA1R900 (Шумкова и др., 2015), амплифицирующие участок гена *bphA1*, кодирующего кластер Риске [Fe₂-S₂] (таблица 18, рисунок 38). При изучении генов *bphA1* штаммов *Rhodococcus* sp. КВВ16, ВВЛ12-2, FXO1 и FXO2, выделенных с территории Пермского края (ОАО “Уралкалий” БКПРУ-3 и АО “Сибур-Химпром”), использовали праймеры ВРНД-f3 и ВРНД-r1 (Iwai *et al.*, 2010), соответствующего активному центру БДО (таблица 19, рисунок 38).

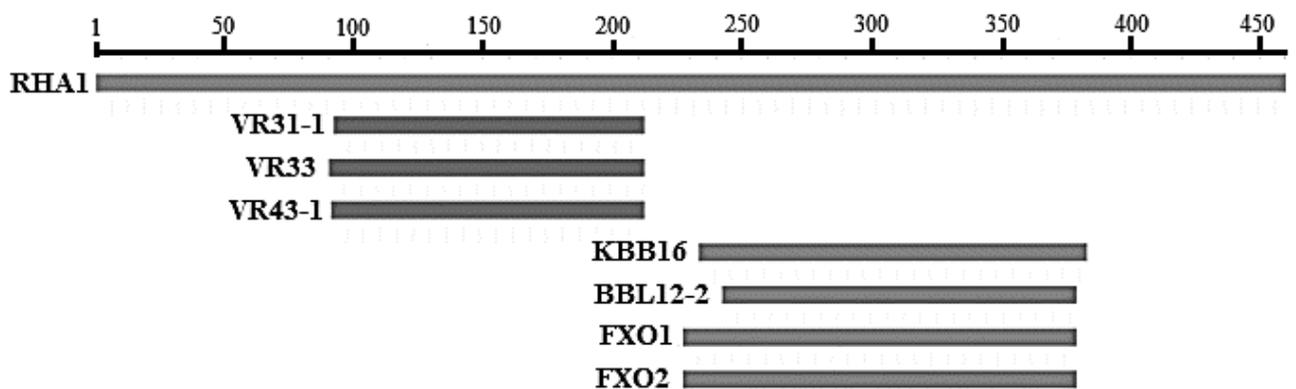


Рисунок 38 – Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей участков генов *bphA1* штаммов рода *Rhodococcus* с α -субъединицей бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *Rhodococcus jostii* RHA (460 АКО). Множественное выравнивание АКО осуществлялось в программе COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>).

С ДНК матриц всех исследуемых изолятов был получен ПЦР-продукт ожидаемого размера – около 500 п.н. (рисунок 39, рисунок 40).

В результате секвенирования и последующего анализа амплифицированных участков *bphA1*-генов исследуемых штаммов родококков наибольшее сходство (99–100 %) было обнаружено с генами α -субъединиц бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*), изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (*ipbA1*, *ipbA2*, *ipbA3*, *ipbA4*) и 3-изопропилкатехол 2,3-диоксигеназы (*ipbC*), а также с генами, кодирующими α -субъединицу толуол диоксигеназы (*terpA*)

и 1,2-дигидробензол-1,2-диол дегидрогеназы (*bnzB*), известных бактерий-деструкторов ароматических соединений рода *Rhodococcus* (таблица 18, таблица 19).

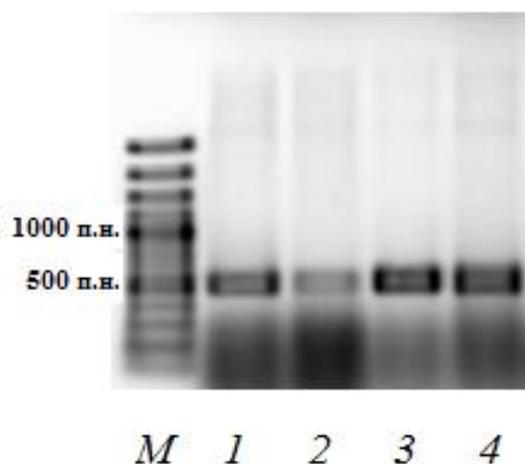


Рисунок 39 – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *bphA1* (участок активного центра БДО) штаммов рода *Rhodococcus*, выделенных с территории Пермского края. *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва); *1* – штамм KBB16; *2* – штамм BBL12-2; *3* – штамм FXO1; *4* – штамм FXO2.

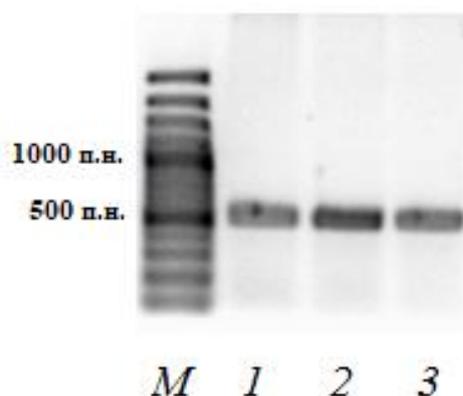


Рисунок 40 – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *bphA1* (кластер Риске) штаммов рода *Rhodococcus*, выделенных из образцов донных отложений реки Чапаевки (Самарская область). *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва); *1* – штамм VR31-1; *2* – штамм VR33; *3* – штамм VR43-1.

Анализ нуклеотидных последовательностей участков генов *bphA1*, кодирующих кластер Рiske, штаммов VR31-1, VR33 и VR43-1 показал 100 %-ное сходство с генами α -субъединиц бифенил ДО штаммов *R. wratislaviensis* P13 и P20 и изопропилбензол ДО штамма *R. erythropolis* BD2 (таблица 18). Штаммы *R. wratislaviensis* P13, P20 были выделены из почвы, загрязненной хлорорганическими соединениями (территория предприятия ОАО “Галоген”, г. Пермь) и являются активными деструкторами бифенила и хлорированных бифенилов (Шумкова и др., 2015). Другой штамм, *R. erythropolis* BD2, изолированный при культивировании на изопропилбензоле, характеризуется способностью утилизировать широкий спектр моно(поли)ароматических соединений, таких как бифенил, толуол, бензол, фенол и другие (Dabrock *et al.*, 1994). Меньший процент сходства (99,7 %) был получен при сравнении участков *bphA1*-генов исследуемых штаммов с генами *btfA*, *bnzB* и *terpA* представителей *R. wratislaviensis*. Известно, что большинство бифенил ДО рода *Rhodococcus* имеют сходство с бензол/толуол ДО и способны окислять соединения со сходной химической структурой (Gibson, Parales, 2000). Сравнительный анализ амплифицированных фрагментов ДНК (*bphA1*), кодирующих кластер Рiske, с *bphA1*-геном активного деструктора бифенила/ПХБ *R. jostii* RHA1 показал их сходство на уровне 99,1 % (таблица 18). Штамм *R. jostii* RHA1 обладает исключительно высокой деструктивной активностью по отношению к индивидуальным конгенерам хлорированных бифенилов и различным смесям ПХБ (Furukawa, 2000). Ранее, из загрязненной почвы с территории предприятия ОАО “СВЗХ” (г. Чапаевск) был выделен штамм *R. wratislaviensis* Ch628, активный деструктор полихлорированных бифенилов и других хлорароматических соединений. Штамм Ch628 осуществлял практически полное разложение моноХБ (2-ХБ, 4-ХБ, в концентрации 18,9 мг/л) и диХБ (2,4'-ХБ, в концентрации 22,3 мг/л) за 48 часов. Следует отметить, что помимо деструкции отдельных хлорированных бифенилов данный штамм был способен к деградации и коммерческих смесей, таких как “Делор 103” и “Совол” (Егорова и др., 2014). Филогенетический анализ

показал 100 % сходство анализируемых участков *bphA1*-генов штаммов VR31-1, VR33 и VR43-1 и штамма Ch628. На основании полученных данных можно предположить, что на загрязненной хлорорганическими соединениями территории предприятия ОАО “СВЗХ” (как в почве, так и в донных отложениях) функционируют микробные сообщества, в составе которых доминируют бактерии-деструкторы рода *Rhodococcus* (вид *R. wratislaviensis*), содержащие сходные ключевые гены (*bph*-гены) разложения бифенила/ПХБ и других (хлор)ароматических соединений.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *bphA1*, кодирующих активный центр α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, штаммов KBB16, BBL12-2, FXO1 и FXO2, выделенных с территории Пермского края, имели наибольший процент сходства с генами (*bphA1*), кодирующими α -субъединицу БДО, некультивируемых бактерий (99,33 %) и штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ (сходство 100–99,11 %), а также деструкторов других ароматических соединений, рода *Rhodococcus* (таблица 19). Анализируемые участки *bphA1*-генов исследуемых штаммов были наиболее близки с *bphA1*-генами *R. jostii* 3B12 и *R. wratislaviensis* P13 / P20 (процент сходства 99,11 % и 99,77 / 100 %, соответственно), с генами, кодирующими α -субъединицы бензотрифторид 2,3-диоксигеназы (*btfA1*) и 1,2-дигидробензол-1,2-диол-дегидрогеназы (*bnzB*), родококков (таблица 19). Штаммы *Rhodococcus* sp. P13, P20, *bphA1*-гены которых имели 100 % сходство с генами исследуемых штаммов, ранее были выделены из загрязненных экотопов Пермского края (Шумкова и др., 2014; Шумкова и др., 2015). Данные штаммы характеризовались наличием субстратной специфичности в отношении (моно)полиароматических углеводов (бифенил, нафталин, бензол и толуол), а также осуществляли разложение хлорированных бифенилов (2,4'-диХБ), окисляя как *орто*-, так и *пара*- хлорированное кольцо (Шумкова и др., 2014; Шумкова и др., 2015).

Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа транслированных АК последовательностей активного центра БДО исследуемых штаммов KBB16, BBL12-2, FXO1 и FXO2 и гомологичных АК

последовательностей из базы данных GenBank, отражает разнообразие фрагментов α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, кодирующих активный центр фермента, бактерий рода *Rhodococcus* (таблица 19, рисунок 41).

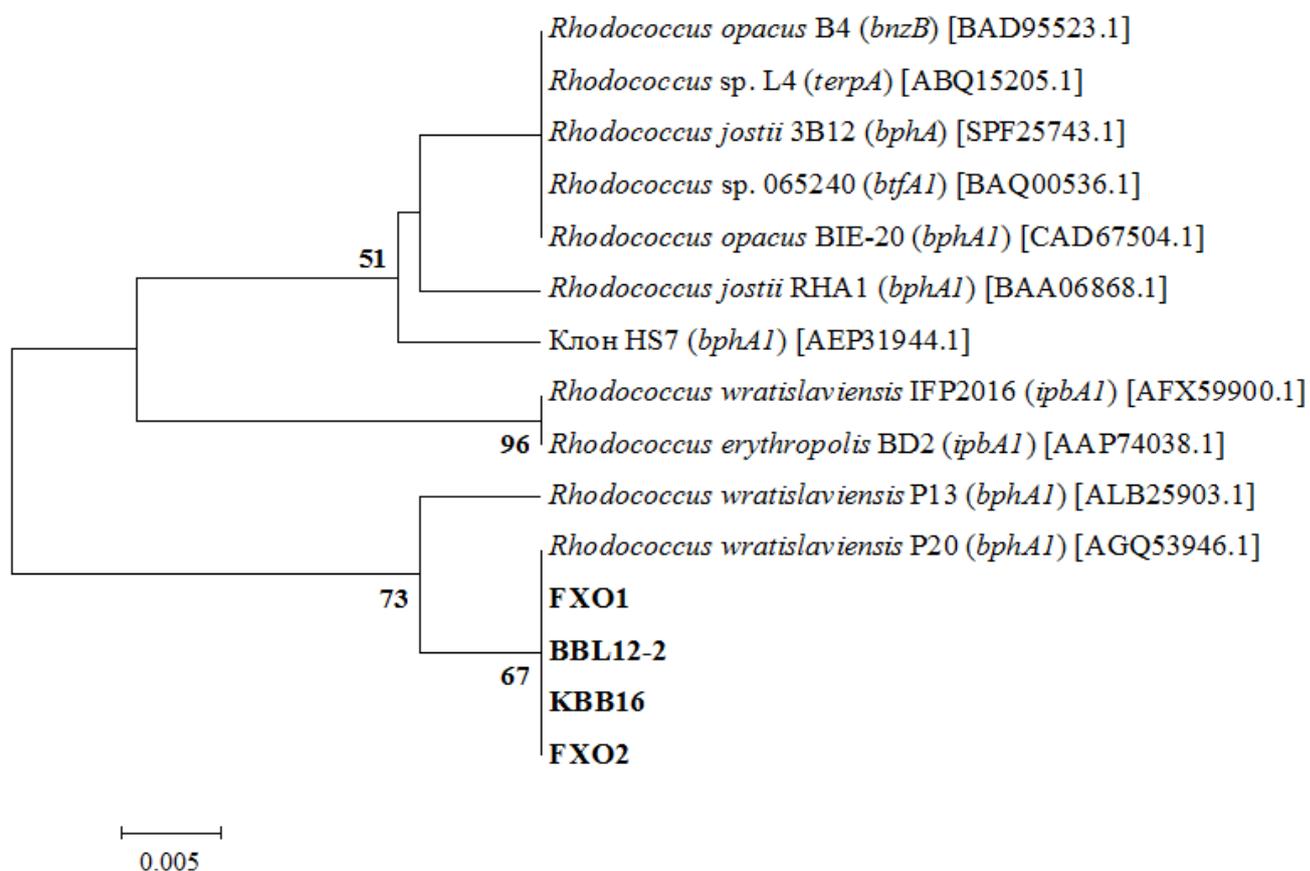


Рисунок 41 – Положение *bphA1*-генов (фрагменты, кодирующие активный центр БДО) исследуемых штаммов рода *Rhodococcus* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа.

Представленное филогенетическое разнообразие может зависеть непосредственно от функции, выполняемой активным центром БДО, предположительно, конфигурация каталитического кармана влияет на спектр окисляемых субстратов (Шумкова, Плотникова, 2012).

Таблица 18 – Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов *bphA1*-генов, кодирующих кластер Риске, исследуемых штаммов с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка
VR31-1, VR33, VR43-1	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P13/P20	KP972446.1/ KC832467.1	100	Территория завода ОАО “Галоген” (г. Пермь)	Шумкова и др., 2015
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA</i>); <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> IFP2016	JX569344.1	100	н.д.	н.д.
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2 (pBD2)	AY223810.1	100	н.д.	Stecker <i>et al.</i> , 2003
	Ген α -субъединицы бензотрифторид 2,3-диоксигеназы (<i>btfA1</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	AB970510.1	99,7	н.д.	Yano <i>et al.</i> , 2015
	Ген 1,2-дигидробензол-1,2-диол дегидрогеназы (<i>bnzB</i>); <i>Rhodococcus opacus</i> B4 (pROB02)	AP011117.1	99,7	Территория химических заводов (Хиросима, Япония)	Na <i>et al.</i> , 2005
	Ген α -субъединицы толуол диоксигеназы (<i>terpA</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. L4	EF527236.1	99,7	Ил из очистных сооружений химического завода (Таиланд)	н.д.
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	D32142.1	99,1	Загрязненная почва (Япония)	Masai <i>et al.</i> , 1995

Примечание. “н.д.” - нет данных.

Таблица 19 – Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов *bphA1*-генов, кодирующих активный центр БДО, штаммов рода *Rhodococcus* с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Штамм	Гомологичные гены в GenBank	Номер GenBank	Сходство, %	Место выделения	Ссылка		
КВВ16, ВВЛ12-2, FXO1, FXO2	Гены α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>);	JN675903.1/ JN675902.1/ JN675900.1/ JN675901.1	98,6-99,3	Почва карьеров – “La Brea Tar Pit” (США, Лос-Анджелес)	н.д.		
	клоны HS7/HS8/NS7/NS8, некультивируемые бактерии						
	Ген α -субъединицы бифенил диоксигеназы (<i>bphA</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> 3B12	LT986350.1	99,1			Ризосфера	н.д.
	Ген α -субъединицы бензотрифторид 2,3-диоксигеназы (<i>btfA1</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	AB970510.1	98,8			н.д.	Yano <i>et al.</i> , 2015
	Ген 1,2-дигидробензол-1,2-диол -дегидрогеназы (<i>bnzB</i>); <i>Rhodococcus opacus</i> B4 (pROB02)	AP011117.1	98,8	Территория химических заводов (Хиросима, Япония)	Na <i>et al.</i> , 2005		
	Ген α -субъединицы толуол диоксигеназы (<i>terpA</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. L4	EF527236.1	98,6	Ил из очистных сооружений химического завода (Таиланд)	н.д.		
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2 (pBD2)	AY223810.1	98,2	н.д.	Stecker <i>et al.</i> , 2003		
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P13/ P20	KP972446.1	99,7/100	Территория завода ОАО “Галоген” (г. Пермь)	Шумкова и др., 2015		
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	D32142.1	95,9	Загрязненная почва (Япония)	Masai <i>et al.</i> , 1995		

Примечание. “н.д.” - нет данных.

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *bphA1* исследуемых штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus*: VR31-1, VR33, VR43-1, а также KBB16, BBL12-2, FXO1 и FXO2, депонированы в международную базу данных GenBank (приложение 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований показали, что в загрязненных почвах/грунтах, сточных водах, донных отложениях, отобранных на территориях ряда географически удаленных промышленных территорий РФ, включая порт г. Анадырь (Чукотский АО), ПАО “Уралкалий” г. Березники (Пермский край), ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь), АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь), река Чапаевка, протекающая по территории ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (Самарская область), порт г. Евпатория (п-ов Крым), нефтебаза г. Феодосия (п-ов Крым), присутствуют сообщества бактерий, способные осуществлять разложение ароматических соединений, в том числе бифенила и хлорпроизводных бифенила – полихлорбифенилов.

С использованием молекулярно-генетических методов во всех отобранных образцах выявлены бактериальные гены (*bphA1*), детерминирующие разложение бифенила/ПХБ. Ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента, ответственного за инициацию деградации бифенила и ПХБ, используется в качестве маркерного гена для оценки процессов бактериальной деструкции токсичных соединений (бифенила, ПХБ) на загрязненных территориях (Iwai *et al.*, 2010). Изучение разнообразия исследуемого гена, его филогенетическая характеристика необходимы для выявления потенциальных генетических ресурсов и, как следствие, создание перспективных биотехнологий мониторинга и детоксикации бифенила/ПХБ в окружающей среде.

В бактериальных сообществах донных отложений Анадырского залива (порт г. Анадырь, полоса прибоя) выявлены преимущественно *bphA1*-гены грамположительных бактерий порядка *Actinomycetales*, которые сходны на 69–91 % с генами, кодирующими α -субъединицы диоксигеназ, гидроксиллирующих ароматическое кольцо, в том числе *bphA1*-генами представителей родов *Janibacter*, *Rhodococcus*. В результате проведенных экспериментальных работ получены накопительные культуры (ассоциации

микроорганизмов), способные использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии при пониженных температурах (+10°C). Однако чистые культуры (активные бактерии-деструкторы бифенила) выделить не удалось.

Микробные сообщества загрязненных промышленных территорий Урала (Пермский край) и Поволжья (Самарская область) также характеризовались разнообразием бактерий (генов), контролирующих процесс разложения бифенила.

В шламохранилище калийного предприятия (г. Березники, Пермский край) присутствуют преимущественно некультивируемые бактерии, близкородственные представителям рода *Pseudomonas*, содержащие гены α -субъединиц ДО, гидроксилирующих ароматическое кольцо углеводов (РАН-RHD α -генов). Количество копий РАН-RHD α -генов составляло $3,8 \times 10^7$ ($\pm 5,7 \times 10^7$) на 1 г образца шлама. Интересен тот факт, что выявленные нуклеотидные последовательности (*bphA1*) имели невысокий уровень сходства (86,72–80,43 %) с гомологичными последовательностями, присутствующими в базе данных GenBank (таблица 5). Что касается анализа филогенетического дерева, иллюстрирующего взаимоотношения аминокислотных последовательностей генов гидроксилирующих диоксигеназ (в т.ч. бифенил 2,3-диоксигеназ), то здесь важно отметить, что три исследуемых клона (из четырех) расположены на одной ветви со штаммами, имеющими различные типы α -субъединиц гидроксилирующих диоксигеназ (кумол ДО, изопропилбензол ДО, этилбензол ДО и алкилбензол ДО), кодирующих гены *cumA1*, *ipbA1*, *edoA1* и *ebdA1* (рисунок 16). Таким образом, можно предположить, что в микробном сообществе шламохранилища присутствуют бактерии с новыми диоксигеназными активностями, способными осуществлять разложение бифенила/ПХБ и других ароматических углеводов.

В микробном сообществе грунта вблизи солеотвала калийного предприятия (г. Березники) выявлены гены, имеющие высокое сходство (99,85–99,07 %) с генами α -субъединицы подсемейства бензол/толуол диоксигеназ (Б/Т ДО): бифенил ДО (*bphA1*), изопропилбензол ДО (*ipbA1*),

бензотрифторид ДО (*btfA1*), бензол ДО (*bnzA1*) и толуол ДО (*terpA*) бактерий рода *Rhodococcus*. Эти гены, кодирующие α -субъединицу Б/Т ДО, были обнаружены у 97,2 % клонов (от общего количества, полученных в результате клонирования). Из исследуемого образца грунта выделен активный штамм-деструктор бифенила/ПХБ *Rhodococcus* sp. КВВ16, содержащий ген *bphA1* и имеющий сходство более 99 % с вышеперечисленными ДО родококков (таблица 7, рисунок 19). Кроме того, в загрязненном грунте выявлены немногочисленные нуклеотидные последовательности (не превышающие 7 % от общего количества исследуемых клонов), близкородственные генам *bphA1* бактерий сем. *Burkholderiaceae* (сходство 86,65 %) и некультивируемых бактерий (сходство 81,35 %).

В микробном сообществе загрязненной почвы с территории завода ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” (г. Пермь) также обнаружены бактериальные гены, контролирующие начальные этапы деструкции ароматических соединений (бифенила/ПХБ). Методом ПЦР-РВ выявлено значительное количество копий РАН-RHD α -генов ($2,41 \times 10^8 (\pm 3,57 \times 10^7)$ на 1 г почвы), участвующих в окислении этих соединений. Большинство клонированных фрагментов ДНК (*bphA1*-генов), составляющих ~ 90 % от общего количества полученных рекомбинантных клонов, имели высокий процент сходства (97,8–99,5 %) с генами, кодирующими кластер Риске α -субъединицы диоксигеназ, некультивируемых бактерий (Cárcer *et al.*, 2007). Также выявлена нуклеотидная последовательность (клон Pp105), имеющая высокое сходство с генами *bphA1* некультивируемых бактерий (98,4–99,3 %) и бактерий рода *Pseudomonas* (91 % сходства) (таблица 8, рисунок 23). В ходе дальнейшего исследования из накопительной культуры загрязненной почвы выделены активные штаммы-деструкторы рода *Pseudomonas*.

Подробного исследования пула *bph*-генов в сточных водах предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь) не проводилось, однако из промышленных стоков были выделены активные бактерии-деструкторы бифенила рода

Rhodococcus (штаммы FXO1, FXO2), что указывает на присутствие бифенил/ПХБ-деградирующего бактериального сообщества на территории предприятия.

В микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки (территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов”, Самарская область) обнаружены гены, близкородственные (сходство 98,9–99,2 %) генами α -субъединиц бифенил 2,3-ДО и других гидроксилующих диоксигеназ (подсемейство Б/Т ДО) бактерий рода *Rhodococcus*, а также некультивируемых бактерий из загрязненной почвы г. Лос-Анджелес (США) (таблица 9, рисунок 29). Из донных отложений выделено три активных штамма-деструктора бифенила/ПХБ рода *Rhodococcus*. Интересен факт, что транслируемые аминокислотные последовательности *bphA1*-генов штаммов *Rhodococcus* sp. VR31-1, VR33 и VR43-1 были идентичны как между собой, так и с гомологичными последовательностями штаммов *Rhodococcus* sp. P13, P20, выделенных ранее из грунта химического предприятия ОАО “Галоген” г. Перми (Шумкова и др., 2015), и штамма *Rhodococcus* sp. Ch628, изолированного ранее из почвы с территории ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (Егорова и др., 2017; Egorova *et al.*, 2017). Родококки характеризовались способностью осуществлять деструкцию бифенила и ПХБ, а штамм Ch628 – разложение гексахлорбензола, гексахлорциклогексана, дихлордифенилтрихлорэтана, дихлордифенилдихлорэтана (Egorova *et al.*, 2017). Можно предположить, что этот вариант *bphA1*-гена имеет широкое распространение в микробных сообществах центральной части России (Урал, Поволжье).

В микробных сообществах полуострова Крым (донные отложения, порт г. Евпатория; загрязненная почва, Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами, г. Феодосия) обнаружены бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ. Методом ПЦР в исследуемых образцах выявлены нуклеотидные последовательности (*bphA1*), кодирующие α -субъединицу бифенил 2,3-ДО. Предварительный анализ ДНК, выделенной из образца с территории нефтебазы г. Феодосия, показал, что в исследуемой почве присутствуют гены, имеющие высокую гомологию с *bphA1*-генами некультивируемых бактерий из ПХБ-

загрязненной почвы (Чехия) и штамма-деструктора бифенила и 4-хлорбифенила *Pseudomonas alcaligenes* B-357^T (100 % и 99,78 %, соответственно).

В результате проведенных исследований по разнообразию *bphA1*-генов можно сделать вывод, что даже в пределах одного бактериального сообщества присутствуют различные типы *bph* генов (Hirose *et al.*, 2019). Известно, что продолжительное воздействие загрязняющих веществ (в том числе, ПХБ и полициклическими ароматическими углеводородами) на окружающую среду играет важную роль в эволюции генетических систем, ответственных за разрушение антропогенных загрязнителей, характеризующихся высоким уровнем разнообразия нуклеотидных последовательностей. Следовательно, повышенные концентрации загрязнителей окружающей среды могут выступать в качестве селективного давления для увеличения разнообразия генов, кодирующих ферменты подсемейства бифенил/толуол ДО (в том числе, бифенил ДО (*bphA1* генов)), тем самым изменяя потенциал микробных сообществ, повышая деструктивные свойства (Hoostal, Bouzat, 2016). Таким образом, разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе может влиять на процессы биоремедиации, позволяя окислять более широкий спектр конгенов ПХБ и других (хлор)ароматических соединений.

Метагеномный анализ отдельных микробных сообществ позволяет изучить локальные экотопы, в то время как для исследования функциональных, филогенетических и таксономических закономерностей, происходящих в биосфере, необходимо проведение системного и комплексного анализа накопленных метагеномных данных. В процессе изучения разнообразия *bphA1*-генов отдельных микробных сообществ загрязненных территорий ряда географически удаленных регионов Российской Федерации (Чукотский АО, Пермский край, Самарская область) было принято решение объединить и провести сравнительный анализ транслированных нуклеотидных последовательностей *bph*-генов (рисунок 42). Построенная дендрограмма состоит из двух крупных кластеров.

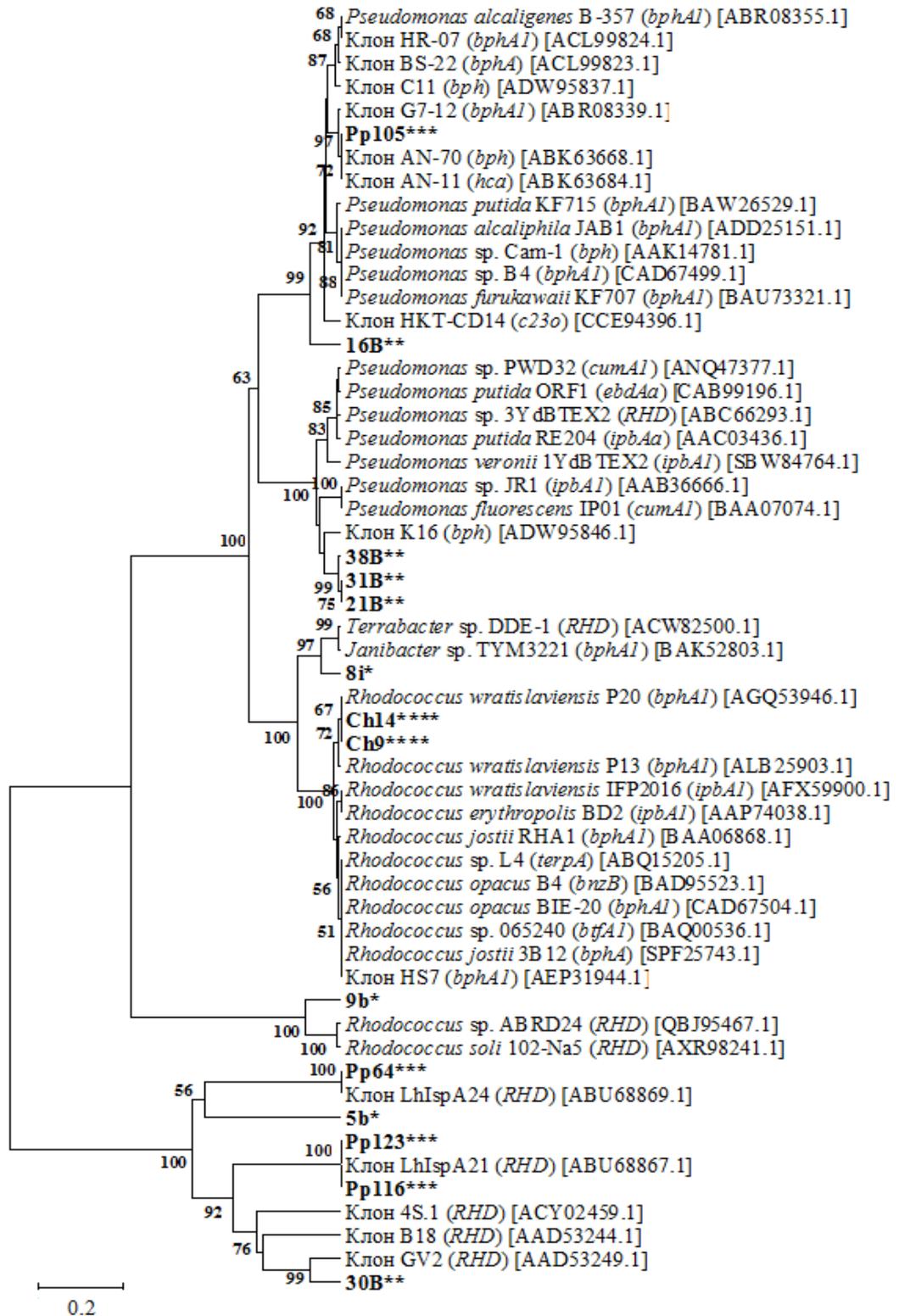


Рисунок 42 – Дендрограмма транслированных аминокислотных последовательностей *bphA1*-генов исследуемых клонов. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа. * – Прибрежная зона порта Анадырь; ** – район промышленных разработок ВМКМС (г. Березники); *** – ОАО “Пермский завод смазок и СОЗ” (г. Пермь); **** – ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” (г. Чапаевск).

В первый кластер входят клоны (Pp105, 16B, 38B, 31B, 21B, 8i, Ch14, Ch9, 9b), содержащие *bphA1*-гены, имеющие наибольший процент сходства (99–100 %) с генами, кодирующими ферменты ответственные за разложение бифенила, ПХБ и других ароматических соединений, как некультивируемых бактерий, так и культивируемых бактерий-деструкторов.

Ко второму кластеру отнесены клоны (Pp64, 5b, Pp123, Pp116, 30B), имеющие высокий процент сходства (до 100 %) с генами, кодирующими диоксигеназы гидроксилирующие ароматическое кольцо, исключительно некультивируемых бактерий. Таким образом, показано, что в микробных сообществах донных отложений прибрежной зоны порта Анадырь (клон 5b), шламохранилище калийного предприятия (г. Березники) (клон 30B) и почве территории ОАО “Пермский завод смазок и СОЗ” (клоны Pp64, Pp123, Pp116) присутствуют бактерии-деструкторы, содержащие ранее не описанные диоксигеназы, гидроксилирующие ароматическое кольцо. В выше указанных сайтах также были выявлены *bph*-гены (“*bph*-подобные” гены), близкородственные таковым штаммов рода *Pseudomonas* (клоны Pp105, 16B, 38B, 31B, 21B) и родов *Rhodococcus* (клон 9b), *Janibacter* и *Terrabacter* (клон 8i). На дендрограмме эти клоны входят в другой (первый) крупный кластер, представленный в основном культивируемыми бактериями (рисунок 42).

В результате филогенетического анализа установлено, что наибольший процент сходства ряда клонированных участков *bphA1*-генов наблюдался с генами представителей филумов *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, формирующих на дендрограмме два кластера (ветви).

Представители филума *Actinobacteria* известны как деструкторы сложных органических соединений, в том числе углеводов природного и техногенного происхождения. Бактерии филума *Actinobacteria* встречаются не только в почвенных, но также широко распространены в пресноводных и морских экосистемах (Kampfer, 2010). Следует отметить, что представители *Actinobacteria* являются неотъемлемой частью микробных сообществ арктических регионов, например, в прибрежных районах Чукотского моря их доля составляет 25 %

(Bienhold *et al.*, 2012). Так, клонированные *bphA1*-гены, гомологичные генам бактерий-деструкторов родов *Rhodococcus*, *Janibacter* и *Terrabacter* (филум *Actinobacteria*) были выделены из техногенных бактериальных сообществ донных отложений прибрежной зоны порта Анадырь (клоны 8i, 9b) и реки Чапаевки, территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (клоны Ch9 и Ch14). Исследуемые *bphA1*-гены клонов Ch9 и Ch14 характеризуются филогенетической близостью с генами штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus*, а клон 8i – с генами бактерий родов *Janibacter* и *Terrabacter*. Интересно, что клон 9b объединяется в отдельно стоящий кластер с двумя бактериями рода *Rhodococcus*: ABRD24 и 102-Na5 (сходство с генами, кодирующими α -субъединицы ДО, гидроксимирующего ароматическое кольцо).

Следует отметить, что гены (*bphA1*) клонов: 16B, 21B, 31B, 38B (микробное сообщество шламохранилища (г. Березники)) и Pp105 (почва ОАО “Пермского завода смазок и СОЖ” (г. Пермь)) имели наибольшее сходство с генами штаммов рода *Pseudomonas* (филум *Proteobacteria*) и некультивируемых бактерий. Группа клонов 21B, 31B, 38B и клон 16B формируют две отдельные ветви, в то время как клон Pp105 расположен на одной ветви с некультивируемыми бактериями (рисунок 42). На дендрограмме продемонстрировано, что клоны 21B, 31B, 38B и клоны 16B, Pp105 относятся к разным кластерам. Следовательно, *bphA1*-гены клонов 16B и Pp105 наиболее близкородственны между собой по сравнению с генами других исследуемых клонов. В тоже время, клон 16B формирует отдельную ветвь, удаленную от других известных АК последовательностей (α -субъединиц ДО), что указывает на его уникальность.

Таким образом, в техногеннозагрязненных экотопах географически удаленных регионов России (Чукотка, Урал, Поволжье, п/остров Крым) выявлены бактериальные генетические структуры (*bphA1*-гены), контролирующих разложение бифенила, ПХБ и других ароматических соединений – токсичных загрязнителей окружающей среды. Обнаруженные нуклеотидные последовательности (гены α -субъединицы гидроксимирующего диоксигеназ) характеризовались разнообразием. Не были выявлены идентичные *bphA1*-гены в

разных географически удаленных районах. В то время как в природной незагрязненной почве с перевала Кыртыкауш (республика Кабардино-Балкария) отсутствовали *bphA1*-гены и, соответственно, бактерии-деструкторы бифенила и его хлорированных производных.

Другой частью настоящей работы являлось выделение и характеристика активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ. Использование бактерий-деструкторов при восстановлении загрязненных территорий (почв, водоемов, стоков и отходов химических предприятий) является одной из приоритетных задач экобиотехнологии (Sharma *et al.*, 2018). Из образцов почвы, донных отложений, шламов, отобранных с территорий промышленных предприятий: ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” (г. Пермь); АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь); ПАО “Уралкалий” (г. Березники, Пермский край); ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (г. Чапаевск, Самарская область), было выделено два штамма-деструктора бифенила рода *Pseudomonas* и семь штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus*. Три активных штамма-деструктора, выделенные из различных экотопов, изучены более подробно.

Штамм *Pseudomonas* sp. VRP2-6, изолированный из загрязненной почвы (г. Пермь), эффективно утилизировал *ortho*- и *para*-моноклорированные бифенилы (2-ХБ и 4-ХБ, концентрация субстрата 250 мг/л) и осуществлял разложение дихлорбифенила (2,4'-диХБ, в концентрации 44,6 мг/л), окисляя как *para*-, так и *ortho*-замещенное кольцо молекулы 2,4'-диХБ. Филогенетический анализ гена *bphA1* штамма *Pseudomonas* sp. VRP2-6 показал наибольшее сходство (не выше 97,3 %) с *bphA1*-генами известных активных деструкторов бифенила/ПХБ рода *Pseudomonas*. Наиболее близкими (уровни сходства 97,3 и 97,1 %, соответственно) по *bphA1*-генам являются деструкторы бифенила *P. putida* B6-2 (Li *et al.*, 2009) и *Pseudomonas* sp. B3B (Kahl, Hofer, 2003). Также высокий процент сходства (около 90 %) *bphA1*-гена исследуемого штамма VRP2-6 имел с подобными генами хорошо охарактеризованных штаммов *P. furukawaii* KF707 и *P. putida* KF715, которые в свою очередь являются активными бактериями-деструкторами хлорированных бифенилов, а также

смесей ПХБ (Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018). В клетках штамма VRP2-6, выращенном на среде с бифенилом, методом пульс-электрофореза обнаружена плазида размером около 280 т.п.н.

Два других штамма, *Rhodococcus* sp. KBB16 и *Rhodococcus* sp. VR31-1, выделенные из отходов предприятия ПАО “Уралкалий” (Пермский край) и донных отложений р. Чапаевки (Самарская область), соответственно, способны эффективно утилизировать 2-ХБ и 4-ХБ (концентрация субстрата 94,2 мг/л) и 2,4'-диХБ (концентрация субстрата 44,6 мг/л). Причем, клетки штаммов родококков демонстрировали разные активности: штамм KBB16 осуществлял окисление только *para*-замещенного кольца молекулы 2,4'-диХБ, в то время как штамм VR31-1 был способен окислять как *para*-, так и *ortho*-замещенное кольцо молекулы 2,4'-диХБ. Активность штаммов (KBB16 и VR31-1) по отношению к хлорированным бифенилам подтверждается и анализом их генетических структур. Результаты филогенетического анализа *bphA1*-генов штамма *Rhodococcus* sp. VR31-1 показали высокий уровень сходства (100–99,7 %) с гомологичными генами активных деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*, в том числе с *bphA1*-генами активного деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (сходство 99,1 %). Сходство 100 % наблюдалось со штаммами *R. wratislaviensis* P13, P20, которые были выделены из почвы, загрязненной хлорорганическими соединениями (территория предприятия ОАО “Галоген”, г. Пермь) и являются активными деструкторами бифенила и хлорированных бифенилов (Шумкова и др., 2015). Кроме того, штамм VR31-1 характеризовался наличием двух плазмид размером ~ 400 т.п.н., ~ 450 т.п.н. Известно, что у бактерий рода *Rhodococcus* гены (опероны), контролирующие разложение ПХБ, часто имеют плазмидную локализацию (Shimizu *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2018).

Таким образом, в рамках исследовательской работы были выделены и охарактеризованы два активных штамма-деструктора бифенила/ПХБ (*Pseudomonas* sp. VRP2-6 и *Rhodococcus* sp. VR31-1), которые представляют интерес для дальнейшего изучения и использования в биотехнологических целях.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведена оценка биодеградативного потенциала микробных сообществ географически удаленных территорий Российской Федерации в отношении стойких органических соединений – бифенила и полихлорированных бифенилов. Экспериментально подтверждено использование гена *bphA1* (ключевой ген деструкции бифенила/ПХБ) в качестве маркера для выявления бактерий-деструкторов в объектах окружающей среды.

2. Показано, что в микробных сообществах техногеннозагрязненных почв, донных отложений и сточных вод Пермского края, Самарской области, Республики Крым присутствуют гены, гомологичные (сходство 99–100 %) *bphA1*-генам активных деструкторов бифенила/ПХБ и некультивируемых бактерий. В незагрязненной природной почве (перевал Кыртыкауш, республика Кабардино-Балкария) не выявлены гены *bphA1*.

3. В загрязненных экотопах Чукотского автономного округа и Пермского края обнаружены новые “*bphA1*-гены”, имеющие низкий процент сходства (68,9–90,3 %) с известными генами диоксигеназ, гидроксимирующих бензольное кольцо ароматических соединений.

4. Из образцов почвы (г. Пермь) выделены активные штаммы-деструкторы бифенила рода *Pseudomonas*, близкородственные по гену 16S рНК с *P. alcaligenes* NBRC 14159^T и *P. taiwanensis* BCRC 17751^T. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *bphA1* штаммов *Pseudomonas* spp. VRP2-2 и VRP2-6 показал их идентичность и наибольшее сходство на уровне 89,8–97,3 % с *bphA1*-генами активных деструкторов бифенила/ПХБ рода *Pseudomonas*. В клетках штамма VRP2-6 обнаружена плазида размером около 280 т.п.н.

5. Установлено, что семь штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ рода *Rhodococcus*, изолированных из экотопов Пермского края и Самарской области, имели наибольшее сходство с *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T (100 %, ген 16S рНК), а штамм BBL12-2 – с *R. jostii* DSM 44719^T (99,73 %, ген 16S рНК). Филогенетический анализ *bphA1*-генов штаммов рода *Rhodococcus* выявил высокий уровень сходства (до 100 %) с гомологичными генами представителей

этого рода, в том числе с *bphA1*-генами активного деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (99,1 %). Большинство исследуемых штаммов характеризовались наличием плазмид размером около 400 т.п.н. и 450 т.п.н., штамм BBL12-2 содержал плазмиду размером около 650 т.п.н.

6. Показано, что деструкторы бифенила утилизировали 2- и 4-монохлорбифенилы: *Pseudomonas* sp. VRP2-6 в концентрации 250 мг/л (97,1 % и 82,3 % за 24 часа, соответственно) и штаммы рода *Rhodococcus* в концентрации 96 мг/л (100 % за 3 часа). *Pseudomonas* sp. VRP2-6 и *Rhodococcus* sp. KBB16 способны разлагать 2,4'-дихлорбифенил в концентрации 44,6 мг/л (20,0 % и 54,3 % за 24 часа, соответственно), осуществляя окисление как *para*-, так и *ortho*-замещенного кольца молекулы дихлорбифенила. Активность штаммов по отношению к хлорированным бифенилам указывает на перспективность их использования в биотехнологических целях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКО – аминокислотный остаток

АС – ароматические соединения

Б/Т ДО – бензол/толуол диоксигеназа

БДО – бифенил 2,3-диоксигеназа

БСР – богатая среда Раймонда

ВМКМС – Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОФДК – 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель электрофорез

ДДС-Na – додецилсульфат натрия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДО – диоксигеназа

КоА – ацетил-кофермента А

МСР – минеральная среда Раймонда

НК – накопительная культура

ОП – оптическая плотность

орто-ФК – *орто*-фталевая кислота

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПГБК – *пара*-гидроксибензойная кислота

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПКК – протокатеховая кислота

ПХБ – полихлорированные бифенилы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СВЗХ – Средне-волжский завод химикатов

СОЖ – смазочно-охлаждающие жидкости

СОЗ – стойкие органические загрязнители

ХБ – хлорированные бифенилы

ХБК – хлорбензойная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВОХ-ПЦР (polymerase chain reaction of repetitive BOX elements) – полимеразная цепная реакция повторяющихся ВОХ-элементов

DNA-SIP (DNA stable-isotope probing) – стабильное изотопное зондирование

dNTPs (deoxynucleoside triphosphates) – нуклеозидтрифосфаты

IARC (International Agency for Research on Cancer) – Международное агентство по изучению рака

ICEs (integrative conjugative elements) – интегративные конъюгативные элементы

IPTG (isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside) – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) – никотинамидадениндинуклеотид

NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NGS (next generation sequencing) – высокопроизводительное секвенирование

RDase (reductive dehalogenases) – восстановительная дегалогеназа

RHDs (ring-hydroxylating dioxygenases) – гидроксилирующие ароматическое кольцо углеводов диоксигеназы

ROs (aryl hydroxylating Rieske-type dioxygenases) – арил гидроксилирующие диоксигеназы Риске

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бархатов, И.М. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии / И.М. Бархатов, А.В. Предеус, А.Б. Чухловин // Онкогематология. – 2016. – Т.11, №. 4. – С. 56-63.
2. Бачурин, Б.А. Эколого-геохимическая характеристика отходов калийного производства / Б.А. Бачурин, А.Ю. Бабошко // Горный журнал. – 2008. – №. 10. – С. 88-91.
3. Васильев, А.В. Методологические подходы к классификации смазочно-охлаждающих жидкостей и оценке их токсикологического воздействия на человека и биосферу / А.В. Васильев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2017. – Т. 19. – №. 5-2.
4. Васильева, Г.К. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами / Г.К. Васильева, Е.Р. Стрижакова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №. 6. – С. 725-741.
5. Демин, Д.В. Ремедиация почв, загрязненных полихлорбифенилами: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.13 / Демин Дмитрий Викторович. – Пушино, 2013. – 138 с.
6. Егорова, Д.О. Бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов из почв с различным уровнем загрязнения / Д.О. Егорова, Е.А. Шестакова, М.Г. Первова, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2014. – №. 4. – Р. 64-72.
7. Егорова, Д.О. Биоремедиация почвы, длительное время загрязненной дихлордифенилтрихлорэтаном, с использованием аэробного штамма *Rhodococcus wratislaviensis* СН628 / Д.О. Егорова [и др.] // Почвоведение. – 2017. – №. 10. – С. 1262-1269.
8. Егорова, Д.О. Грамположительные бактерии-деструкторы хлорированных бифенилов, перспективные для использования при биоремедиации загрязненных почв / Д.О. Егорова, Е.Г. Плотникова // Биотехнология. – 2009. – №. 3. – С. 72-79.

9. Егорова, Д.О. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия / Д.О. Егорова, Е.С. Корсакова, В.А. Демаков, Е.Г. Плотникова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, №. 3. – С. 267-278.
10. Егорова, Д.О. Новые физиологические и молекулярно-биологические свойства бактерий-деструкторов (хлор) ароматических соединений / Д.О. Егорова // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2014. – №. 2. – С. 53-68.
11. Егорова, Д.О. Особенности разложения хлорированных бифенилов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления / Д.О. Егорова, М.Г. Первова, В.А. Демаков, Е.Г. Плотникова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, №. 3. – С. 253-263.
12. Егорова, Д.О. Применение природных штаммов-деструкторов в процессах разложения химических поллютантов / Д.О. Егорова, М.Г. Первова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15, №. 3-4. – С. 1287-1290.
13. Егорова, Д.О. Разложение смеси (три-гекса) хлорированных бифенилов штаммами рода *Rhodococcus* / Д.О. Егорова, В.А. Демаков, Е.Г. Плотникова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, №. 6. – С. 655-655.
14. Егорова, Д.О. Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоконверсии штаммом *Rhodococcus* sp. В7а / Д.О. Егорова, Е.С. Шумкова, В.А. Демаков, Е.Г. Плотникова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 644-650.
15. Коноплев, А.В. Мониторинг стойких органических загрязнителей в атмосферном воздухе как элемент выполнения Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях / А.В. Коноплев [и др.] // Хим. физика. – 2012. – Т. 31, № 10. – С. 38-45.
16. Корсакова, Е.С. Разнообразие генов деградации ароматических соединений в микробном сообществе района промышленных солеразработок

(Пермский край) / Е.С. Корсакова, А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. – 2017. – С. 477-478.

17. Лискова, М.Ю. Геоэкология при современном строительстве предприятий по добыче и обогащению калийно-магниевых солей / М.Ю. Лискова // Известия Тульского государственного университета. Науки о земле. – 2016. – №. 4. – С. 39-49.

18. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 390 с.

19. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта [и др.] – М.: Мир, 1983. – Т. 1-3.

20. Назаров, А.В. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами / А.В. Назаров [и др.] // Экология человека. – 2016. – №. 3. – С. 3-8.

21. Панов, А.В. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества / А.В. Панов [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82, №. 2. – С. 239-246.

22. Плотникова, Е.Г. Выделение и характеристика новых бактерий, разлагающих полихлорированные бифенилы / Е.Г. Плотникова [и др.] // Сборник тезисов IV Международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды». – Пермь. – 1998. – С. 160.

23. Плотникова, Е.Г. Особенности разложения 4-хлорбифенила и 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Rhodococcus ruber* P25 / Е.Г. Плотникова [и др.] // Микробиология. – 2012. – Т. 81, №. 2. – С. 159-159.

24. Плотникова, Е.Г. Цельноклеточные бактериальные биосенсоры для детекции ароматических углеводов и их хлорированных производных (обзор) / Е.Г. Плотникова, Е.С. Шумкова, М.С. Шумков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, №. 4. – С. 353-364.

25. Рыбкина, Д.О. Новый аэробный грамположительный микроорганизм с уникальными свойствами деструкции *орто*- и *пара*-хлорированных бифенилов / Д.О. Рыбкина [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72, №. 6. – С. 759-765.

26. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова // – Киев: Наук. думка, 1990. – 234 с.
27. Соляникова, И.П. Бактерии рода *Rhodococcus*-перспективные деструкторы устойчивых поллютантов для очистки сточных вод / И.П. Соляникова [и др.] // Вода: химия и экология. – 2010. – №. 4. – С. 18-26.
28. Шипова, А.С. Микробное сообщество шламаохранилища соледобывающего предприятия ОАО “Уралкалий” (г. Березники, Пермский край) / А.С. Шипова, Е.А. Шестакова // VIII Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов “Симбиоз-Россия-2015”. – Новосибирск. – 2015. – С. 227.
29. Шумкова, Е.С. Генетические и ферментные системы деструкции ароматических соединений бактерий порядка *Actinomycetales*: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Шумкова Екатерина Сергеевна. – Пермь, 2009. – 182 с.
30. Шумкова, Е.С. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий-деструкторов бифенила и идентификация генов α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы / Е.С. Шумкова [и др.] // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 1. – С. 63-71.
31. Шумкова, Е.С. Олигонуклеотидные праймеры для детекции генов, кодирующих большую субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, бактерий порядка *Actinomycetales* / Е.С. Шумкова, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2012. – №. 1. – С. 34-40.
32. Шумкова, Е.С. Полиморфизм генов *bphA* бактерий-деструкторов бифенила/хлорированных бифенилов / Е.С. Шумкова, Д.О. Егорова, С.В. Боронникова, Е.Г. Плотникова // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, №. 4. – С. 638-638.
33. Шумкова, Е.С. Разработка биосенсора для детекции бифенила/полихлорированных бифенилов (ПХБ) на основе *bph*-генов бактерий-деструкторов, выделенных из техногенных почв Западного Урала / Е.С. Шумкова [и др.] // Вестник Пермского научного центра. – 2017. – №. 3. – С. 99-104.

34. Щукова, И.В. Состав поверхностных вод на участке планируемого горно-химического производства на территории ВМКМС / И.В. Щукова, И.А. Крутик // Сергеевские чтения. – 2019. – С. 376-381.
35. Янкевич, М.И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра / М.И. Янкевич, В.В. Хадеева, В.П. Мурыгина // Биосфера. – 2015. – Т. 7, №. 2. – С. 199-208.
36. Abramowicz, D.A. Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment / D.A. Abramowicz // Environmental health perspectives. – 1995. – V. 103, №. 5. – P. 97-99.
37. Adams, C.I.M. Toxicological effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on freshwater turtles in the United States / C.I.M. Adams, J.E. Baker, B.V. Kjellerup // Chemosphere. – 2016. – V. 154. – P. 148-154.
38. Adebusoye, S.A. Growth on dichlorobiphenyls with chlorine substitution on each ring by bacteria isolated from contaminated African soils / S.A Adebusoye [et al.] // Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – V. 74, №. 2. – P. 484-492.
39. Adebusoye, S.A. Metabolism of chlorinated biphenyls: Use of 3,3'-and 3,5-dichlorobiphenyl as sole sources of carbon by natural species of *Ralstonia* and *Pseudomonas* / S.A. Adebusoye, M.O. Ilori, F.W. Picardal, O.O. Amund // Chemosphere. – 2008. – V. 70, №. 4. – P. 656-663.
40. Agulló, L. Genetics and biochemistry of biphenyl and PCB biodegradation / L. Agulló, D.H. Pieper, M. Seeger // Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. – 2019. – P. 595-622.
41. Ahmad, D. Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria / D. Ahmad, R. Massé, M. Sylvestre // Gene. – 1990. – V. 86, №. 1. – P. 53-61.
42. Ang, L.I. Isolation and characteristics of a novel biphenyl-degrading bacterial strain, *Dyella ginsengisoli* LA-4 / L.I. Ang, Q.U. Yuanyuan, Z.H.O.U. Jiti,

G.O.U. Min // Journal of Environmental Sciences. – 2009. – V. 21, №. 2. – P. 211-217.

43. Arensdorf, J.J. Formation of chlorocatechol *meta* cleavage products by a pseudomonad during metabolism of monochlorobiphenyls / J.J. Arensdorf, D.D. Focht // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60, №. 8. – P. 2884-2889.

44. Asturias, J.A. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6 / J.A. Asturias, K.N. Timmis // Journal of bacteriology. – 1993. – V. 175, №. 15. – P. 4631-4640.

45. Atago, Y. Identification of novel extracellular protein for PCB/biphenyl metabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1 / Y. Atago [et al.] // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2016. – V. 80, №. 5. – P. 1012-1019.

46. Barriault, D. Evolution of the biphenyl dioxygenase BphA from *Burkholderia xenovorans* LB400 by random mutagenesis of multiple sites in region III / D. Barriault, M. Sylvestre // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279, №. 46. – P. 47480-47488.

47. Bedard, D.L. A case study for microbial biodegradation: anaerobic bacterial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls-from sediment to defined medium / D.L. Bedard // Annu. Rev. Microbiol. – 2008. – V. 62. – P. 253-270.

48. Bedard, D.L. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850 / D.L. Bedard [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53, №. 5. – P. 1094-1102.

49. Bedard, D.L. Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains / D.L. Bedard, M.L. Haberl // Microbial ecology. – 1990. – V. 20, №. 1. – P. 87-102.

50. Beltrametti, F. Analysis of transcription of the bph locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter / F. Beltrametti, D. Reniero, S. Backhaus, B. Hofer, // Microbiology. – 2001. – V. 147, №. 8. – P. 2169-2182.

51. Berghuis, S.A. Prenatal exposure to PCBs and neurological and sexual/pubertal development from birth to adolescence / S.A. Berghuis, E. Roze // Current problems in pediatric and adolescent health care. – 2019. – V.49, № 6. – P. 133-159.

52. Bhowmik, S. The molecular basis for inhibition of BphD, a CC bond hydrolase involved in polychlorinated biphenyls degradation large 3-substituents prevent tautomerization / S. Bhowmik, G.P. Horsman, J.T. Bolin, L.D. Eltis // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – V. 282, №. 50. – P. 36377-36385.

53. Bienhold, C. The energy-diversity relationship of complex bacterial communities in Arctic deep-sea sediments / C. Bienhold, A. Boetius, A. Ramette // The ISME journal. – 2012. – V. 6, №. 4. – P. 724-732.

54. Brown, J.F. PCB transformations in upper Hudson sediments / J.F. Brown [et al.] // Northeastern Environmental Science. – 1984. – V. 3. – P. 166-178.

55. Cao, Y.M. Analysis of PCBs degradation abilities of biphenyl dioxygenase derived from *Enterobacter* sp. LY402 by molecular simulation / Y.M. Cao, L. Xu, L.Y. Jia // New biotechnology. – 2011. – V. 29, №. 1. – P. 90-98.

56. Cárcer, D.A. Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation / D.A. de Cárcer, M. Martín, U. Karlson, R. Rivilla // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, 19. – P. 6224-6232.

57. Carrizo, D. Distribution and inventories of polychlorinated biphenyls in the polar mixed layer of seven pan-arctic shelf seas and the interior basins / D. Carrizo, O. Gustafsson // Environmental science & technology. – 2011. – V. 45, №. 4. – P. 1420-1427.

58. Castle, D.M. Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary / D.M. Castle, M.T. Montgomery, D.L. Kirchman // FEMS microbiology ecology. – 2006. – V. 56, №. 1. – P. 55-63.

59. Catelani, D. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons used as reactor coolants / D. Catelani [et al.] // Experientia. – 1970. – V. 26. – P. 922-923.

60. Cébron, A. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples / A. Cébron, M.P. Norini, T. Beguiristain, C. Leyval // *Journal of Microbiological Methods*. – 2008. – V. 73, №. 2. – C. 148-159.
61. Cervantes-González, E. Microbial diversity assessment of polychlorinated biphenyl-contaminated soils and the biostimulation and bioaugmentation processes / E. Cervantes-González, M.A. Guevara-García, J. García-Mena, V.M. Ovando-Medina // *Environmental monitoring and assessment*. – 2019. – V. 191, №. 2. – doi: 10.1007/s10661-019-7227-4.
62. Chablain, P.A. Isolation of a soil psychrotrophic toluene-degrading *Pseudomonas* strain: influence of temperature on the growth characteristics on different substrates / P.A. Chablain [et al.] // *Research in microbiology*. – 1997. – V. 148, №. 2. – P. 153-161.
63. Chadhain, S.M.N. Identification, cloning, and characterization of a multicomponent biphenyl dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1 / S.M.N. Chadhain, E.M. Moritz, E. Kim, G.J. Zylstra // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. – 2007. – V. 34, №. 9. – P. 605-613.
64. Chae, J.C. Catabolic degradation of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas* sp. DJ-12 via consecutive reaction of *meta*-cleavage and hydrolytic dechlorination / J.C. Chae, E. Kim, S.H. Park, C.K. Kim // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2000. – V. 5, №. 6. – P. 449-455.
65. Chain, P.S.G. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility / P.S.G. Chain [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103, №. 42. – P. 15280-15287.
66. Chakraborty, J. Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11 / J. Chakraborty, S. Das // *Chemosphere*. – 2016. – V. 144. – P. 1706-1714.
67. Chakraborty, J. Thermophilic bacteria are potential sources of novel Rieske non-heme iron oxygenases / J. Chakraborty, C. Suzuki-Minakuchi, K. Okada, H. Nojiri // *AMB Express*. – 2017. – V. 7, №. 1. – doi: 10.1186/s13568-016-0318-5.

68. Chang, Y.C. Isolation of biphenyl and polychlorinated biphenyl-degrading bacteria and their degradation pathway / Y.C. Chang [et al.] // Applied biochemistry and biotechnology. – 2013. – V. 170, №. 2. – P. 381-398.
69. Chang, Y.C. Whole-genome sequence of *Aquamicrobium* sp. strain SK-2, a polychlorinated biphenyl-utilizing bacterium isolated from sewage sludge / Y.C. Chang [et al.] // Genome Announc. – 2015. – V. 3, №. 3. – doi: 10.1128/genomeA.00439-15.
70. Chávez, F.P. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls / F.P. Chávez, F. Gordillo, C.A. Jerez // Biotechnology advances. – 2006. – V. 24, №. 3. – P. 309-320.
71. Chen, K. Comparative transcriptome analysis reveals the mechanism underlying 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoate catabolism via a new oxidative decarboxylation pathway / K. Chen [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2018. – V. 84, №. 6. – doi: 10.1128/AEM.02467-17.
72. Chobtang, J. The need and potential of biosensors to detect dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls along the milk, eggs and meat food chain / J. Chobtang [et al.] // Sensors. – 2011. – V. 11, №. 12. – P. 11692-11716.
73. Chung, S.Y. A Gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* strain TA421, isolated from a termite ecosystem / S.Y. Chung [et al.] // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 1994. – V. 58, №. 11. – P. 2111-2113.
74. Colbert, C.L. A cluster exposed: structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins / C.L. Colbert, M.M.J. Couture, L.D. Eltis, J.T. Bolin // Structure. – 2000. – V. 8, №. 12. – P. 1267-1278.
75. Colbert, C.L. Structural characterization of *Pandoraea pnomenus* B-356 biphenyl dioxygenase reveals features of potent polychlorinated biphenyl-degrading enzymes / C.L. Colbert [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8, №. 1. – doi: 10.1371/journal.pone.0052550.

76. Corkery, D.M. Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of ethylbenzene dioxygenase gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CA-4 / D.M. Corkery, A.D. Dobson // FEMS microbiology letters. – 1998. – V. 166, №. 2. – P. 171-176.
77. Dabrock, B. Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism / B. Dabrock, M. Kessler, B. Averhoff, G. Gottschalk // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60, №. 3. – P. 853-860.
78. Daligault, H.E. Whole-genome assemblies of 56 *Burkholderia* species / H.E. Daligault [et al.] // Genome Announc. – 2014. – V. 2, №. 6. – doi: 10.1128/genomea.01106-14.
79. De, J. Aerobic degradation of highly chlorinated polychlorobiphenyls by a marine bacterium, *Pseudomonas* CH07 / J. De, N. Ramaiah, A. Sarkar // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 22, №. 12. – P. 1321-1327.
80. Dhindwal, S. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase / S. Dhindwal [et al.] // Journal of bacteriology. – 2016. – V. 198, №. 10. – P. 1499-1512.
81. Dong, L. A water-assisted nucleophilic mechanism utilized by BphD, the meta-cleavage product hydrolase in biphenyl degradation / L. Dong, S. Zhang, Y. Liu // Journal of Molecular Graphics and Modelling. – 2017. – V. 76. – P. 448-455.
82. Duarte, M. Functional soil metagenomics: elucidation of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation potential following 12 years of in situ bioremediation / M. Duarte [et al.] // Environmental microbiology. – 2017. – V. 19, №. 8. – P. 2992-3011.
83. Dudasova, H. Removal of polychlorinated biphenyl congeners in mixture Delor 103 from wastewater by ozonation vs/and biological method / H. Dudasova [et al.] // Journal of hazardous materials. – 2017. – V. 321. – P. 54-61.
84. Eaton, R.W. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204 / R.W. Eaton, K.N. Timmis // Journal of bacteriology. – 1986. – V. 168, №. 1. – P. 123-131.

85. Egorova, D.O. Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains / D.O. Egorova, V.A. Demakov, E.G. Plotnikova // *Journal of hazardous materials*. – 2013. – V. 261. – P. 378-386.
86. Egorova, D.O. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628 / D.O. Egorova [et al.] // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2017. – V. 228, №. 5. – doi: 10.1007/s11270-017-3344-2.
87. Elangovan, S. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Fate, Challenges and Bioremediation / S. Elangovan, S.B.S. Pandian, S.J. Geetha, S.J. Joshi // *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds*. – 2019. – P. 165-188.
88. Erickson, B.D. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene / B.D. Erickson, F.J. Mondello // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, № 11. – P. 3858-3862.
89. Fagervold, S.K. Effects of bioaugmentation on indigenous PCB dechlorinating activity in sediment microcosms / S.K. Fagervold, J.E. Watts, H.D. May, K.R. Sowers // *Water research*. – 2011. – V. 45, №. 13. – P. 3899-3907.
90. Feliciano, J. ClcR-based biosensing system in the detection of cis-dihydroxylated (chloro-) biphenyls / J. Feliciano [et al.] // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2006. – V. 385, №. 5. – P. 807-813.
91. Feris, K.P. A shallow BTEX and MTBE contaminated aquifer supports a diverse microbial community / K.P. Feris [et al.] // *Microbial ecology*. – 2004. – V. 48, №. 4. – P. 589-600.
92. Ferraro, D.J. Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1 / D.J. Ferraro [et al.] // *BMC structural biology*. – 2007. – V. 7, №. 1. – doi: 10.1186/1472-6807-7-10.
93. Field, J.A. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls / J.A. Field, R. Sierra-Alvarez // *Environmental Pollution*. – 2008. – V. 155, №. 1. – doi: 10.1016/j.envpol.2007.10.016.

94. Fierer, N. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays / N. Fierer, J.A. Jackson, R. Vilgalys, R.B. Jackson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, №. 7. – C. 4117-4120.
95. Fujihara, H. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC 110665), a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil / H. Fujihara [et al.] // *Genome Announc.* – 2015. – V. 3, №. 3. – doi: 10.1128/genomeA.00517-15.
96. Fukuda, K. Complete genome sequence of polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 (NBRC 109938) / K. Fukuda [et al.] // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2, №. 5. – doi: 10.1128/genomeA.00865-14.
97. Furukawa, K. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) / K. Furukawa // *The Journal of general and applied microbiology.* – 2000. – V. 46, №. 6. – P. 283-296.
98. Furukawa, K. Biphenyl dioxygenases: functional versatilities and directed evolution / K. Furukawa, H. Suenaga, M. Goto // *Journal of bacteriology.* – 2004. – V. 186, №. 16. – P. 5189-5196.
99. Furukawa, K. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features / K. Furukawa, H. Fujihara // *Journal of bioscience and bioengineering.* – 2008. – V. 105, №. 5. – P. 433-449.
100. Furukawa, K. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved bph operon / K. Furukawa, N. Hayase, K. Taira, N. Tomizuka // *Journal of bacteriology.* – 1989. – V. 171, №. 10. – P. 5467-5472.
101. Furusawa, Y. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / Y. Furusawa [et al.] // *Journal of molecular biology.* – 2004. – V. 342, №. 3. – P. 1041-1052.
102. Gallego, S. Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium / S. Gallego [et al.] // *Biodegradation.* – 2014. – V. 25, №. 4. – P. 543-556.

103. Garrido-Sanz, D. Metagenomic analysis of a biphenyl-degrading soil bacterial consortium reveals the metabolic roles of specific populations / D. Garrido-Sanz [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – V. 9. – doi: 10.3389/fmicb.2018.00232.
104. Gibson, D.T. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology / D.T. Gibson, D.T. Parales // *Current opinion in biotechnology*. – 2000. – V. 11, №. 3. – P. 236-243.
105. Gioia, R. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in Africa: a review of environmental levels / R. Gioia [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – V. 21, №. 10. – P. 6278-6289.
106. Gómez-Gil, L. Characterization of biphenyl dioxygenase of *Pandoraea pnomenusa* B-356 as a potent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme / L. Gómez-Gil [et al.] // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189, №. 15. – P. 5705-5715.
107. Gonçalves, E.R. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E.R. Gonçalves [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72, №. 9. – P. 6183-6193.
108. Gordillo, F. Motility and chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 towards polychlorobiphenyls and chlorobenzoates / F. Gordillo, F.P. Chávez, C.A. Jerez // *FEMS microbiology ecology*. – 2007. – V. 60, №. 2. – P. 322-328.
109. Goris, J. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400^T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov / J. Goris [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2004. – V. 54, №. 5. – P. 1677-1681.
110. Gou, M. Isolation, characterization and docking studies of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from an activated sludge metagenome / M. Gou [et al.] // *Biotechnology letters*. – 2012. – V. 34, №. 1. – P. 117-123.
111. Guzzella, L. POP and PAH contamination in the southern slopes of Mt. Everest (Himalaya, Nepal): long-range atmospheric transport, glacier shrinkage, or local

impact of tourism? / L. Guzzella [et al.] // Science of the total environment. – 2016. – V. 544. – P. 382-390.

112. Haddock, J.D. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 / J.D. Haddock, D.T. Gibson // Journal of bacteriology. – 1995. – V. 177, №. 20. – P. 5834-5839.

113. Hashmi, M.Z. PCBs attenuation and abundance of *Dehalococcoides* spp., *bphC*, *CheA*, and *flic* genes in typical polychlorinated biphenyl-polluted soil under floody and dry soil conditions / M.Z. Hashmi [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – V. 23, №. 4. – P. 3907-3913.

114. Hatamian-Zarmi, A. Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 isolated from contaminated soils / A. Hatamian-Zarmi [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – V. 63, №. 6. – P. 788-794.

115. Hinnebusch, J. Cloning and sequence analysis of linear plasmid telomeres of the bacterium *Borrelia burgdorferi* / J. Hinnebusch, S. Bergstrom, A.G. Barbour // Molecular microbiology. – 1990. – V. 4, №. 5. – P. 811-820.

116. Hirose, J. Biphenyl/PCB degrading *bph* genes of ten bacterial strains isolated from biphenyl-contaminated soil in Kitakyushu, Japan: comparative and dynamic features as integrative conjugative elements (ICEs) / J. Hirose [et al.] // Genes. – 2019. – V. 10, №. 5. – doi: 10.3390/genes10050404.

117. Hirose, J. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Comamonas testosteroni* KF712 (NBRC 110673) / J. Hirose [et al.] // Genome Announc. – 2015. – V. 3, №. 5. – doi: 10.1128/genomeA.01214-15.

118. Hong, Q. Isolation of a biphenyl-degrading bacterium, *Achromobacter* sp. BP3, and cloning of the *bph* gene cluster / Q. Hong [et al.] // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2009. – V. 63, №. 4. – P. 365-370.

119. Hoostal, M.J. Spatial patterns of *bphA* gene diversity reveal local adaptation of microbial communities to PCB and PAH contaminants / M.J. Hoostal, J.L. Bouzat // Microbial ecology. – 2016. – V. 72, №. 3. – P. 559-570.

120. Horváthová, H. Bioremediation vs. Nanoremediation: Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBS) using integrated remediation approaches / H. Horváthová, K. Lászlóvá, K. Dercová // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2019. – V. 230, №. 8. – doi: 10.1007/s11270-019-4259-x.
121. Hou, L.H. Phylogenetic characterization of several para-and meta-PCB dechlorinating *Clostridium* species: 16s rDNA sequence analyses / L.H. Hou, S.K. Dutta // *Letters in applied microbiology*. – 2000. – V. 30, №. 3. – P. 238-243.
122. Hu, J. Effects of RAMEB and/or mechanical mixing on the bioavailability and biodegradation of PCBs in soil/slurry / J. Hu [et al.] // *Chemosphere*. – 2016. – V. 155. – P. 479-487.
123. Hu, J. *Sphingobium fuliginis* HC3: a novel and robust isolated biphenyl-and polychlorinated biphenyls-degrading bacterium without dead-end intermediates accumulation / J. Hu [et al.] // *PloS one*. – 2015. – V. 10, №. 4. – doi: 10.1371/journal.pone.0122740.
124. Ilori, M.O. Catabolic plasmid specifying polychlorinated biphenyl degradation in *Cupriavidus* sp. strain SK-4: Mobilization and expression in a pseudomonad / M.O. Ilori [et al.] // *Journal of basic microbiology*. – 2015. – V. 55, №. 3. – P. 338-345.
125. Ilori, M.O. Degradation and mineralization of 2-chloro-, 3-chloro-and 4-chlorobiphenyl by a newly characterized natural bacterial strain isolated from an electrical transformer fluid-contaminated soil / M.O. Ilori, G.K. Robinson, S.A. Adebusoye // *Journal of Environmental Sciences*. – 2008. – V. 20, №. 10. – P. 1250-1257.
126. Iwai, S. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment / S. Iwai [et al.] // *The ISME journal*. – 2010. – V. 4, №. 2. – P. 279-285.
127. Jakoncic, J. The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1 / J. Jakoncic, Y. Jouanneau, C. Meyer, V. Stojanoff // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – V. 352, №. 4. – P. 861-866.

128. Jia, L.Y. Isolation and characterization of comprehensive polychlorinated biphenyl degrading bacterium, *Enterobacter* sp. LY402 / L.Y. Jia [et al.] // J Microbiol Biotechnol. – 2008. – V. 18, №. 5. – P. 952-957.
129. Jiang, L. Biphenyl-metabolizing microbial community and a functional operon revealed in e-waste-contaminated soil / L. Jiang [et al.] // Environmental science & technology. – 2018. – V. 52, №. 15. – P. 8558-8567.
130. Johny, T.K. PCR in Metagenomics / T.K. Johny, S.G. Bhat // PCR. – Springer, New York, NY. – 2017. – P. 249-265.
131. Jurelevicius, D. Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases (PAH-RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula / D. Jurelevicius [et al.] // Applied Soil Ecology. – 2012. – V. 55. – P. 1-9.
132. Kahl, S. A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase activities / S. Kahl, B. Hofer // Microbiology. – 2003. – V. 149, №. 6. – P. 1475-1481.
133. Kampfer, P. *Actinobacteria* / P. Kampfer // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – 2010. – P. 1821-1831.
134. Kaya, D. A comparative evaluation of anaerobic dechlorination of PCB-118 and Aroclor 1254 in sediment microcosms from three PCB-impacted environments / D. Kaya, I. Imamoglu, F.D. Sanin, K.R. Sowers // Journal of hazardous materials. – 2018. – V. 341. – P. 328-335.
135. Kessler, M. Studies on the isopropylbenzene 2, 3-dioxygenase and the 3-isopropylcatechol 2,3-dioxygenase genes encoded by the linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2 / M. Kessler, E.R. Dabbs, B. Averhoff, G. Gottschalk // Microbiology. – 1996. – V. 142, №. 11. – P. 3241-3251.
136. Kikuchi, Y. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102 / Y. Kikuchi [et al.] // Journal of bacteriology. – 1994. – V. 176, №. 14. – P. 4269-4276.

137. Kim, D. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways / D. Kim [et al.] // Journal of microbiology and biotechnology. – 2018. – V. 28, №. 7. – P. 1037-1051.
138. Kim, S. A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates / S. Kim, F.W. Picardal // FEMS Microbiology Letters. – 2000. – V. 185, №. 2. – P. 225-229.
139. Kim, S. Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source / S. Kim, F.W. Picardal // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67, №. 4. – P. 1953-1955.
140. Kimura, N. *Pseudomonas furukawaii* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil in Japan / N. Kimura [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2018. – V. 68, №. 5. – P. 1429-1435.
141. Kong, C. Genome sequence of *Dyella ginsengisoli* strain LA-4, an efficient degrader of aromatic compounds / C. Kong [et al.] // Genome Announc. – 2013. – V. 1, №. 6. – doi: :10.1128/genomeA.00961-13.
142. Kosono, S. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation / S. Kosono [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, №. 8. – P. 3282-3285.
143. Koubek, J. Diversity of chlorobiphenyl-metabolizing bacteria and their biphenyl dioxygenases in contaminated sediment / J. Koubek, M. Mackova, T. Macek, O. Uhlik // Chemosphere. – 2013. – V. 93, №. 8. – P. 1548-1555.
144. Kour, D. Gene manipulation and regulation of catabolic genes for biodegradation of biphenyl compounds / D. Kour [et al.] // In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. – 2019. – P. 1-23.
145. Kranzioch, I. Dechlorination and organohalide-respiring bacteria dynamics in sediment samples of the Yangtze Three Gorges Reservoir / I. Kranzioch [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2013. – V. 20, №. 10. – P. 7046-7056.

146. Krumins, V. PCB dechlorination enhancement in Anacostia River sediment microcosms / V. Krumins [*et al.*] // *Water research*. – 2009. – V. 43, №. 18. – P. 4549-4558.
147. Kumar, P. Structural insight into the expanded PCB-degrading abilities of a biphenyl dioxygenase obtained by directed evolution / P. Kumar [*et al.*] // *Journal of molecular biology*. – 2011. – V. 405, №. 2. – P. 531-547.
148. Labbe, D. Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5 / D. Labbe, J. Garnon, P.C. Lau // *Journal of bacteriology*. – 1997. – V. 179, №. 8. – P. 2772-2776.
149. Lambo, A.J. Cometabolic degradation of polychlorinated biphenyls at low temperature by psychrotolerant bacterium *Hydrogenophaga* sp. IA3-A / A.J. Lambo, T.R. Patel // *Current microbiology*. – 2006. – V. 53, №. 1. – P. 48-52.
150. Lauby-Secretan, B. Use of mechanistic data in the IARC evaluations of the carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and related compounds / B. Lauby-Secretan [*et al.*] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – V. 23, №. 3. – P. 2220-2229.
151. Layton, A.C. Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls / A.C. Layton, M. Muccini, M.M. Ghosh, G.S. Sayler1 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, №. 12. – P. 5023-5026.
152. Li, A. Enzyme-substrate interaction and characterization of a 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from *Dyella ginsengisoli* LA-4 / A. Li, Y. Qu, J. Zhou, F. Ma // *FEMS microbiology letters*. – 2009a. – V. 292, №. 2. – P. 231-239.
153. Li, Q. New metabolites in dibenzofuran cometabolic degradation by a biphenyl-cultivated *Pseudomonas putida* strain B6-2 / Q. Li [*et al.*] // *Environmental science & technology*. – 2009b. – V. 43, №. 22. – P. 8635-8642.
154. Liang, Y. Potential for polychlorinated biphenyl biodegradation in sediments from Indiana Harbor and Ship Canal / Y. Liang, A. Martinez, K.C. Hornbuckle, T.E. Mattes // *International biodeterioration & biodegradation*. – 2014. – V. 89. – P. 50-57.

155. Liu, X. Genetically modified *Pseudomonas* biosensing biodegraders to detect PCB and chlorobenzoate bioavailability and biodegradation in contaminated soils / X. Liu, K.J. Germaine, D. Ryan, D.N. Dowling // Bioengineered bugs. – 2010b. – V. 1, №. 3. – P. 198-206.
156. Liu, X. Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls / X. Liu, K.J. Germaine, D. Ryan, D.N. Dowling // Sensors. – 2010a. – V. 10, №. 2. – P. 1377-1398.
157. Lunt, D. The microbial metabolism of biphenyl / D. Lunt, W.C. Evans // Biochem. J. – 1970. – V. 118. – P. 54-55.
158. Luo, W. Organic carbon effects on aerobic polychlorinated biphenyl removal and bacterial community composition in soils and sediments / W. Luo, E.M. D'Angelo, M.S. Coyne // Chemosphere. – 2008. – V. 70, №. 3. – P. 364-373.
159. Luz, A.P. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil / A.P. Luz, V.H. Pellizari, L.G. Whyte, C.W. Greer // Canadian journal of microbiology. – 2004. – V. 50, №. 5. – P. 323-333.
160. Macedo, A.J. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination / A.J. Macedo, K.N. Timmis, W.R. Abraham // Environmental microbiology. – 2007. – V. 9, №. 8. – P. 1890-1897.
161. Maltseva, O.V. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria / O.V. Maltseva [et al.] // Biodegradation. – 1999. – V. 10, №. 5. – P. 363-371.
162. Masai, E. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E. Masai [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, №. 6. – P. 2079-2085.
163. Master, E.R. Sequential anaerobic – aerobic treatment of soil contaminated with weathered Aroclor 1260 / E.R. Master [et al.] // Environmental science & technology. – 2002. – V. 36, №. 1. – P. 100-103.

164. Mauger, J.F. Polychlorinated biphenyl 126 exposure in L6 myotubes alters glucose metabolism: a pilot study / J.F. Mauger [*et al.*] // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – V. 23, №. 8. – P. 8133-8140.

165. McLeod, M.P. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse / M.P. McLeod [*et al.*] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103, №. 42. – P. 15582-15587.

166. Michaud, L. Biodegradative potential and characterization of psychrotolerant polychlorinated biphenyl-degrading marine bacteria isolated from a coastal station in the Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica) / L. Michaud, G. Di Marco, V. Bruni, A.L. Giudice // Marine pollution bulletin. – 2007. – V. 54, №. 11. – P. 1754-1761.

167. Mishra, V. Engineering bacterial aromatic dioxygenase genes to improve bioremediation / V. Mishra, S. Veeranna, J. Kumar // Bioremediation of Pollutants. – 2020. – P. 161-185.

168. Mondello, F.J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation / F.J. Mondello // Journal of bacteriology. – 1989. – V. 171, №. 3. – P. 1725-1732.

169. Moody, J. Degradation of biphenyl by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 / J. Moody, D. Doerge, J. Freeman, C. Cerniglia // Applied microbiology and biotechnology. – 2002. – V. 58, №. 3. – P. 364-369.

170. Mouz, S. A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon *Tn4371* / S. Mouz, C. Merlin, D. Springael, A. Toussaint // Molecular and General Genetics MGG. – 1999. – V. 262, №. 4-5. – P. 790-799.

171. Mukerjee-Dhar, G. *bph* Genes of the thermophilic PCB degrader, *Bacillus* sp. JF8: characterization of the divergent ring-hydroxylating dioxygenase and hydrolase genes upstream of the Mn-dependent BphC / G. Mukerjee-Dhar [*et al.*] // Microbiology. – 2005. – V. 151, №. 12. – P. 4139-4151.

172. Müller, M.H.B. Organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in human breast milk and associated health risks to nursing infants in

Northern Tanzania / M.H.B. Müller [*et al.*] // Environmental research. – 2017. – V. 154. – P. 425-434.

173. Murugan, K. Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation / K. Murugan, N. Vasudevan // Ecotoxicology and environmental safety. – 2018. – V.157. – P.40-60.

174. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E.C. De Waal, A.G. Uitterlinden // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59, №. 3. – P. 695-700.

175. Na, K. Development of a genetic transformation system for benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains / K. Na [*et al.*] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2005. – V. 99, №. 4. – P. 408-414.

176. Nam, I.H. Biodegradation of biphenyl and 2-chlorobiphenyl by a *Pseudomonas* sp. KM-04 isolated from PCBs-contaminated coal mine soil / I.H. Nam, C.M. Chon, K.Y. Jung, J.G. Kim // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2014. – V. 93, №. 1. – P. 89-94.

177. Niepceron, M. Low impact of phenanthrene dissipation on the bacterial community in grassland soil / M. Niepceron [*et al.*] // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – V. 21, №. 4. – P. 2977-2987.

178. Ohtsubo, Y. *BphS*, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 / Y. Ohtsubo [*et al.*] // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276, №. 39 – P. 36146-36154.

179. Ohtsubo, Y. Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. strain KKS102, a polychlorinated-biphenyl degrader / Y. Ohtsubo [*et al.*] // Journal of bacteriology. – 2012b. – V. 194, №. 24. – P. 6970-6971.

180. Ohtsubo, Y. Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. strain KKS102, which are located on an integrative and conjugative element / Y. Ohtsubo [*et al.*] // Journal of bacteriology. – 2012a. – V. 194, №. 16. – P. 4237-4248.

181. Ohtsubo, Y. Novel approach to the improvement of biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation activity: promoter implantation by homologous recombination / Y. Ohtsubo [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, №. 1. – P. 146-153.

182. Ohtsubo, Y. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls / Y. Ohtsubo, T. Kudo, M. Tsuda, Y. Nagata // Applied microbiology and biotechnology. – 2004. – V. 65, №. 3. – P. 250-258.

183. Papale, M. Enrichment, isolation and biodegradation potential of psychrotolerant polychlorinated-biphenyl degrading bacteria from the Kongsfjorden (Svalbard Islands, High Arctic Norway) / M. Papale [et al.] // Marine pollution bulletin. – 2017. – V. 114, №. 2. – P. 849-859.

184. Park, S.H. Construction of transformant reporters carrying fused genes using pcbC promoter of *Pseudomonas* sp. DJ-12 for detection of aromatic pollutants / S.H. Park, K. Lee, J.C. Chae, C.K. Kim // Environmental monitoring and assessment. – 2004. – V. 92, №. 1-3. – P. 241-251.

185. Park, W.H. Relationships between serum-induced AhR bioactivity or mitochondrial inhibition and circulating polychlorinated biphenyls (PCBs) / W.H. Park [et al.] // Scientific reports. – 2017. – V. 7, №. 1. – P. 1-10.

186. Passatore, L. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives / L. Passatore, S. Rossetti, A.A. Juwarkar, A. Massacci // Journal of hazardous materials. – 2014. – V. 278. – P. 189-202.

187. Pathiraja, G. Effective degradation of polychlorinated biphenyls by a facultative anaerobic bacterial consortium using alternating anaerobic aerobic treatments / G. Pathiraja, P. Egodawatta, A. Goonetilleke, V.S.J. Te'o // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 659. – P. 507-514.

188. Payne, R.B. Remediation of polychlorinated biphenyl impacted sediment by concurrent bioaugmentation with anaerobic halo-respiring and aerobic degrading bacteria / R.B. Payne, S.K. Fagervold, H.D. May, K.R. Sowers // Environmental science & technology. – 2013. – V. 47, №. 8. – P. 3807-3815.

189. Petrić, I. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation / I. Petrić [et al.] // Journal of soils and sediments. – 2011. – V. 11, №. 2. – P. 290-300.
190. Pflugmacher, U. Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation / U. Pflugmacher, B. Averhoff, G. Gottschalk // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62, №. 11. – P. 3967-3977.
191. Pieper, D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls / D.H. Pieper // Applied microbiology and biotechnology. – 2005. – V. 67, №. 2. – P. 170-191.
192. Pieper, D.H. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls / D.H. Pieper, M. Seeger // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2008. – V. 15, 2-3. – P. 121-138.
193. Ponce, B.L. Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400 / B.L. Ponce, V.K. Latorre, M. González, M. Seeger // Enzyme and microbial technology. – 2011. – V. 49, №. 6-7. – P. 509-516.
194. Pukall, R. Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577 T) / R. Pukall [et al.] // Standards in genomic sciences. – 2010. – V. 2, №. 2. – P. 212-219.
195. Quero, G.M. Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) / G.M. Quero [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6. – doi: 10.3389/fmicb.2015.01053.
196. Rein, A. Degradation of PCB congeners by bacterial strains / A. Rein [et al.] // Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – V. 77, №. 2. – P. 469-481.
197. Ridl, J. Complete genome sequence of *Pseudomonas alcaliphila* JAB1 (= DSM 26533), a versatile degrader of organic pollutants / J Ridl [et al.] // Standards in genomic sciences. – 2018. – V. 13, №. 1. – doi: 10.1186/s40793-017-0306-7.

198. Saavedra, J.M. Mineralization of PCBs by the genetically modified strain *Cupriavidus necator* JMS34 and its application for bioremediation of PCBs in soil / J.M. Saavedra, F. Acevedo, M. González, M. Seeger // Applied microbiology and biotechnology. – 2010. – V. 87, №. 4. – P. 1543-1554.
199. Sakai, M. Isolation and characterization of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. KBC101 / M. Sakai, S. Ezaki, N. Suzuki, R. Kurane // Applied microbiology and biotechnology. – 2005. – V. 68, №. 1. – P. 111-116.
200. Sakai, M. 2-Hydroxypenta-2, 4-dienoate metabolic pathway genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / M. Sakai [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, №. 1. – P. 427-433.
201. Sandri, F. Biphenyl modulates the expression and function of respiratory oxidases in the polychlorinated-biphenyls degrader *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 / F. Sandri [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2017. – V. 8. – doi: 10.3389/fmicb.2017.01223.
202. Schlömann, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways / M. Schlömann // Biodegradation. – 1994. – V. 5, №. 3-4. – P. 301-321.
203. Serdar, B. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: a cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data / B. Serdar, W.G. LeBlanc, J.M. Norris, L.M. Dickinson // Environmental Health. – 2014. – V. 13, №. 1. – doi: 10.1186/1476-069x-13-114.
204. Seto, M. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / M. Seto [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, №. 9. – P. 3353-3358.
205. Sharma, J.K. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils / J.K. Sharma [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – V. 25. – P. 16355-16375.
206. Shimizu, S. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / S. Shimizu,

H. Kobayashi, E. Masai, M. Fukuda // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67, №. 5. – P. 2021-2028.

207. Shimura, M. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene / M. Shimura [et al.] // *FEMS microbiology letters.* – 1999. – V. 178, №. 1. – P. 87-93.

208. Shintani, M. Complete genome sequence of the thermophilic polychlorinated biphenyl degrader *Geobacillus* sp. strain JF8 (NBRC 109937) / M. Shintani [et al.] // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2, №. 1. – doi: 10.1128/genomeA.01213-13.

209. Shuai, J. Regional analysis of potential polychlorinated biphenyl degrading bacterial strains from China / J. Shuai [et al.] // *Brazilian journal of microbiology.* – 2016. – V. 47, №. 3. – P. 536-541.

210. Shumkova, E.S. Draft genome sequence of *Rhodococcus ruber* strain P25, an active polychlorinated biphenyl degrader / E.S. Shumkova, B.E. Olsson, A.V. Kudryavtseva, E.G. Plotnikova // *Genome Announc.* – 2015. – V. 3, №. 5. – doi: 10.1128/genomeA.00990-15.

211. Sierra, I. Study of the biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a new isolated aerobic bacterium (*Janibacter* sp.) / I. Sierra, J.L. Valera, M.L. Marina, F. Laborda // *Chemosphere.* – 2003. – V. 53, №. 6. – P. 609-618.

212. Singer, A.C. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria / A.C. Singer, E.S. Gilbert, E. Luepromchai, D.E. Crowley // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2000. – V. 54, №. 6. – P. 838-843.

213. Somaraja, P.K. Molecular characterization of 2-chlorobiphenyl degrading *Stenotrophomonas maltophilia* GS-103 / P.K. Somaraja, D. Gayathri, N. Ramaiah // *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* – 2013. – V. 91, №. 2. – P. 148-153.

214. Sondossi, M. Metabolism of 2,2'-and 3,3'-dihydroxybiphenyl by the biphenyl catabolic pathway of *Comamonas testosteroni* B-356 / M. Sondossi,

D. Barriault, M. Sylvestre // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70, №. 1. – P. 174-181.

215. Sowers, K.R. *In situ* treatment of PCBs by anaerobic microbial dechlorination in aquatic sediment: are we there yet? / K.R. Sowers, H.D. May // *Current opinion in biotechnology.* – 2013. – V. 24, №. 3. – P. 482-488.

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

217. Springael, D. Occurrence of *Tn4371*-related mobile elements and sequences in (chloro) biphenyl-degrading bacteria / D. Springael [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67, №. 1. – P. 42-50.

218. Standfuß-Gabisch, C. Characterization of biphenyl dioxygenase sequences and activities encoded by the metagenomes of highly polychlorobiphenyl-contaminated soils / C. Standfuß-Gabisch, D. Al-Halbouni, B. Hofer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78, №. 8. – P. 2706-2715.

219. Su, X. *Rhodococcus biphenylivorans* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium / X. Su [*et al.*] // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2015. – V. 107, №. 1. – P. 55-63.

220. Suenaga, H. Active-site engineering of biphenyl dioxygenase: effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity / H. Suenaga, M. Goto, K. Furukawa // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2006. – V. 71, №. 2. – P. 168-176.

221. Suenaga, H. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Cupriavidus basilensis* KF708 (NBRC 110671) isolated from biphenyl-contaminated soil / H. Suenaga [*et al.*] // *Genome Announc.* – 2015. – V. 3, №. 2. – doi: 10.1128/genomeA.00143-15.

222. Suenaga, H. Insights into the genomic plasticity of *Pseudomonas putida* KF715, a strain with unique biphenyl-utilizing activity and genome instability

properties / H Suenaga [et al.] // Environmental microbiology reports. – 2017. – V. 9, №. 5. – P. 589-598.

223. Sul, W.J. DNA-stable isotope probing integrated with metagenomics for retrieval of biphenyl dioxygenase genes from polychlorinated biphenyl-contaminated river sediment / W.J. Sul [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, №. 17. – P. 5501-5506.

224. Sylvestre, M. Prospects for using combined engineered bacterial enzymes and plant systems to rhizoremediate polychlorinated biphenyls / M. Sylvestre // Environmental microbiology. – 2013. – V. 15, №. 3. – P. 907-915.

225. Sylvestre, M. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases / M. Sylvestre [et al.] // Gene. – 1996. – V. 174, №. 2. – P. 195-202.

226. Taguchi, K. Polychlorinated biphenyl/biphenyl degrading gene clusters in *Rhodococcus* sp. K37, HA99, and TA431 are different from well-known *bph* gene clusters of Rhodococci / K. Taguchi, M. Motoyama, T. Iida, T. Kudo // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2007. – V. 71, №. 5. – P. 1136-1144.

227. Takeda, H. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1 / H. Takeda [et al.] // Journal of bacteriology. – 2010. – V. 192, №. 18. – P. 4741-4751.

228. Teng, Y. Isolation of the PCB-degrading bacteria *Mesorhizobium* sp. ZY1 and its combined remediation with *Astragalus sinicus* L. for contaminated soil / Y. Teng [et al.] // International journal of phytoremediation. – 2016. – V. 18, №. 2. – P. 141-149.

229. Terzaghi, E. Rhizoremediation of weathered PCBs in a heavily contaminated agricultural soil: Results of a biostimulation trial in semi field conditions / E. Terzaghi [et al.] // Science of the total environment. – 2019. – V. 686. – P. 484-496.

230. Triscari-Barberi, T. Genome sequence of the polychlorinated-biphenyl degrader *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 / T. Triscari-Barberi [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2012. – V.194, №. 16. – P. 4426-4427.

231. Turner, K. Hydroxylated polychlorinated biphenyl detection based on a genetically engineered bioluminescent whole-cell sensing system / K. Turner [et al.] // Analytical chemistry. – 2007. – V. 79, №. 15. – P. 5740-5745.

232. Uhlik, O. Biphenyl-metabolizing bacteria in the rhizosphere of horseradish and bulk soil contaminated by polychlorinated biphenyls as revealed by stable isotope probing / O. Uhlik [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, №. 20. – P. 6471-6477.

233. Vergani, L. Novel PCB-degrading *Rhodococcus* strains able to promote plant growth for assisted rhizoremediation of historically polluted soils / L. Vergani [et al.] // PloS one. – 2019. – V. 14, №. 8. – doi: 10.1371/journal.pone.0221253.

234. Vergani, L. Phyto-rhizoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions / L. Vergani [et al.] // Science of the Total Environment. – 2017. – V. 575. – P. 1395-1406.

235. Versalovic, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic [et al.] // Methods in molecular and cellular biology. – 1994. – V. 5, №. 1. – P. 25-40.

236. Vézina, J. Diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase large subunit / J. Vézina, D. Barriault, M. Sylvestre // Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2008. – V. 15, №. 2-3. – P. 139-151.

237. Vézina, J. Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase / J. Vézina, D. Barriault, M. Sylvestre // Journal of bacteriology. – 2007. – V. 189, №. 3. – P. 779-788.

238. Viger, J.F. Metabolism of chlorobiphenyls by a variant biphenyl dioxygenase exhibiting enhanced activity toward dibenzofuran / J.F. Viger, M. Mohammadi, D. Barriault, M. Sylvestre // Biochemical and biophysical research communications. – 2012. – V. 419, №. 2. – P. 362-367.

239. Vilo, C. Draft genome sequence of *Cupriavidus* sp. strain SK-4, a di-ortho-substituted biphenyl-utilizing bacterium isolated from polychlorinated biphenyl-contaminated sludge / C. Vilo, M.J. Benedik, M. Ilori, Q Dong // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2, №. 3. – doi: 10.1128/genomeA.00474-14.
240. Vinas, M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil / M. Vinas, J. Sabate, M.J. Espuny, A.M. Solanas // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, №. 11. – P. 7008-7018.
241. Warenik-Bany, M. Impact of environmental pollution on PCDD/F and PCB bioaccumulation in game animals / M. Warenik-Bany, S. Maszewski, S. Mikolajczyk, J. Piskorska-Pliszczynska // *Environmental Pollution.* – 2019. – V. 255. – doi: 10.1016/j.envpol.2019.113159.
242. Warren, R. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / R. Warren [et al.] // *Journal of bacteriology.* – 2004. – V. 186, №. 22. – P. 7783-7795.
243. Watanabe, T. Draft genome sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a biphenyl-utilizing bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil / T. Watanabe [et al.] // *Genome Announc.* – 2015b. – V. 3, №. 2. – doi: 10.1128/genomeA.00222-15.
244. Watanabe, T. Draft genome sequence of *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil / T. Watanabe [et al.] // *Genome Announc.* – 2015a. – V. 3, №. 2. – doi: 10.1128/genomeA.00223-15.
245. Wiegel, J. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls / J. Wiegel, Q.Z. Wu // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000. – V. 32, №. 1. – P. 1-15.
246. Witzig, R. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases / R. Witzig, H. Junca, H.J. Hecht, D.H. Pieper // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72, №. 5. – P. 3504-3514.

247. Xiong, F. Expression, purification and functional characterization of a recombinant 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* / F. Xiong [et al.] // Molecular biology reports. – 2011. – V. 38, №. 7. – P. 4303-4308.

248. Xu, L. Congener selectivity during polychlorinated biphenyls degradation by *Enterobacter* sp. LY402 / L. Xu [et al.] // Current microbiology. – 2011. – V. 62, №. 3. – P. 784-789.

249. Xu, Y. Complete genome sequence of the polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. WB1 / Y. Xu, M. Yu, A. Shen // Genome Announc. – 2016. – V. 4, №. 5. – doi: e00996-16.

250. Xu, Y. Effects of ferric oxyhydroxide on anaerobic microbial dechlorination of polychlorinated biphenyls in Hudson and Grasse river sediment microcosms: dechlorination extent, preferences, ortho removal, and its enhancement / Y. Xu, K.B. Gregory, J.M. VanBriesen // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – doi: 10.3389/fmicb.2018.01574.

251. Yang, X. Biodegradation of seven polychlorinated biphenyls by a newly isolated aerobic bacterium (*Rhodococcus* sp. R04) / X. Yang, Y. Sun, Qian S. // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2004. – V. 31, №. 9. – P. 415-420.

252. Yang, X. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader / X. Yang [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2011. – V. 193, №. 18. – P. 5032-5033.

253. Yang, X. Purification, characterization, and substrate specificity of two 2,3-dihydroxybiphenyl 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus* sp. R04, showing their distinct stability at various temperature / X. Yang [et al.] // Biochimie. – 2008. – V. 90, №. 10. – P. 1530-1538.

254. Yano, K. Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* sp. 065240 / K. Yano [et al.] // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2015. – V. 79, №. 3. – P. 496-504.

255. Yates, J.R. Sequence similarities in the genes encoding polychlorinated biphenyl degradation by *Pseudomonas* strain LB400 and *Alcaligenes eutrophus* H850 /

J.R. Yates, F.J. Mondello // *Journal of bacteriology*. – 1989. – V. 171, №. 3. – P. 1733-1735.

256. Yeates, C. Novel forms of ring-hydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils / C. Yeates, A.J. Holmes, M.R. Gillings // *Environmental microbiology*. – 2000. – V. 2, №. 6. – P. 644-653.

257. Yu, H. Enhanced anaerobic dechlorination of polychlorinated biphenyl in sediments by bioanode stimulation / H. Yu [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2016. – V. 211. – P. 81-89.

258. Yu, H. Microbial polychlorinated biphenyl dechlorination in sediments by electrical stimulation: The effect of adding acetate and nonionic surfactant / H. Yu [et al.] // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 580. – P. 1371-1380.

259. Zhang, C. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria / C. Zhang, G.N. Bennett // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – V. 67, №. 5. – P. 600-618.

260. Zhang, P. Distribution and transfer pattern of polychlorinated biphenyls (PCBs) among the selected environmental media of Ny-Alesund, the Arctic: as a case study / P. Zhang [et al.] // *Marine pollution bulletin*. – 2014. – V. 89, №. 1-2. – P. 267-275.

261. Zhao, Q. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments/soils of different wetlands along 100-year coastal reclamation chronosequence in the Pearl River Estuary, China / Q. Zhao [et al.] // *Environmental pollution*. – 2016. – V. 213. – P. 860-869.

262. Zhou, J.L. Estimation of uncertainty in the sampling and analysis of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil in Brighton, UK / J.L. Zhou, E. Siddiqui, H.H. Ngo, W. Guo // *Science of the Total Environment*. – 2014. – V. 497. – P. 163-171.

263. Zielinski, M. The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase α subunit / M. Zielinski, S. Backhaus, B. Hofer // *Microbiology*. – 2002. – V. 148, №. 8. – P. 2439-2448.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

**Нуклеотидные последовательности клонированных генов *bphA1*,
депонированные в базу данных GenBank**

Клон	Образцы тотальной ДНК	Фрагмент клонированного гена	Номер в GenBank
16B	Поверхностный слой шламохранилища калийного предприятия (г. Березники)	<i>bphA1</i>	MF084200.1
21B			MF084202.1
30B			MF084201.1
31B			MF084203.1
38B			MF084204.1
2a			MN099028.1
3a	MN099029.1		
13a	MN099031.1		
18b	MN099032.1		
4a	MN099030.1		
35a	MN099033.1		
36a	MN099034.1		
41b	MN099035.1		
Pp64	Почва с территории “Пермского завода смазок и СОЖ” (г. Пермь)	MN153170.1	
Pp105		MN153172.1	
Pp123		MN153173.1	
Ch9	Донные отложения р. Чапаевки (территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов”)	MN153171.1	
Ch14		MN153169.1	

Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *bphA1* штаммов-деструкторов, депонированные в базу данных GenBank

Штамм	Место выделения	Фрагмент гена	Номер в GenBank
1	2	3	4
<i>Rhodococcus</i> sp. BBL12-2	Поверхностный слой шламохранилища калийного предприятия (г. Березники)	16S рРНК	MN094599.1
		<i>bphA1</i>	MN037963.1
<i>Rhodococcus</i> sp. КВВ16	Почва/грунт около солеотвала калийного предприятия (г. Березники)	16S рРНК	MN078966.1
		<i>bphA1</i>	MN037960.1
<i>Pseudomonas</i> sp. VRP2-2	Почва с территории “Пермского завода смазок и СОЖ” (г. Пермь)	16S рРНК	KY971637.1
		<i>bphA1</i>	KY978889.1
<i>Pseudomonas</i> sp. VRP2-6	Почва с территории “Пермского завода смазок и СОЖ” (г. Пермь)	16S рРНК	KY977422.1
		<i>bphA1</i>	KY978890.1
<i>Rhodococcus</i> sp. FXO1	Сточные воды предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)	16S рРНК	MN079075.1
		<i>bphA1</i>	MN037961.1
<i>Rhodococcus</i> sp. FXO2	Сточные воды предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь)	16S рРНК	MN080146.1
		<i>bphA1</i>	MN037962.1

Продолжение таблицы

1	2	3	4	
<i>Rhodococcus</i> sp. VR31-1	Донные отложения р. Чапаевки (территория ОАО “Средне-Волжского завода химикатов”)	16S рPHK	MT317124.1	
		<i>bphA1</i>	MN037957.1	
<i>Rhodococcus</i> sp. VR33			16S рPHK	MT317178.1
			<i>bphA1</i>	MN037958.1
<i>Rhodococcus</i> sp. VR43-1			16S рPHK	MT317307.1
			<i>bphA1</i>	MN037959.1