

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

Егорова Дарья Олеговна

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

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук

Плотникова Елена Генриховна

Пермь – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1. Общая характеристика полихлорированных бифенилов	21
1.2. Бактерии – основной агент экологически безопасной деструкции полихлорированных бифенилов	29
1.2.1. География распространения аэробных штаммов-деструкторов полихлорированных бифенилов	30
1.2.2. Ассоциации бактерий, осуществляющие разложение ПХБ	36
1.3. Молекулярно-генетические основы аэробной трансформации бифенила/ПХБ	39
1.3.1. Классический путь окисления бифенила/ПХБ	39
1.3.2. Ключевые ферменты «верхнего» пути и их особенности	41
1.3.3. Метаболические пути разложения основных продуктов бактериальной трансформации бифенила/ПХБ	52
1.3.4. Организация генетических систем деструкции ПХБ у аэробных бактерий	56
1.4. Применение бактерий для очистки ПХБ-загрязненных почв	73
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	82
2.1. Отбор образцов почв	82
2.2. Бактериальные штаммы	90
2.3. Среды, реактивы и условия культивирования	90
2.4. Анализ ростовых параметров бактериальных ассоциаций и индивидуальных штаммов	93
2.5. Ароматические соединения, использованные в качестве субстратов культивирования	94
2.6. Методы идентификации бактерий	95
2.7. Модельные системы для изучения бактериальной деструкции полихлорбифенилов	98
2.8. Аналитические методы	100
2.8.1. Определение концентрации ПХБ	100

2.8.2.	Анализ продуктов расщепления ПХБ	103
2.8.3.	Анализ концентрации основных метаболитов бактериальной деструкции ПХБ	103
2.8.4.	Анализ концентрации ионов хлора	104
2.9.	Определение активности ферментов разложения основных метаболитов деструкции ПХБ	104
2.10.	Молекулярно-генетические методы	107
2.11.	Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы и метаболических путей	113
2.12.	Кинетические параметры деструкции ПХБ	114
2.13.	Безопасность штаммов-деструкторов для животных и человека	115
2.14.	Статистическая обработка данных	116
ГЛАВА 3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ БИФЕНИЛА/ПХБ		117
3.1.	Разнообразие аэробных бактерий, осуществляющих деструкцию (хлор)ароматических соединений	117
3.2.	Бактериальное разложение индивидуальных конгенов хлорированных бифенилов, содержащих заместителей в одном из колец молекулы	121
3.3.	Особенности деструкции дихлорированных бифенилов с заместителями в обоих кольцах молекулы активными штаммами-деструкторами	124
3.4.	Разложение трихлорированных бифенилов с расположением заместителей {2+1} представителями класса <i>Actinobacteria</i>	132
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПХБ		139
4.1.	Внехромосомные элементы	139
4.2.	Разнообразие α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, контролирующей первый этап окисления бифенила/ПХБ, у штаммов родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Rhodococcus</i>	145

4.2.1. Анализ α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы у штаммов рода <i>Pseudomonas</i>	145
4.2.2. Анализ α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы у штаммов рода <i>Rhodococcus</i>	152
4.2.3. Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов <i>R. wratislaviensis</i> KT112-7 и <i>R. ruber</i> P25	158
4.3. Анализ генома штамма <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> KT112-7	161
4.3.1. Общая характеристика генома <i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	161
4.3.2. Анализ <i>bph</i> -генов	163
4.3.3. Гены деструкции (хлор)-/(гидрокси)- бензойных кислот	168
4.4. Разнообразие генов/ферментов, обуславливающих разложение (хлор)/(гидрокси)бензойных кислот и (хлор)катехолов, у активных штаммов-деструкторов и бактериальных ассоциаций	171
4.4.1. Характеристика генов/ферментов, участвующих в метаболизме (хлор)/(гидрокси)бензойных кислот и (хлор)катехолов, активных бактерий-деструкторов ПХБ	172
4.4.2. Разнообразие α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы в микробных сообществах почв ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, РФ)	182
ГЛАВА 5. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ КОММЕРЧЕСКИХ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ХИМИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫХ СМЕСЕЙ ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛОВ	186
5.1. Особенности деструкции экспериментальной и коммерческих смесей ПХБ индивидуальными штаммами	186
5.2. Деструкция коммерческих смесей ПХБ бактериальными ассоциациями	198
5.3. Трансформация смеси гидрокси- и метокси-полихлорированных бифенилов штаммом <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> KT112-7	202
5.3.1. Эффективность бактериальной деструкции различных концентраций смеси GM	203
5.3.2. Деструкция смеси GM иммобилизованными и планктонными клетками штамма <i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	206

5.4.	Бактериальная деструкция смесей С1 и С2, полученных при химической модификации коммерческой смеси ПХБ Совол полиэтиленгликолями	212
5.5.	Деструкция модифицированной смеси ПХБ, полученной при взаимодействии Совола с 2-аминоэтанолом (смесь GA), штаммом <i>R. wratislaviensis</i> КТ112-7 в различных условиях	218
5.5.1.	Бактериальное разложение смеси GA в стандартных условиях (растворение в ацетоне)	218
5.5.2.	Бактериальное разложение смеси GA с применением ПАВ	220
5.5.3.	Биодеструкция смеси GA в условиях засоления	222
5.6.	Деструкция смесей гидрокси-полихлорбифенилов штаммами <i>R. wratislaviensis</i> КТ112-7 и <i>R. ruber</i> P25	226
5.6.1.	Особенности разложения смесей гидрокси-ПХБ, полученных на основе ПХБ 29 и ПХБ 30	226
5.6.2.	Разложение смеси НО-ПХБ, полученной на основе коммерческой смеси ПХБ марки Трихлорбифенил	229
5.6.3.	Разложение смесей НО-ПХБ, полученных на основе коммерческой смеси ПХБ марки Совол	232
ГЛАВА 6. БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ПХБ КАК ОСНОВНЫЕ АГЕНТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ		242
6.1.	Очистка искусственно загрязненных почв в модельных системах	242
6.1.1.	Разложение монохлорбифенилов в модельных почвенных системах	242
6.1.2.	Биодеструкция искусственных смесей ПХБ штаммами рода <i>Rhodococcus</i> в модельных почвенных системах	244
6.1.3.	Эффективность применения бактериального консорциума для очистки почвы, загрязненной Соволом	247
6.2.	Биоремедиация почв, длительно загрязненных промышленными смесями ПХБ	254
6.2.1.	Очистка ПХБ-загрязненной почвы г. Калуш (Украина) штаммом <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> КТ112-7	254

6.2.2. Биоремедиация ПХБ-загрязненной почвы г. Чапаевск (РФ) индивидуальными штаммами и сообществами	257
6.3. Анализ безопасности биотехнологически перспективных штаммов-деструкторов для высших организмов	262
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	265
ВЫВОДЫ	274
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	277
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	279
Приложение 1	332
Приложение 2	337
Приложение 3	341
Приложение 4	353
Приложение 5	358

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

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

ПХБ несут угрозу нормальному существованию экосистем, вызывают тяжелые заболевания живых организмов и аккумулируются в верхнем звене пищевой цепи в значительном количестве. При этом часть конгенов ПХБ по своей токсичности превосходят такие опасные СОЗ как

полихлорированные дибензофураны и дибензо-диоксины (Reddy *et al.*, 2019; Devi, 2020). ПХБ устойчивы к воздействию физико-химических факторов, что обуславливает их длительное присутствие в природных объектах. Несмотря на то, что проблеме уничтожения ПХБ посвящено значительное количество исследований в области физики, химии и биологии, до сих пор остаются открытыми фундаментальные вопросы, связанные с поиском оптимальных экологически безопасных и экономически целесообразных механизмов удаления ПХБ из природных и техногенных объектов. Одним из перспективных направлений в решении данных вопросов является изучение деградационного потенциала природных аэробных бактерий.

ПХБ, являясь новым субстратом для бактериальных штаммов, спровоцировали эволюцию метаболических процессов в клетке в направлении адаптации к использованию новой химической структуры в качестве источника питания. Известно, что разложение ПХБ у аэробных бактерий идет с использованием метаболического пути трансформации незамещенного бифенила (Pieper, 2005; Chang *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2014; Agulló *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2019). Выделяют две части бифенильного метаболического пути: верхнюю и нижнюю. В «верхнем» пути происходит окисление молекулы бифенила под действием комплекса ферментов до образования бензойной и пентадиеновой кислот (Chang *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017; Agulló *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2019). Данный путь кодируется *bph*-генами, которые могут иметь как плазмидную, так и хромосомальную локализацию (Pieper, 2005; Parales, Resnick, 2006; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Su *et al.*, 2019). Первичная атака, в большинстве случаев, обусловлена активностью ферментов класса диоксигеназ. Ведущую роль в определении субстратной специфичности бифенил 2,3-диоксигеназы в отношении конгенов ПХБ играет строение α -субъединицы и, соответственно, кодирующего ее гена *bphA1* (Furukawa *et al.*, 2004; Viger *et al.*, 2012; Hoostal, Bouzat, 2016). На настоящий момент отсутствуют систематизированные данные о взаимосвязи строения α -субъединицы

бифенил 2,3-диоксигеназы и ее способности к окислению различных конгенов ПХБ. «Нижний» путь – окисление бензойной и пентадиеновой кислот с участием различных групп ферментов (Chang *et al.*, 2013; Murinová *et al.*, 2014; Agulló *et al.*, 2019). В большинстве случаев в штаммах-деструкторах представлен либо «верхний», либо «нижний» путь трансформации бифенила (Pieper, 2005; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Aken *et al.*, 2010). Полная утилизация бифенила/ПХБ возможна при наличии в микробиоценозе нескольких бактериальных штаммов, находящихся в синтрофных взаимодействиях (Zhang *et al.*, 2016). Описано незначительное количество штаммов, осуществляющих разложение полихлорированных бифенилов до соединений основного обмена клетки (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal, 2000; Park *et al.*, 2001; Pori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Известно, что промежуточными соединениями, образующимися в ходе бактериальной деструкции ПХБ, являются гидроксированные хлорбифенилы (Pieper, 2005). Кроме того, гидрокси-ПХБ могут образовываться в окружающей среде как конечный продукт трансформации ПХБ растениями, а также под действием природных окислителей (Tehrani, Van Aken, 2014). Также появились сведения о формировании метоксилированных производных ПХБ в осадках сточных вод химических предприятий (Sun *et al.*, 2016). В литературе присутствует ограниченное количество публикаций, рассматривающих особенности трансформации гидрокси-ПХБ бактериями. Показано, что штаммы *Comamonas testosteroni* В-356, *Burkholderia xenovorans* LB400 и *Sphingomonas* sp. N-9 осуществляют разложение моно-гидрокси-(моно-три)-хлорированных бифенилов в аэробных условиях (Francova *et al.*, 2004; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Высоко хлорированные гидрокси-ПХБ подвергаются восстановительному дегалогенированию штаммами *Desulfitobacterium dehalogenas* JW/IUDC1 (DSMZ 9161) и *Desulfitobacterium dehalogenas* XZ-1 (ATCC 700041) (Tehrani, Van Aken, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Сведения о возможности

бактериальной трансформации ПХБ, содержащих в молекуле заместителей другой химической природы, в частности метокси-группы, отсутствуют.

Помимо этого, биоразложение ПХБ осложнено количеством и расположением атомов хлора в молекуле. Большинство аэробных бактерий-деструкторов высокоактивны по отношению к моно- и ди-хлорбифенилам (Kim, Picardal, 2000; Adebuseye *et al.*, 2008). Описано несколько штаммов родов *Pseudomonas*, *Burkholderia* и *Rhodococcus*, которые проявляют деградационную активность к средне- и высокохлорированным бифенилам (Pieper, 2005; Natamian-Zarmi *et al.*, 2009; Petrić *et al.*, 2011). Наиболее изученными среди них являются штаммы *Burkholderia xenovorans* LB400 and *Rhodococcus jostii* RHA1 (Pieper, 2005). Известно, что биодоступность ПХБ зависит не только от количества заместителей, но и от их расположения в молекуле бифенила (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Наибольшей устойчивостью к бактериальной атаке и токсичностью для живых организмов обладают планарные конгенеры (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Следует отметить, что в коммерческих смесях ПХБ представлены несколько десятков конгенов в основном с количеством заместителей больше 3 (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erickson, Kaley, 2011). Теории, построенные на данных об активности отдельных штаммов к различным конгенам ПХБ, не позволяют достоверно спрогнозировать возможность применения данных штаммов для уничтожения смесей ПХБ.

Проведение всестороннего исследования генетических, биохимических и метаболических особенностей аэробных бактериальных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ, выделенных из районов с высокой техногенной нагрузкой, внесет существенный вклад в развитие фундаментальных знаний в области микробной экологии, эволюции генетических систем, обуславливающих способность бактерий использовать токсичные соединения в качестве источника углерода, а также послужит основой для разработки эффективных эковиотехнологий, направленных на

восстановление ПХБ-загрязненных территорий, и на уничтожение не востребуемых смесей ПХБ.

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

Основные задачи исследования

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

Научная новизна

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

Выявлена уникальная способность штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* СН625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* СН628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. В7а, *R. erythropolis* G12а, *Microbacterium oxydans* В51, к окислению как *орто*-, так и *пара*-замещенного кольца в молекулах ди/три-хлорбифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1} с последующей деструкцией образовавшихся хлорбензойных кислот до соединений основного обмена клетки. Разложение хлорбензойных кислот происходит как в результате диоксигенирования с образованием катехола/хлоркатехолов, так и в результате гидроксирования с образованием *пара*-гидроксибензойной и протокатеховой кислот, разлагаемых далее до соединений, участвующих в цикле трикарбоновых кислот.

В результате молекулярно-генетических исследований показано, что гены *bphA1*, кодирующие α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (2,3-ДО) штаммов рода *Rhodococcus*, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами фенилпропионат

2,3-ДО (97.7–100%) у 2 штаммов, бифенил 2,3-ДО (99.5–100%) у 4 штаммов и бифенил/толуол 2,3-ДО грамположительных бактерий (87.1–99.6%) у 14 штаммов.

Впервые, на основании нуклеотидной последовательности генов *bphA1*, применяя методы биоинформатического анализа и 3D-моделирования, получены вторичная и третичная структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*BphA1*) штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что *BphA1* штамма *R. ruber* P25 характеризуется уникальной структурой и не имеет достоверного уровня сходства с известными α -субъединицами бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-ДО. Напротив, *BphA1*_{KT112-7} (ген которой локализован на плазмиде), имеет высокий процент сходства (98.65%) с α -субъединицей бифенил 2,3-ДО известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1.

Впервые определена и проанализирована полногеномная последовательность штамма *R. wratislaviensis* KT112-7. Установлено, что геном представлен хромосомой (7587912 п.н., GenBank CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (281912 п.н., GenBank CP072194.1), pRHWK2 (130937 п.н., GenBank CP072195.1). В результате анализа генома показано, что гены бифенильного пути располагаются как на хромосоме (имеют высокую степень сходства с генами деструкции нафталина), так и на плазмидах (высокий уровень сходства с классическими *bph*-генами). Также в геноме штамма KT112-7 выявлены гены, обуславливающие его способность разлагать хлор- и гидроксид-бензойные кислоты до соединений основного обмена клетки.

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

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные результаты позволили сформулировать концепцию, дополняющую существующую теорию о роли аэробных бактерий в разложении полихлорированных бифенилов. В ранее не исследованных биотопах, расположенных на территории Российской Федерации и загрязненных различными галогенорганическими, в том числе и ароматическим соединениями – полихлорированными бифенилами, осуществляется селекция бактерий, в результате которой преимущественное развитие получают штаммы, обладающие биодegradативным потенциалом в отношении химических соединений, структура которых подобна/идентична представленным в биотопе загрязнителям. Длительная многолетняя селекция автохтонных бактерий приводит к существенным изменениям на молекулярно-генетическом уровне, что обуславливает появление аэробных бактериальных штаммов с уникальными свойствами в отношении труднодоступных и токсичных поллютантов, в частности, полихлорированных бифенилов. Выявление и всестороннее исследование данных штаммов вносит существенный вклад в развитие теоретических основ понимания процессов аэробной трансформации ПХБ в клетках бактерий, а также позволяет находить новые подходы к разработке эковиотехнологий, направленных на восстановление окружающей среды и удаление неустойчивых ПХБ с учетом требований экологической безопасности.

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

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

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

С использованием биоинформационных методов анализа получены данные об уникальном сочетании генов, контролирующих деструкцию ПХБ, в геноме штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 (=VKM Ac-2623D), полногеномная нуклеотидная последовательность штамма KT112-7 размещена в международной базе GenBank (CP072193.1, CP072194.1, CP072195.1). Применение молекулярно-генетических методов и современных биоинформационных ресурсов позволило визуализировать третичную структуру α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, фермента первичной атаки молекулы ПХБ, штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis*

КТ112-7, а также установить полиморфизм гена *bphA1* у штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*.

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

Положения, выносимые на защиту

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

2. Разложение коммерческих смесей ПХБ торговых марок Трихлорбифенил/Delor 103 и Совол (начальная концентрация 100–600 мг/л, время деструкции 8–14 сут), а также модельной смеси ПХБ (начальная концентрация 32 мг/л, время деструкции 3 сут) на 95–100% осуществляют штаммы рода *Rhodococcus* (*Rhodococcus* sp. MD1, MD2, B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* КТ112-7), а также штаммы *Microbacterium oxydans* B51 и *Pseudomonas* sp. MD8. Бактериальные ассоциации, изолированные из ПХБ-загрязненных почв, разлагают Трихлорбифенил/Delor 103 (начальная концентрация 13.8 мг/л, время деструкции 8 сут) и Совол (начальная концентрация 55 мг/л, время деструкции 8 сут) на 99.38–99.97%.

3. Штаммы *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляют деградационную активность по отношению к химически модифицированным смесям ПХБ, содержащим гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси-,

аминоэтокси-хлорированные бифенилы. Выявленная активность может быть использована для решения проблемы утилизации ПХБ в рамках междисциплинарного подхода, сочетающего в себе этапы химической трансформации ПХБ (внедрение дополнительных заместителей в молекулу) и бактериальной деструкции полученных производных.

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

Апробация работы

Основные результаты исследования представлены на региональной конференции «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии» (Пермь, 1999), на VII Коми республиканской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2000), на Межвузовской конференции «Экология: проблемы и пути решения» (Пермь, 1999, 2000), на V международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Волгоград-Пермь, 2001), Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2002, 2004, 2005, 2006, 2010, 2012, 2013, 2014, 2016, 2017, 2020), на международной конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2004), на международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2004, 2008,

2010), на московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2005), на международной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал» (Пермь, 2005), International scientific conference «Microbial Biotechnology» (Chisinau, Moldova, 2009, 2011, 2016), на международной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Уде, 2011), на международной школе-семинаре «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2012, 2014, 2015, 2018), на международной конференции «Микробное разнообразие: ресурсный потенциал» (Пермь, 2016), на Российском микробиологическом конгрессе (Москва, 2017), на международной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), на международной конференции «Отходы, причины образования и перспективы использования» (Краснодар, 2019), на международной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 2020).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 135 печатных работ, включая 1 обзорную и 55 экспериментальных статей, из которых 30 статей опубликованы в журналах, входящих в международные базы цитирования SCOPUS и Web of Science (Journal of Hazardous Materials (Q1), International Biodeterioration and Biodegradation (Q1), Environmental Geochemistry and Health (Q1), Journal of Environmental Science and Health. Part B (Q2), Water Air and Soil Pollution (Q2), Микробиология, Прикладная биохимия и микробиология, Экология, Биотехнология, Доклады Академии Наук, Молекулярная биология, Экология человека, Почвоведение, Экологическая генетика), 12 статей в журналах списка ВАК, 14 статей в других журналах, 74 публикации в материалах российских и международных конференций, 5 патентов.

Объем и структура диссертации

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

Связь работы с крупными научными программами

Работа выполнена в соответствии с планом НИР «ИЭГМ УрО РАН» - филиала ПФИЦ УрО РАН в рамках тем «Биохимические и генетические системы трансформации сложных органических соединений у бактерий, перспективных для биотехнологии» (ГР № 0120.0406511), «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (ГР № АААА-А19-119112290009-1), «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем» (ГР № АААА-А19-119112290010-7). Исследования проведены в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы междисциплинарных проектов фундаментальных исследований УрО РАН проект № 12-М-34-2036, Комплексной программы УрО РАН проект № 18-3-8-19. Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-96028, № 13-04-96049, № 14-04-96021, № 18-29-05016), молодежных грантов УрО РАН № 10-4-ИП-161.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Спектроскопия и анализ органических соединений» (ЦКП «САОС»), ЦКП

«Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН, а также оборудования молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета.

Личный вклад автора

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

Благодарности

Автор выражает благодарность д.м.н., профессору, чл.-корр. РАН Виталию Алексеевичу Демакову за многолетнюю помощь в организации исследований; вед. научн. сотруднику ИОС УрО РАН, д.х.н. Татьяне Ивановне Горбуновой и с.н.с. ИОС УрО РАН, к.х.н. Марине Геннадьевне Первовой за помощь в совместных исследованиях по биодеструкции химически модифицированных ПХБ; вед. научн. сотруднику лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Пушкино, д.б.н. Инне Петровне Соляниковой за помощь в совместных экспериментах по изучению ферментов активных штаммов-деструкторов.

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, зав. лаб. микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, д.б.н. Плотниковой Елене Генриховне за многолетнюю поддержку и внимание к проводимым исследованиям.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика полихлорированных бифенилов

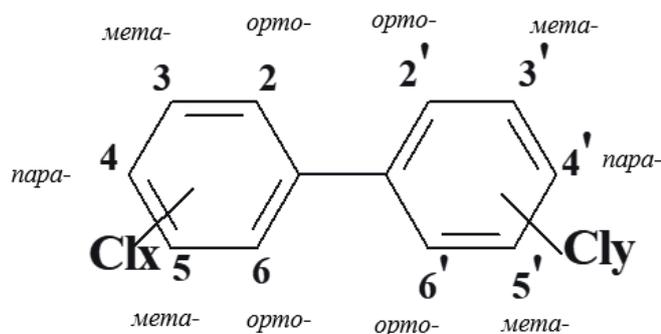
Полихлорированные бифенилы (ПХБ) - группа высоко опасных для окружающей среды и человека соединений. В конце 20-го века в рамках программы ООН по окружающей среде (ЮНЕП) были разработаны международные документы, содержащие сведения о веществах антропогенного происхождения, являющихся угрозой экологическому благополучию, и регламентирующие их дальнейшее применение. На основании проведенных исследований мировым сообществом в 2001 г была принята Стокгольмская конвенция «О стойких органических загрязнителях», согласно которой вещества, вошедшие в список стойких органических загрязнителей (СОЗ), должны быть выведены из производства и уничтожены (Final act..., 2001). Россия ратифицировала Стокгольмскую конвенцию 27 июня 2011 г, приняв на себя обязательства по ее реализации (ФЗ №164 от 27.06.2011).

В первоначальный перечень СОЗ («грязная дюжина») вошли: пестициды (альдрин, эндрин, дильдрин, хлордан, дихлор-дифенил-трихлорэтан, токсафен, мирекс, гептахлор, гексахлорбензол), целевые продукты промышленного производства (полихлорированные бифенилы (ПХБ)), побочные продукты производства (полихлорированные дибензодиоксины (ПХДД), полихлорированные дибензофураны (ПХДФ)). ПХБ являются одними из самых распространенных загрязнителей из списка СОЗ. Согласно Стокгольмской конвенции, запасы ПХБ должны быть уничтожены к 2025 г, а также ПХБ должны быть удалены из объектов окружающей среды (почвы, донные отложения) (<http://chm.pops.int>).

Физико-химические свойства ПХБ

В основе химической структуры полихлорированных бифенилов лежит бифенил – по своему строению он представляет два ароматических цикла, соединенных С-С связью. ПХБ были синтезированы в результате

хлорирования молекулы бифенила в присутствии железной стружки. Количество заместителей в молекуле бифенила зависело от времени протекания реакции и составляло от 1 до 10 атомов хлора на молекулу бифенила (рисунок 1).



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

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

Всего к группе ПХБ относится 209 конгенов, отличающихся количеством и положением заместителей в молекуле. Бензольные кольца могут располагаться в одной плоскости или под углом друг к другу (угол может составлять до 90°). Положение бензольных колец зависит от количества заместителей в *орто*-положении. Молекулярная масса ПХБ составляет 188.7–498.7 у различных конгенов групп, растворимость в воде колеблется в пределах 0.000001–5.5 мг/дм³, logK_{ов} – 0.015–8.26, однако, ПХБ хорошо растворимы в жирах, маслах и органических растворителях. ПХБ обладают высокими диэлектрическими характеристиками (диэлектрическая константа 2.5–2.7), высокой теплопроводностью и высокой температурой вспышки (170–380°C). ПХБ характеризуются высокой химической стабильностью, не поддаются гидролизу и окислению в широком диапазоне температур, устойчивы к действию кислот и щелочей. По агрегатному состоянию смеси ПХБ представляют собой масла и смолы, от бесцветных до желтых (Горбунова и др., 2018).

Производство и применение

Промышленное производство ПХБ было открыто в США в 1929 г, в СССР – в 1939 г. В этот же отрезок времени предприятия по производству ПХБ были открыты в ряде стран Европы и в Японии. ПХБ производили в виде смесей, содержащих от 30 до 70 конгенов, под различными торговыми марками: Aroclor – в США, Delor (Чехословакия), Klofen (Германия), Kaneclor (Япония), Совол, Совтол, Трихлорбифенил (ТХБ) (СССР), Fenclor (Франция) (Трегер, 2013; Erikson, Kaley II, 2011). Каждая из указанных марок имеет еще дополнительное цифровое обозначение, характеризующее соотношение входящих в нее конгенов. Состав Совола и ТХБ, а также соотношение некоторых коммерческих смесей ПХБ представлены в Приложении 1 (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erikson, Kaley II, 2011). Следует отметить, что ряд коммерческих смесей, выпускавшихся в разных странах, имеют очень близкий состав. Одним из таких примеров являются смеси ТХБ (СССР) и Delor 103 (Чехословакия). Совол несколько отличается от импортных аналогов (Приложение 1, таблица 32).

На территории России коммерческие смеси ПХБ выпускали на ПО «Оргстекло» г. Дзержинск, ОАО «Оргсинтез» г. Новомосковск. География предприятий, использовавших ПХБ как основное сырье в технологическом цикле, существенно шире: ОАО «Средне-волжский завод химикатов» г. Чапаевск, конденсаторный завод г. Серпухов (в настоящее время АО «КВАР»), нефте- и маслозаводы гг. Нижний Новгород, Санкт-Петербург, Оренбург, Уфа, Пермь. Потребителями продукции данных производств являются предприятия топливно-энергетического, металлургического и химического комплекса страны.

ПХБ применяли в качестве диэлектриков в трансформаторах и конденсаторах, в составе пластификаторов, смазочных смесей, лаков, красок, клеев, теплоносителей, хладагентов, эластомеров, поливинилхлоридов, неопрена, пластмасс, пенорезины, кровельных и изоляционных материалов

(торговые марки Galbestos, Armaflex, Arobor), гидравлических и смазочных жидкостей (торговые марки Turbinol, Santovac) (Zhang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). За время производства было синтезировано более 1 млн. тонн различных смесей ПХБ (Reddi *et al.* 2019). По различным оценкам в объектах окружающей среды находится порядка 40% всех произведенных ПХБ. Уровень загрязненности почв и водных объектов варьирует от 1–2 ПДК до нескольких десятков тысяч ПДК. Согласно инвентаризации 2000 г в России в составе оборудования находится около 28–35 тыс. т. смесей ПХБ, из них около 21 тыс. т. – Совол и Совтол, и около 14 тыс. т. – Трихлорбифенил (Трегер, 2013; Erikson, Kaley II, 2011). Данные об анализе количества ПХБ в окружающей среде на территории РФ отсутствуют, но известно, что наиболее загрязнёнными являются районы их производства и активного использования, в том числе г. Дзержинск, г. Новомосковск, г. Чапаевск, г. Серпухов. Следует отметить, что ПХБ обнаруживаются как на территориях производства и применения, так и в удаленных районах, в том числе в Антарктике, Арктике и песках Сахары (Трегер, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014, Zhu *et al.*, 2020; Negret-Volagay *et al.*, 2021). Такое широкое распространение связано с высокой сорбционной способностью конгенов ПХБ, что способствует их переносу с пылевыми частицами на большие расстояния. Благодаря физико-химическим свойствам ПХБ долго остаются в окружающей среде в неизменённом виде. Производство ПХБ было прекращено в конце 20-го века (Горбунова и др., 2018).

Биологическая опасность

Первые сообщения о негативном влиянии ПХБ на здоровье человека появились в 80-х годах 20 века. Массовые отравления ПХБ выражались в появлении угреподобной сыпи на коже людей, занятых на производстве данных соединений. Заболевание получило название хлоракне. Появились сведения и об отравлении людей, не связанных с производством, но

употребляемыми в пищу продукты, содержащие ПХБ. Было установлено, что ПХБ вызывают не только кожные поражения, но и нарушения в деятельности нервной системы (невралгии, депрессии, нарушение иннервации внутренних органов), сердечно-сосудистой системы, иммунной системы, липидного обмена, эндокринной системы. ПХБ оказывают канцерогенный и тератогенный эффект (Nam *et al.*, 2014; Serdar *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015, Shuai *et al.*, 2016; Murugan *et al.*, 2018; Devi, 2020). При этом дозы, вызывающие негативные последствия, крайне низкие и сопоставимы с таковыми полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов. Были разработаны международные коэффициенты токсичности конгенов ПХБ, которые рассчитываются относительно 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-1,4-диоксина. Значения данных коэффициентов варьируют в диапазоне 0.1–0.00001 (Занавескин, Аверьянов, 1998).

К проникновению ПХБ в организм приводит их способность растворяться в органических растворителях, что ведет к их накоплению в жирах и, как следствие, продвижению по пищевым цепям с концентрированием в верхних сегментах (Adams *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2017; Warenik-Bany *et al.*, 2019). В окружающую среду ПХБ поступали в результате аварийных выбросов на предприятиях, неправильной эксплуатации ПХБ-содержащего оборудования (Negret-Bolagay *et al.*, 2021). В настоящее время, несмотря на прекращение производства, ПХБ продолжают проникать в природные объекты из мест складирования, в результате нарушений технологий утилизации, возгорания промышленного оборудования. География загрязненных территорий увеличивается за счет трансграничного переноса с пылевыми частицами и перемещения живых объектов (Демин, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

В ряде стран, в том числе в РФ, разработаны нормативы, регламентирующие безопасный уровень ПХБ в различных объектах. Согласно классификации опасных соединений, ПХБ отнесены ко II классу (высоко опасные вещества). В России ПДК для воздуха рабочей зоны

составляет 1 мг ПХБ/м³, в воде – 1 мкг/л, в почве – 0.1 мг/кг. ОДК для отдельных групп конгенов в почве составляют: триХБ – 0.03 мг/кг, тетраХБ – 0.06 мг/кг, пентаХБ – 0.1 мг/кг; для пищевых продуктов: в рыбе – 2.0 мг/кг, в печени рыбы – 5.0 мг/кг, в рыбьем жире – 3.0 мг/кг, в молоке – 1.5 мг/кг (ГОСТ 12.1.005-88, СанПиН 4630-88). Установленные нормативы ПХБ для почв жилых зон в Германии составляют 0.8–1.0 мг/кг, в Китае – 2 мг/кг, в Нидерландах – 0.02 мг/кг, во Франции – 0.024 мг/кг, в Белоруссии – 0.02 мг/кг, для питьевой воды в США Агентством по окружающей среде установлена ПДК 0.5 мкг ПХБ/л воды, по нормативам Австралии присутствие ПХБ в питьевой воде недопустимо в любых концентрациях (Крятов и др., 2013, Negret-Volagay et al., 2021).

Проблемы уничтожения ПХБ

Реализация Стокгольмской конвенции в отношении ПХБ требует разработки методов по уничтожению ПХБ как в местах складирования, так и в объектах окружающей среды. Как было сказано выше, ПХБ обладают уникальными физико-химическими характеристиками, что существенно затрудняет их уничтожение. Разработки ведутся в направлении физических, химических и биологических методов.

В настоящее время наиболее распространенными являются термические методы, основанные на сжигании ПХБ при высоких температурах ($t = 2000^{\circ}\text{C}$, 4–6 т $\text{O}_2/1$ т ПХБ). Данная технология позволяет уничтожать ПХБ с эффективностью 99.99% при скорости 1 т/ч. Стоимость зависит от концентрации ПХБ в сжигаемой смеси и начинается от 1500 долларов США. При этом даже незначительные нарушения в технологии приводят к образованию из ПХБ еще более токсичных продуктов – ПХДФ и ПХДД (Горбунова и др., 2011). Пиротехнические методы основаны на сжигании ПХБ с использованием пиротехнических смесей. Однако данные методы приводят к неконтролируемому образованию ПХДФ и ПХДД (Горбунова и др., 2011). Электрохимические методы ограничены поиском

эффективных и устойчивых электродов, которые не будут подвергаться коррозии в процессе реакции. Химические методы активно развиваются и являются перспективными в направлении подготовки ПХБ для последующего уничтожения. Оценка всех имеющихся технологий позволяет сделать вывод, что уничтожение ПХБ является с экономических позиций высокочрезвычайно затратным, а с экологических – опасным для окружающей среды (Горбунова и др., 2010, 2018; Занавескин, Аверьянов, 1998).

Наиболее «дружественными» для природы и единственными, позволяющими удалить ПХБ из природных объектов без разрушения самих объектов, являются методы, основанные на использовании биоремедиационного потенциала бактериальных штаммов.

Производные ПХБ как новая угроза экологическому благополучию

Несмотря на физико-химическую стабильность и токсичность для живых организмов, ПХБ могут трансформироваться в окружающей среде до гидрокси-производных (НО-ПХБ). Известно, что гидроксилирование может происходить как под действием абиотических факторов, так и в результате ферментативных процессов в живых организмах (Camara *et al.*, 2004; Passatore *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). НО-ПХБ могут образовываться в природе в результате фотохимических реакций, в результате окисления в атмосфере, воде и донных отложениях (Tehrani, Van Aken, 2014; Li *et al.*, 2019). Трансформация ПХБ в живых организмах (животные, растения, бактерии, грибы) происходит под действием ферментов класса моно/диоксигеназ, в результате чего образуются гидрокси-производные (Maskova *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2011; Passatore *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018). Большинство из них трансформируются далее под действием других ферментов, однако часть попадает в окружающую среду.

Анализ воздействия НО-ПХБ на живые организмы показал, что они опасны как для высших организмов, так и для бактерий. НО-ПХБ ингибируют митохондриальную и АТФ-азную активность в клетках мышей,

разрушают эндокринную систему, снижают жизнеспособность бактериальных клеток, оказывают токсическое действие на метаболические процессы, протекающие в прокариотических клетках (Sandossi *et al.*, 1991; Camara *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006; Tehrani, Van Aken, 2014; Passatore *et al.*, 2014; Bhalla *et al.*, 2016). Таким образом, НО-ПХБ в настоящее время являются опасными вторичными поллютантами.

Недавно в сточных водах в результате их анализа, наряду с НО-ПХБ, были обнаружены метокси-производные ПХБ (Ме-ПХБ) (Sun *et al.*, 2016, 2018). Установлено, что метокси-производные ПХБ образуются из ПХБ в результате биотрансформации под действием бактериальных штаммов, и за время обращения в природе НО-ПХБ и Ме-ПХБ могут взаимно превращаться друг в друга, что отмечается постоянным изменением их уровней нахождения в объектах окружающей среды. Предположительный механизм взаимопревращений НО-ПХБ и Ме-ПХБ под действием штамма *Bacillus subtilis* подробно представлен в статье (Sun *et al.*, 2018). В отличие от ПХБ производные НО-ПХБ и Ме-ПХБ обладают низкой летучестью, что потенциально способствует их более длительному периоду нахождения в почве, воде и донных отложениях (Sun *et al.*, 2016). В то же время, НО-ПХБ и Ме-ПХБ, обладая лучшими гидрофильными свойствами по сравнению с ПХБ, вероятно, более доступны для микробной деградации.

Сведений об особенностях разложения НО-ПХБ как первоначальном субстрате у бактерий не много. Установлено, что штаммы-деструкторы ПХБ *Burkholderia xenovorans* LB400, *Comamonas testosterone* B-356 и *Sphingomonas* sp. N-9 осуществляют разложение моногидроксилированных полихлорбифенилов (моноНО-ПХБ) (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012; Tehrani *et al.*, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). В окислении моноНО-ПХБ у данных штаммов принимают участие ферменты класса диоксигеназ. Для штамма *Pseudomonas azelaica* НВР1 описана способность окислять *орто*-гидроксибифенил до 2,3-дигидроксибифенила при участии фермента класса монооксигеназ (Kanteev *et al.*, 2015). Бактериальное разложение НО-ПХБ

происходит до стадии формирования хлор- и гидроксид-бензойных кислот (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Сведений о трансформации смесей НО-ПХБ аэробными бактериями в литературе не обнаружено, хотя в окружающей среде присутствуют как раз не единичные конгенеры, а смеси.

1.2. Бактерии – основной агент экологически безопасной деструкции полихлорированных бифенилов

Основная роль в разложении ПХБ в природных условиях принадлежит микроорганизмам, и, в частности, бактериям (Negreet-Bolagay *et al.*, 2021). В трансформации ПХБ принимают участие как анаэробные, так и аэробные бактерии. В анаэробных условиях (донные отложения морей, озер, рек, грунтовые воды) штаммы осуществляют восстановительное дегалогенирование высокохлорированных бифенилов, что не позволяет уничтожить ПХБ, но снижает их опасность и повышает биодоступность вследствие снижения степени хлорирования молекулы (Abramowicz, 1995; Elangovan *et al.*, 2019). Дегалогенирование обусловлено использованием ПХБ в качестве акцептора электронов, в результате чего происходит восстановление молекулы ПХБ до незамещенного бифенила, или до хлорбифенилов, содержащих 2-4 атомов хлора в молекуле (Mohn, Tiedje, 1992; Sowers, May, 2013; Liang *et al.*, 2014; Elangovan *et al.*, 2019). Обнаружены наиболее активные анаэробные штаммы-деструкторы ПХБ, принадлежащие родам *Acidovorax*, *Achromobacter*, *Anaeromyxobacter*, *Clostridium*, *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, *Desulfitobacterium*, *Desulfomonile*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Sedimentibacter* и *Sulfuricurvum* (Kranzioch *et al.*, 2013; Matturro *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). Анаэробное восстановление коммерческих смесей ПХБ в природных условиях приводит к существенному изменению в соотношениях конгенерных групп (доля низкохлорированных бифенилов повышается в несколько раз), а также ведет к преобладанию

орто-замещенных хлорбифенилов (Brown *et al.*, 1984; Wiegel, Wu, 2000; Field, Sierra-Alvarez, 2008).

В результате деятельности аэробных бактерий в большинстве случаев происходит окисление молекулы ПХБ до образования хлорбензойной кислоты (ХБК) и (хлор)пентадиеновой кислоты (Pieper, 2005; Sharma *et al.*, 2017). Однако известны штаммы, осуществляющие минерализацию ПХБ (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal, 2000; Park *et al.*, 2001; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009). В данном случае происходит деструкция молекулы полихлорбифенила до соединений основного обмена клетки. Основными ограничениями доступности ПХБ для аэробных бактерий является степень хлорирования и расположение заместителей в молекуле. Использование аэробных штаммов-деструкторов либо их комбинация с анаэробными штаммами позволяет существенно снижать уровень загрязнения природных объектов смесями полихлорбифенилов.

1.2.1. География распространения аэробных штаммов-деструкторов полихлорированных бифенилов

Исследования нескольких десятилетий выявили широкую географическую распространенность аэробных бактериальных штаммов, осуществляющих разложение хлорированных бифенилов (рисунок 2).

Показано, что штаммы, способные окислять (моно-гекса)-хлорированные бифенилы, выделяются из экониш различных континентов, и приурочены к местам загрязнения соединениями группы СОЗ. Описанные штаммы-деструкторы ПХБ принадлежат родам *Achromobacter*, *Agromyces*, *Alcaligenes*, *Aquamicrobium*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Castellaniella*, *Ceriporia*, *Chitinophaga*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Hydrogenophaga*, *Janibacter*, *Janthinobacterium*, *Luteibacter*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pandora*, *Pandoraea*, *Phanerochaete*, *Phoma*, *Pleurotus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shigella*,

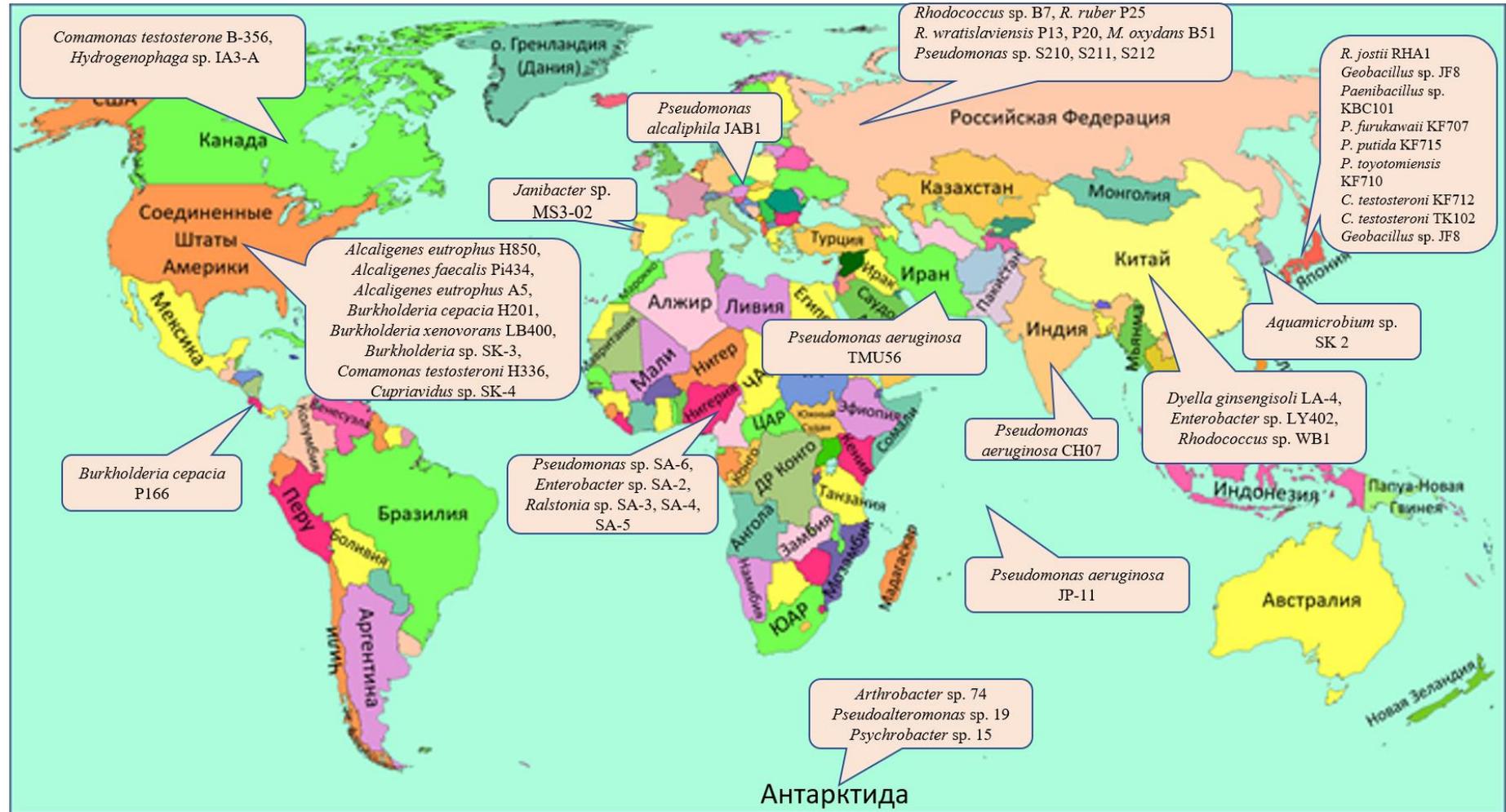


Рисунок 2 – Карта-схема мест выделения наиболее активных аэробных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ (Егорова и др., 2010; Плотникова и др., 2012; Шумкова и др., 2015; Bedard *et al.*, 1987; Mondello, 1989; Bedard, Haberl, 1990; Asturias, Timmis, 1993; Erickson, Mondello, 1993; Arensdorf, Foht, 1994; Chung *et al.*, 1994; Masai *et al.*, 1995; Seto *et al.*, 1995; Maltseva *et al.*, 1999; Sierra *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Sondossi *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2005; Lambo, Patel, 2006; Adebusoye *et al.*, 2008; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Jia *et al.*, 2008; Ang *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Shintani *et al.*, 2014; Fukuda *et al.*, 2014; Gioia *et al.*, 2014; Vilo *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015a, 2015b; Chakraborty, Das, 2016; Xu *et al.*, 2016; Suenaga *et al.*, 2017; Ridl *et al.*, 2018)

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).

Наиболее ранние работы по выделению и описанию штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ проводились на территориях США и Японии. В результате проведенных исследований из ПХБ-загрязненных районов данных стран выделено значительное количество штаммов, обладающих различным деструктивным потенциалом. Наиболее изученными являются штаммы *Alcaligenes eutrophus* H850, *Burkholderia xenovorans* LB400, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Rhodococcus jostii* RHA1 (Yates, Mondello, 1989; Gómez-Gil *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Atago *et al.*, 2016).

Штамм *Alcaligenes eutrophus* H850 использовал в качестве источника углерода не только незамещенный бифенил, но и 2-хлорбифенил, а также осуществлял разложение до хлорбензойных кислот тетра-, пента- и гексахлорированных конгенов. Bedard с соавторами показал, что *A. eutrophus* H850 осуществляет деструкцию коммерческих смесей ПХБ торговых марок Aroclor 1242 и 1254 (Bedard *et al.*, 1987).

Штамм *Burkholderia xenovorans* LB400 первоначально был идентифицирован как представитель рода *Pseudomonas*, далее реклассифицирован в род *Burkholderia*, а на основании анализа полногеномной последовательности был отнесен к роду *Paraburkholderia* (Chain *et al.*, 2006). Показано, что LB400 осуществляет трансформацию как индивидуальных конгенов ПХБ с различной степенью хлорирования, так и коммерческих смесей. Пути деструкции бифенила/ПХБ подробно изучены на генетическом и молекулярном уровнях и являются модельными системами при аналогичных исследованиях других штаммов (Goris *et al.*, 2004; Vako *et al.*, 2021).

Штамм *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 был выделен в Японии и первоначально идентифицирован как *Pseudomonas furukawaii* (Furukawa, Miyazaki, 1986). Отличительной особенностью штамма является его способность эффективно разлагать 4,4'-дихлорбифенил, слабо подверженный разложению другими известными штаммами-деструкторами. Однако штамм KF707 разлагал достаточно узкий диапазон изомеров ПХБ, что ограничивало перспективность его применения для биоремедиации (Furukawa, 2000).

Штамм *R. jostii* RHA1 был изолирован из почвы, загрязненной γ -гексахлорциклогексаном, отобранной на территории Японии, и характеризовался высокой деструктивной активностью по отношению к моно-, ди-, три-, тетра-, гекса- гептаХБ, как *орто*-, так и *пара*-замещенным изомерам ПХБ (Masai *et al.*, 1995; Seto *et al.*, 1995; Warren *et al.*, 2004). Показано, что штамм *R. jostii* RHA1 осуществлял разложение технических смесей Kaneclor 200, 300, 400 (включающих три-, тетра- и пентахлорбифенилы, соответственно) в течение трех суток (Furukawa, 2000). Следует отметить, что штамм *R. jostii* RHA1 проявлял активность и в отношении ди- и трихлорбензойных кислот, основных метаболитов ПХБ, о чем свидетельствовало снижение данных соединений в процессе деструкции хлорбифенилов. Исследования генома штамма показали, что в нем содержится два набора генов, кодирующих ферменты деструкции ПХБ (Furukawa, 2000).

Помимо данных штаммов с территорий США и Японии были выделены и другие активные деструкторы ПХБ. Так, штамм *Paenibacillus* sp. KVC101 активно утилизировал (три-гекса)-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 (Sakai *et al.*, 2005). Штаммы *Burkholderia* sp. SK-3 и *Cupriavidus* sp. SK-4, использовали 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).

С территории Китая выделены штаммы, проявляющие активность как к незамещенному бифенилу, так и к его хлорпроизводным. Штамм *Dyella ginsengisoli* LA-4 утилизировал около 95% бифенила (100 мг/л) в течение 72 часов (Ang *et al.*, 2009), штамм *Rhodococcus* sp. WB1 проявлял активность к (моно-тетра)-хлорированным бифенилам, в том числе к 4,4'-диХБ (Xu *et al.*, 2016), 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).

Особый интерес представляют штаммы, изолированные с территории Нигерии. Штаммы *Ralstonia* sp. SA-3, *Ralstonia* sp. SA-4, *Ralstonia* sp. SA-5, *Pseudomonas* sp. SA-6 и *Enterobacter* sp. SA-2 характеризовались способностью к деструкции *meta*- и *ortho*-дихлорированных бифенилов, а также *ortho*-триХБ, содержащих заместители в обоих кольцах молекулы (Adebusoye *et al.*, 2008, Gioia *et al.*, 2014). В работе (Ilori *et al.*, 2008) описан штамм *Achromobacter xylosoxidans* IR08, который, в отличие от ранее выделенных *Ralstonia* sp. SA-4, *Ralstonia* sp. SA-5, *Pseudomonas* sp. SA-6, был способен утилизировать 4,4'-диХБ без накопления токсичных промежуточных продуктов. Интересным представляется и тот факт, что штамм *A. xylosoxidans* IR08 эффективнее рос на хлорированных бифенилах, чем на бифениле и бензоате. Вероятно, присутствие заместителей не оказывало ингибирующего действия на ферменты. На основании этого авторы сделали предположение об уникальности ферментных систем деструкции ПХБ штамма IR08 (Ilori *et al.*, 2008).

Одним из первых описанных штаммов, осуществляющих разложение ПХБ, является штамм *Burkholderia ceracia* P166, выделенный из загрязненных почв Панамы, и первоначально идентифицированный как *Pseudomonas ceracia* (Arensdorf, Foht, 1994). Штамм P166 характеризовался

способностью использовать в качестве источника углерода все монохлорированные бифенилы. Однако активный рост был отмечен только на 4-хлорбифениле, так как штамм P166 обладал системами утилизации и 4-хлорбензойной кислоты, основного метаболита 4-ХБ. Рост на 3-ХБ и 2-ХБ сопровождался накоплением токсичных продуктов. Также как и у вышеописанного штамма *A. xylooxidans* IR08, скорость роста штамма *B. ceracia* P166 на 4-ХБ превышала рост на бифениле (Field, Sierra-Alvarez, 2008).

Способностью к деструкции бифенила/ПХБ обладает штамм *Aquamicrobium* sp. SK-2, выделенный из активного ила сточных вод (г. Сеул, Южная Корея). Следует отметить, что штамм SK-2 активно рос на бифениле в широком диапазоне концентраций (от 0.65 до 9.75 мМ), а эффективность деструкции при этом составляла от 46.7% до 100%, и находилась в обратной корреляционной зависимости от концентрации субстрата (Chang *et al.*, 2013). Штамм *Pseudomonas aeruginosa* JP-11, выделенный из донных отложений Бенгальского залива (Индийский океан), осуществлял разложение 200 мг/л бифенила за 72 часа на 98.85% (Chakraborty, Das, 2016)

Штаммы, выделенные из активного ила и ПХБ-загрязненных почв на территории Канады, осуществляли разложение (моно-три)-хлорированных бифенилов, а также коммерческой смеси ПХБ марки Aroclor 1242 (Sondossi *et al.*, 2004; Lamdo, Patel, 2006). Для штамма *Comamonas testosteroni* B-356 отмечено предпочтительное окисление конгенов ПХБ, содержащих заместители в *meta*-положении (Sondossi *et al.*, 2004). Высокой активностью в отношении смеси ПХБ Aroclor 1242 обладал штамм *Janibacter* sp. MS3-02, выделенный из почвы, загрязненной выбросами мусоросжигательного завода на территории Испании (Sierra *et al.*, 2003). Штамм *Pseudomonas aeruginosa* TMU56, выделенный из почв, загрязненных отходами электрохимической промышленности (Иран), эффективно разлагал смеси Aroclor 1242 и 1260. Помимо коммерческих смесей, данный штамм осуществлял деструкцию высоких концентраций таких конгенов ПХБ, как 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) (Natamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Штаммы-деструкторы ПХБ, изолированные из почв территории Российской Федерации, представлены в настоящем исследовании и будут описаны в экспериментальной части работы.

Большинство описанных штаммов-деструкторов ПХБ являются мезофильными организмами. Однако известно, что биодеструкция ПХБ возможна и при условиях, отклоняющихся от средних по ряду факторов, таких как температура или содержание солей. Способность разлагать ПХБ при условиях повышенного засоления описана для ограниченного числа бактерий (De *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2013). В частности, штамм *Pseudomonas aeruginosa* СН07, изолированный из прибрежной зоны в Индии, осуществлял деструкцию таких конгенов ПХБ как 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил и 2,2',3,4,4',5,5'-гептахлорбифенил (в концентрации 100 мг/л), при концентрации NaCl ~ 3,4 % (De *et al.*, 2006). Известно несколько психротолерантных штаммов (*Arthrobacter* sp. 74, *Pseudoalteromonas* sp. 19, *Psychrobacter* sp. 15, *Hydrogenophaga faeniospiralis* IA3-A), способных утилизировать ПХБ при +4°C и +15°C. Данные штаммы выделены из почв Антарктиды и Канады (Lambo, Patel, 2006; Michaud *et al.*, 2007; Papale *et al.*, 2017). Среди термофильных бактерий описан только один штамм *Geobacillus* sp. JF8 (Япония), осуществляющий разложение бифенила при +60°C (Shimura *et al.*, 1999, Chakraborty *et al.*, 2017).

1.2.2. Ассоциации бактерий, осуществляющие разложение ПХБ

Важную роль в разложении ПХБ играют бактериальные сообщества. Многочисленные исследования показали, что ассоциации бактерий, осуществляющие разложение ПХБ, формируются в различных средах: в почве, в донных отложениях, а также в экстремальных по физико-химическим условиям районах (Kolar *et al.*, 2007; Petrić *et al.*, 2011; Cervantes-González *et al.*, 2019). Видовой состав данных сообществ не стабилен, зависит

от ряда факторов, в том числе от спектра присутствующих в среде загрязнителей (Holoman *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2015). Так как в процессе биоремедиации количество и разнообразие загрязняющих веществ изменяется, то в бактериальных сообществах отмечается явление сукцессии (Shah *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2018; Tu *et al.*, 2017; Cervantes-González *et al.*; 2019).

Бактериальное сообщество, выделенное из ПХБ-загрязненных почв, было представлено в основном родами *Burkholderia*, *Variovorax*, *Xylophilus*, *Nevskia* и *Sphingomonas* (*Betaproteobacteria*), основными деструкторами выступали штаммы рода *Burkholderia*. Представители класса *Actinobacteria* занимали минорное положение (Nogales *et al.*, 2001). Однако в ряде работ описано иное соотношение классов *Proteobacteria* и *Actinobacteria* в ПХБ-разлагающих бактериальных сообществах. Так, в работе Wagner-Dobler с коллегами (1998) сообщается, что в бактериальных сообществах, полученных из почв после 6 месяцев инкубации в присутствии бифенила, доминирующее положение занимали штаммы родов *Rhodococcus*, *Nocardiopsis*, *Terrabacter* (класс *Actinobacteria*), в меньшей степени представлены штаммы рода *Alcaligenes*, *Yersinia* (класс *Proteobacteria*) и *Bacillus* (класс *Firmicutes*). Основными агентами деструкции являлись штаммы рода *Rhodococcus*. В бактериальных ассоциациях RMC1, RMC2, ZMC56, ZMC57, DMC3, DMC14, выделенных из почв Хорватии, деструкцию ПХБ осуществляли штаммы рода *Rhodococcus* (класс *Actinobacteria*) (Kolar *et al.*, 2007). Штамм *Rhodococcus* sp. Z6 являлся основным активным деструктором ПХБ в ассоциации TSZ7 (Petrić *et al.*, 2011).

Бактериальные сообщества проявляют активность как к индивидуальным конгенерам ПХБ, так и к коммерческим смесям. Из почв Чехии выделены три ассоциации аэробных бактерий, проявляющих активность к коммерческой смеси ПХБ марки Delor 103. Показано, что ассоциация III осуществляла 50% разложение Delor 103 и являлась более перспективной, чем ассоциации I и II, осуществляющие разложение низко

хлорированных конгенов, входящих в состав смеси Delor 103 (Bokvajová *et al.*, 1994).

Существенную роль в разложении ПХБ играют анаэробные бактериальные сообщества. Wu с коллегами (2000) выделил из донных отложений ассоциацию анаэробных бактерий, осуществляющую восстановление (три-пента)-хлорбифенилов в *para*-положении. Напротив, ассоциация анаэробных бактерий, изолированная из иловых отложений Балтиморского порта, проявляла активность в отношении заместителей, находящихся в *ortho*-положении в молекулах ПХБ (Holoman *et al.*, 1998). Natarajan с коллегами (1996) выделил анаэробное метаногенное бактериальное сообщество, проявляющее активность к заместителям в молекуле ПХБ во всех возможных положениях (*ortho*-, *meta*- и *para*-) и осуществляющее восстановление 2,3,4,5,6-пентаХБ до стадии образования бифенила. Несмотря на то, что основным конечным продуктом восстановительного дегалогенирования ПХБ у анаэробных сообществ является незамещенный бифенил, описана метаногенная ассоциация, осуществляющая разложение бифенила до углекислого газа и метана через стадию образования *para*-крезола (Natarajan *et al.*, 1999).

В ряде работ описаны бактериальные ассоциации, сконструированные на основе штаммов с известной деградационной активностью. Так, ассоциация ЕСОЗ включала штамм *Pseudomonas* sp. СРЕ1, осуществляющий разложение 4-хлорбифенила и 3,4'-дихлорбифенила, а также два штамма, субстратом деструкции для которых являлись образующиеся при разложении ПХБ хлорбензойные кислоты. Показано, что в условиях биореактора смешанные культуры бактерий, в состав которых включены штаммы-деструкторы ПХБ и ХБК, эффективно разлагали (моно-ди)-хлорбифенилы и коммерческие смеси ПХБ марок Fenclor 42 и Aroclor 1221 (Fava *et al.*, 1994, 1996, 2000). Бактериальная ассоциация, состоящая из штамма *B. xenovorans* LB400 и генетически-модифицированного штамма *P. putida* mt-2a, осуществляла

утилизацию высоких концентраций 2,4'-дихлорбифенила (Potrawfke *et al.*, 2001).

Таким образом, бактерии-деструкторы ПХБ представлены в микробиоценозах на всех континентах. В большинстве случаев они приурочены к территориям со специфическим загрязнением (ПХБ и другие соединения группы СОЗ). Выделенные и описанные штаммы представляют различные филогенетические группы, основную долю среди которых занимают представители классов *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Высокую деградтивную активность к ПХБ проявляют как индивидуальные штаммы бактерий, так и ассоциации.

1.3. Молекулярно-генетические основы аэробной трансформации бифенила/ПХБ

1.3.1. Классический путь окисления бифенила/ПХБ

Механизм окисления ПХБ аэробными бактериями изучен довольно подробно (Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). Установлено, что разложение ПХБ осуществляется под действием ферментов «верхнего» бифенильного пути до стадии формирования (хлор)бензойной и пентадиеновой кислот, а далее пентадиеновая кислота под действием ферментов «нижнего» пути трансформируется до пирувата и ацетил-КоА, который затем может участвовать в цикле Кребса (рисунок 3). Деструкция (хлор)бензойных кислот обусловлена работой ферментных систем, не связанных с метаболизмом бифенила.

Первичную атаку на ПХБ осуществляет бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA), вводя в молекулу полихлорарена две гидроксильные группы в один из ароматических циклов. В результате, на первом этапе могут образовываться хлорированный бифенил 2,3-дигидродиол, либо хлорированный 2,3-дигидроксибифенил. В случае формирования дигидродиольной структуры, следующий этап трансформации

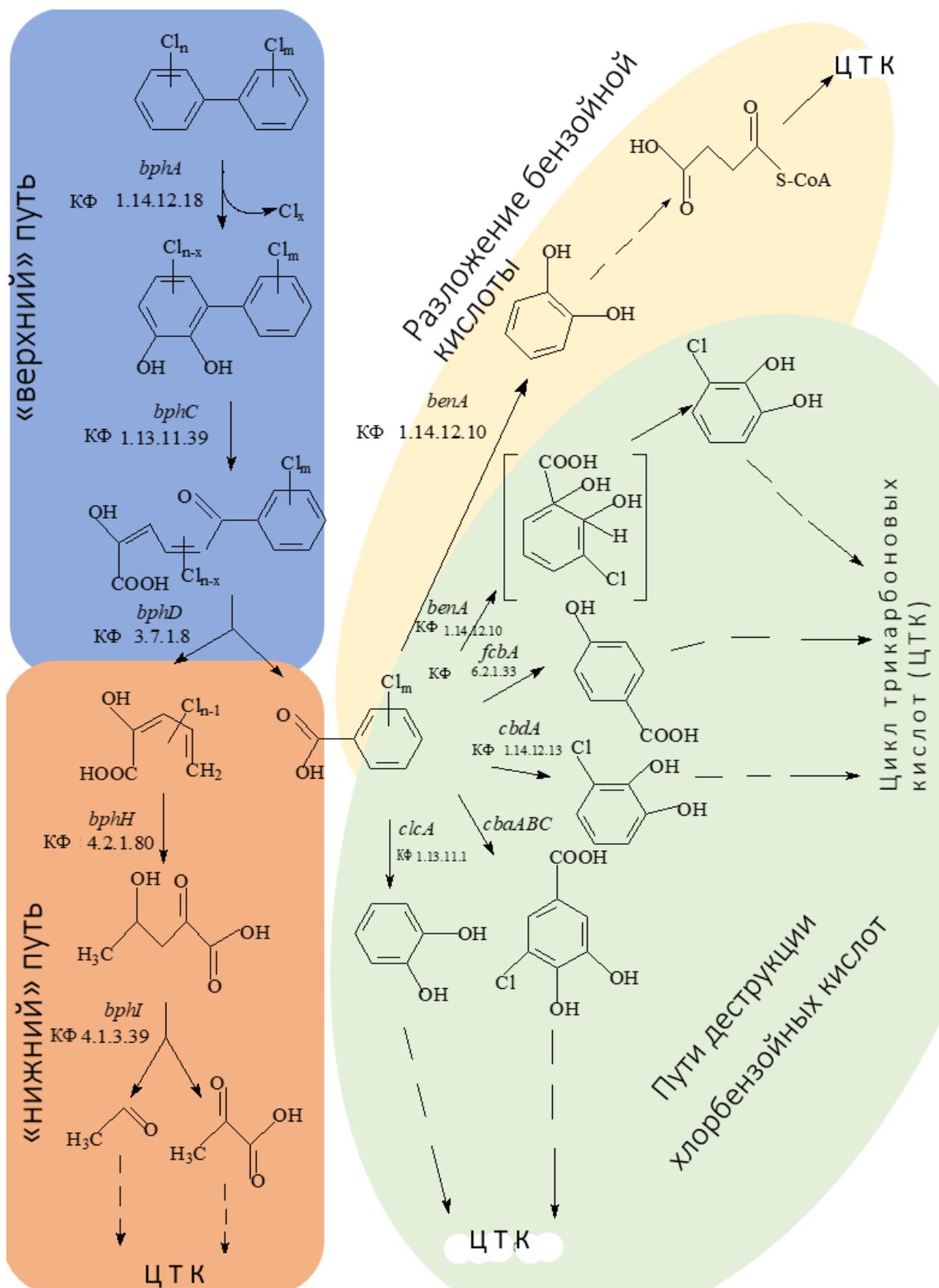


Рисунок 3 – Метаболический путь трансформации бифенила/ПХБ у аэробных бактерий

осуществляется под действием бифенил дегидрогеназы (BphB). В результате реакции дегидрирования углеродных атомов, у которых присоединены гидроксильные группы, образуется хлорированный 2,3-дигидроксибифенил. Далее дигидроксибифенил 2,3-диоксигеназа (BphC) осуществляет окисление дигидрокси(полихлор)бифенила по гидроксильному кольцу с образованием (хлор/гидрокси)-2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гексан-2,4-диеновых кислот (ГОФДК). Расщепление ГОФДК до (хлор)бензойных и (хлор)пентадиеновых кислот осуществляет фермент ГОФДК-гидролаза (BphD).

Выявлен ряд общих закономерностей при разложении ПХБ ферментами классического пути деструкции бифенила: бифенил диоксигеназа предпочтительнее окисляет кольцо в молекуле ПХБ с наименьшим количеством заместителей, скорость деструкции имеет обратно пропорциональную зависимость от степени хлорирования молекулы ПХБ, присутствие заместителей в *орто*-положении затрудняет взаимодействие субстрата с ферментом, что приводит к снижению эффективности бактериальной деструкции данных конгенов (Elangovan *et al.*, 2019).

1.3.2. Ключевые ферменты «верхнего» пути и их особенности

Причины существенных различий в биодеградативном потенциале штаммов-деструкторов ПХБ активно изучались на протяжении последних десятилетий. В результате проведенных исследований установлено, что субстратная специфичность зависит от особенностей строения ферментов «верхнего» пути, а также от структуры интермедиатов, образующихся в процессе метаболизма каждого конгенера ПХБ. Также было описано участие ферментов класса монооксигеназ в окислении ПХБ, не содержащих свободных от заместителей вицинальных углеродных атомов.

Бифенил диоксигеназа (BphA)

Ферментом первичной атаки ПХБ, а также ключевым ферментом, обуславливающим спектр трансформируемых конгенов, является бифенил

диоксигеназа (VrhA) (КФ 1.14.12.18) – мультикомпонентный фермент, состоящий из терминальной оксигеназы, ферредоксина и редуктазы. Каталитический центр располагается на терминальной оксигеназе, являющейся гетерогексамером ($\alpha\beta\beta$). α -Субъединица (VrhA1) характеризуется молекулярной массой 51 кДа, содержит каталитический домен (С-концевой домен), [2Fe–2S] кластер Риске (домен Риске/N-концевой домен) и негемовое железо (рисунок 4).

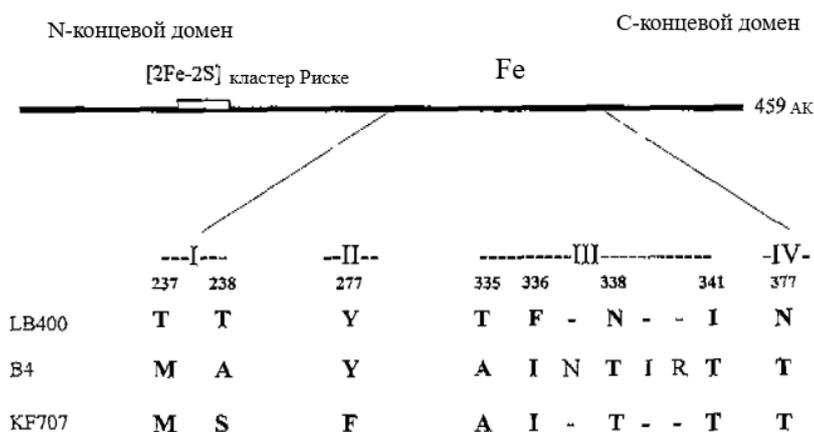


Рисунок 4 – Схема α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы и регионов, ответственных за распознавание субстрата (Rodarie, Jouanneau, 2001; Zielinski *et al.*, 2002; Шумкова, Плотникова, 2012)

Молекулярная масса β -субъединицы (VrhA2) составляет 22 кДа. По форме VrhA напоминает гриб, «ножку» которого формируют β -субъединицы, а «шляпку» - α -субъединицы. Передача электронов происходит от ферредоксинредуктазы (FAD-содержащая редуктаза, VrhA4) на ферредоксин (VrhA3), далее на домен Риске одной из α -субъединиц, и завершается передачей на каталитическое железо соседней α -субъединицы (Viger *et al.*, 2012; Sylvestre, 2013; Dhindwal *et al.*, 2016). В каталитическом домене происходит окисление молекулы бифенила/ПХБ, что приводит к внедрению гидроксигрупп по двум вицинальным атомам углерода. В случае, если один из атомов был замещен, процесс окисления сопровождается дехлорированием и количество хлор-заместителей снижается.

Первичная структура VrhA1 представлена в среднем 460 аминокислотными остатками. Вторичная структура N-концевого домена состоит из β -тяжей и петель, и включает кластер Риске; С-концевой домен представлен α -спиралями с располагающимся в каталитическом кармане моноклеарным железом. В третичной структуре α -субъединица близка к глобуле (рисунок 5) (Zielinski *et al.*, 2002; Ferraro *et al.*, 2007; Шумкова, Плотникова, 2012, Wang *et al.*, 2021).

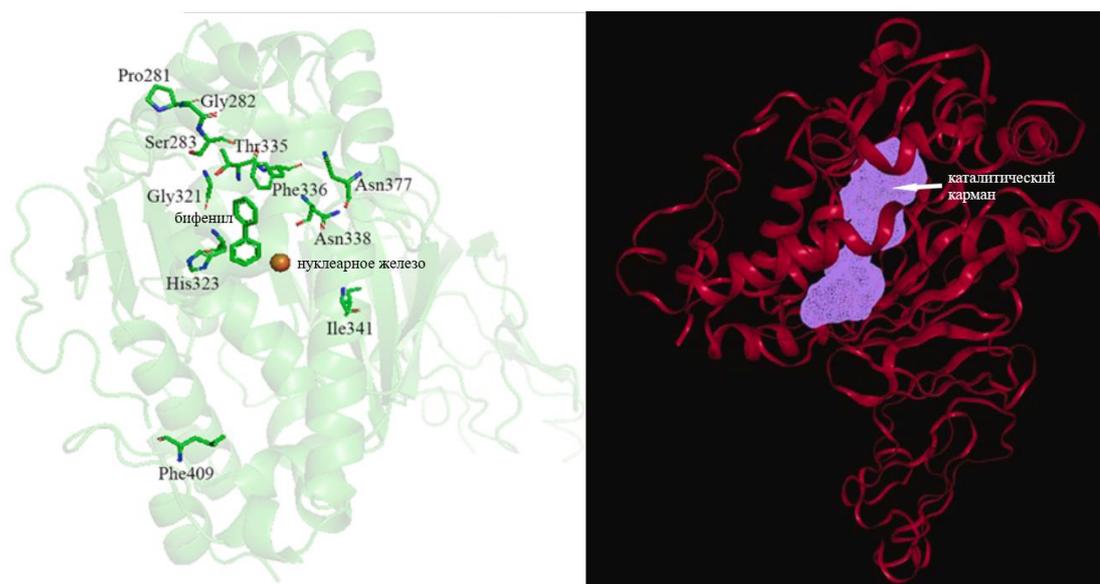


Рисунок 5 – 3D-структура α -субъединицы бифенил 2,3-ДО штамма *B. xenovorans* LB400 (Wang *et al.*, 2021)

Анализ многочисленных исследований показал, что субстратная специфичность VrhA в отношении конгенов ПХБ зависит от размера и конфигурации каталитического кармана (Wang *et al.*, 2021). Также установлено, что ряд аминокислот в I, II, III и IV областях С-концевой части VrhA1 участвуют в распознавании субстрата и региоспецифичности. VrhA известных штаммов-деструкторов *B. xenovorans* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707 и *Pseudomonas* sp. B4 отличаются аминокислотными остатками в положениях 237 и 238 (I область), 277 (II область), 335–341 (III область), 377 (IV область) (рисунок 4), что обуславливает более узкий спектр трансформируемых конгенов ПХБ

у штаммов KF707 и В4, чем у штамма LB400 (Mondello *et al.*, 1997; Suenaga *et al.*, 2001; Rodarie, Jouanneau, 2001; Barriault, Sylvestre, 2004; Vézina *et al.*, 2007). Применение методов квантовой и молекулярной механики показало, что существенное влияние на эффективность связывания VphA с незамещенным бифенилом оказывают Asp230, Gly335, Asn337, Thr338, Ile339, Arg34, находящиеся в активном центре α -субъединицы, а в случае связывания с 4,4'-дихлорбифенилом – Phe227, Ile336, Asn337, Ile339, Phe378, Arg340 (Zhu *et al.*, 2020).

Известно, что VphA_{LB400} окисляет (моно-гекса)-хлорированные бифенилы в положениях 2,3 и 3,4, за исключением 4,4'-дихлорбифенила (ПХБ 15), при этом активность фермента снижается в ряду незамещенное > орто- > мета- > пара-замещенное кольцо ПХБ (Erickson, Mondello, 1993; Haddock *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1995, 1999, 2001). Напротив, VphA_{KF707} окисляет ПХБ 15, но характеризуется узкой субстратной специфичностью. Показано, что α -субъединицы штаммов LB400 и KF707 имеют уровень сходства 95.6% (Kimura *et al.*, 1997). Замена аспарагиновой кислоты (Asn) на треонин (Thr-376) в активном центре VphA1 штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707 приводила к расширению диапазона окисляемых конгенов ПХБ (Suenaga *et al.*, 2006). Штаммы *C. testosteroni* В-356 и *Rhodococcus globerulus* Р6 предпочтительнее разлагали ПХБ, несущие заместители в мета-положении, и проявляли низкую активность к ди(орто)-хлорированным конгенам (McKay *et al.*, 1997; Hurtubise *et al.*, 1998). Уровень сходства VphA_{В-356} и VphA_{LB400} составлял 76% (Imbeault *et al.*, 2000). В результате 3D-моделирования установлено, что расположение 4,4'-диХБ в активном центре VphA_{В-356} относительно Fe более энергетически выгодно, чем 3,3'-диХБ и незамещенный бифенил, что приводит к его эффективной трансформации (Baig, Manickam, 2010).

Анализ деградационной активности химерных диоксигеназ, полученных в результате комбинирования α - и β -субъединиц штаммов *C. testosteroni* В-356, *R. globerulus* Р6 и *B. xenovorans* LB400, показал, что β -субъединицы

также оказывают влияние на спектр окисляемых конгенов ПХБ. Так, бифенил диоксигеназа $\alpha_{B-356}\beta_{LB400}$ не проявляла активность к 4,4'-диХБ, как и $BphA_{LB400}$, а бифенил ДО $\alpha_{P6}\beta_{LB400}$ – окисляла 2,2',5,5'-тетраХБ, несмотря на то что $BphA_{P6}$ не способна трансформировать данный конгенер ПХБ (Chebrou *et al.*, 1999; Hurtubise *et al.*, 1998).

Бифенил диоксигеназа штамма *A. eutrophus* H850 осуществляла диоксигенирование углеродных атомов в молекуле ПХБ в положениях 3,4 и 4,5 в случаях, если во втором кольце молекулы ПХБ заместители располагаются в положениях 2 и 6. Если заместители в атакуемом кольце находятся у 2 и 5 углеродных атомов, то окисление происходит по 3 и 4 положению, в остальных случаях гидроксильные группы встраиваются по 2 и 3 углеродным атомам (Bedard *et al.*, 1987). Таким образом, структура конгенера ПХБ также оказывает влияние на взаимодействие с $BphA$.

$BphA$ штамма *Castellaniella* sp. SPC4 осуществляет диоксигенирование 3,3',4,4'-тетрахлорбифенила по 2 и 3 углеродным атомам одного из колец, что приводит к образованию 2,3-дигидрокси-4,3',4'-трихлорбифенила, последующее разложение которого осуществляется по классическому «верхнему» пути трансформации ПХБ (Su *et al.*, 2019).

Влияние количества заместителей в молекуле ПХБ и их расположения на эффективность связывания с бифенил 2,3-диоксигеназой было подтверждено в экспериментах с $BphA1$ штамма *Enterobacter* sp. LY402 (Cao *et al.*, 2011). Экспериментально показано, что энергия сродства ПХБ коррелировала с константами скорости деградации конгенов ПХБ $BphA1_{LY402}$. В результате 3D-моделирования показано, что аминокислоты Ser283, Val287, Gly321 и Tyr384 в активном центре фермента характеризуются высокой вариабельностью и отвечают за связывание с молекулой ПХБ. Также установлено, что на эффективность деградации ПХБ бифенил 2,3-диоксигеназой оказывают влияние физические, электронные и геометрические характеристики каждого конгенера ПХБ.

В окислении ПХБ могут принимать участие диоксигеназы, относящиеся к семействам бифенил/толуол диоксигеназ (Б/Т ДО) и нафталин диоксигеназ (НДО). По структуре данные ферменты схожи с бифенил диоксигеназами: состоят из α - и β -субъединиц, содержат железо-серный кластер Рискке [2Fe-2S] и негемовое железо в активном центре, расположенном на α -субъединице (Жарикова и др., 2018; Gibson, Parales, 2000; Nam *et al.*, 2001; Pieper, 2005; Witzig *et al.*, 2006). Для ферментов семейства бифенил/толуол диоксигеназ известна способность к окислению толуола, бензола, хлорбензолов и бифенила (Pieper, 2005; Parales, Resnick, 2006; Jouanneau *et al.*, 2011). Описана способность нафталин диоксигеназы штамма *P. putida* G7 эффективно трансформировать хлорбифенилы (Barriault, Sylvestre, 1999). Диоксигеназы штаммов *Sphingomonas aromaticivorans* F199, *Bacillus* sp. JF8, *Rhodococcus* sp. R04 и *Rhodococcus* sp. K37 окисляли хлорбифенилы, при этом характеризовались высоким уровнем сходства с ферментами семейства нафталин диоксигеназ (Gibson, Parales, 2000; Mukerjee-Dhar *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Таким образом, в первичной атаке на молекулу ПХБ могут быть задействованы не только ферменты семейства бифенил ДО, но и близкие по строению ферменты семейств НДО и Б/Т ДО.

Бифенил дегидрогеназа (BphB)

Бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа (BphB) (КФ 1.3.1.56) относится к семейству короткоцепочечных NAD-зависимых дегидрогеназ/редуктаз. BphB катализирует вторую стадию трансформации ПХБ по «верхнему» пути в случае, если на первой стадии при окислении незамещенных атомов углерода в молекуле ПХБ образовался (хлор)бифенил-2,3-дигидродиол. На примере рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, не содержащего BphB, показано разложение низкохлорированных бифенилов до стадии ГОФДК и далее до ХБК, без участия бифенил дегидрогеназ, если BphA осуществляет окисление молекулы ПХБ с отщеплением атома хлора

(Bruhlmann, Chen, 1999). BphB является тетрамером ($M_r = 128$ кДа) и состоит из четырех идентичных субъединиц ($M_r = 31$ кДа), каждая из которых представлена 277 аминокислотными остатками. Максимальная каталитическая активность фермента проявляется при pH 8.5. Установлено, что в штаммах *Pseudomonas putida* OU83, *P. pseudoalcaligenes* KF707 и *B. xenovorans* LB400 присутствуют BphB с высоким уровнем гомологии (Khan *et al.*, 1997). BphB_{LB400} проявляла активность к дигидродиольным производным бифенила, в результате чего происходило образование 2,3,2',3'-тетрагидроксибифенила (Agulló *et al.*, 2019). Изучение структуры BphB_{LB400} с применением метода молекулярных замен показало, что (хлор)бифенил дигидродиолы связываются с гидрофобной щелью, расположенной вблизи NAD⁺, а Asn143 является ключевым фактором субстратной специфичности BphB_{LB400} (Furukawa, Fujihara, 2008). В результате изучения BphB штамма *Comamonas testosteroni* B-356 установлено, что функцию каталитического центра выполняют аминокислоты Ser142, Tyr155 и Lys159, при этом BphB B-356 характеризуется более высокой константой специфичности для NAD⁺ по отношению к NADP⁺ (Furukawa, Fujihara, 2008). Применение комбинированного подхода квантовой и молекулярной механики при изучении механизмов дегидрирования *цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидроксибифенила и *цис*-2,3-дигидро-2,3-дигидрокси-4,4'-дихлорбифенила BphB штамма *Pandoraea pnotomusa* B-356 выявило существенную роль не только Asn115, Ser142 и Lys149, но и Ile89, Asn143, Pro184, Met187, Thr189 и Lue191 (Zhang *et al.*, 2018).

Дигидроксибифенил диоксигеназа

Трансформацию молекулы дигидрокси(хлор)бифенила до (хлор)ГОФДК осуществляет дигидроксибифенил диоксигеназа (BphC) (КФ 1.13.11.39) в результате *мета*-расщепления гидроксильированного кольца молекулы ПХБ (рисунок 3). По строению BphC штамма *Pseudomonas* sp. KKS102 представляет октамер. Субъединицы BphC_{KKS102} содержат два

домена, каждый из которых состоит из двух последовательностей $\beta\alpha\beta\beta$ и 55 аминокислотных остатков, а в активном центре располагается Fe^{2+} , связанный координационными связями с His145, His209, Glu260 и двумя молекулами воды (Senda *et al.*, 1996).

Установлено, что ингибирование BphC может происходить как в результате образования продуктов расщепления 2'-хлорзамещенных 2,3-дигидроксибифенилов, так и под действием таких соединений как 3,4-дигидроксибифенилы, 2'-хлорзамещенные 2,3-дигидроксибифенилы, 3-хлоркатехол, ацетон и изопропанол (Vaillancourt *et al.*, 1998, 2002; Yang *et al.*, 2008; Agulló *et al.*, 2019).

Для многих штаммов-деструкторов описано присутствие в клетке нескольких экстрадиольных диоксигеназ. У штамма *Rhodococcus* sp. R04, активно разлагающего бифенил, выявлено два гена *bphC*, у штамма *R. globerulus* P6 – три *bphC*, а у штамма *R. erythropolis* TA421 – семь генов, кодирующих дигидроксибифенил диоксигеназу (Asturias *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2008).

ГОФДК-гидролаза

2-Гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (BphD) (КФ 3.7.1.8) катализирует конверсию (хлор)ГОФДК до (хлор)бензойной и пентадиеновой кислот, осуществляя разрыв С-С-связи между 6 и 7 углеродными атомами в молекуле (рисунок 3). ГОФДК-гидролаза входит в надсемейство α/β -гидролаз (Bhowmik *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2017, Agulló *et al.*, 2019). BphD_{LB400} по четвертичной структуре является гомотетрамером (молекулярная масса 122 кДа), состоящая из субъединиц, образованных 286 аминокислотными остатками каждая (Seah *et al.*, 1998). BphD_{RHA1} представляет собой гомооктамер (молекулярная масса 250 кДа), каждая субъединица которого состоит из 285 аминокислотных остатков. Молекула (хлор)ГОФДК располагается в активном центре BphD таким образом, что фенильная часть молекулы находится в гидрофобном участке, а диеноатная –

в гидрофильном. После взаимодействия ацил-ферментного комплекса с молекулой воды осуществляется разрыв ГОФДК, а образовавшиеся (хлор)бензойная и пентадиеновая кислоты диссоциируют (Nandhagopal *et al.*, 2001). Анализ сходства ГОФДК-гидролаз штаммов-деструкторов ПХБ выявил высокую степень различия. Так, аминокислотная последовательность VphD_{RHA1} только на 30% соответствует VphD_{LB400} и VphD_{P6}, которые в свою очередь сходны между собой лишь на 42% (Seah *et al.*, 2001).

В ряде случаев при разложении ПХБ наблюдается накопление промежуточного продукта, придающего среде желтое окрашивание. Данным продуктом являются хлорированные ГОФДК. Установлено, что в зависимости от расположения хлора в молекуле, у различных ГОФДК будет отличаться длина волны максимального светопоглощения, что активно используется при аналитических исследованиях (таблица 1).

Таблица 1 – Аналитические параметры хлорированных ГОФДК

ГОФДК	Длина волны ($\lambda_{\text{макс}}$), нм	Коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$	ГОФДК	Длина волны ($\lambda_{\text{макс}}$), нм	Коэффициент экстинкции, $\text{мМ}^{-1} \text{см}^{-1}$
Без Cl-	433* / 434**	11.3*/25.7**	10Cl-	–/438	–/26.3
3-Cl-	392 / 432	17.3 / 40.6	9,11 – диCl-	438 / –	19.6 / –
4-Cl-	410 / 409.5	20.0 / 26.8	4,9 – диCl-	414 / –	20.9 / –
5Cl-	– / 402	–/40.1	8,12 – диCl-	392 / –	36.5 / –
8Cl-	382 / 393	28.1 / 40.3	3,9,11 – триCl-	438 / –	24.2 / –
9Cl-	436 / 436	17.5 / 28.2			

* значения приведены по Fortin *et al.*, 2005, ** значения приведены по Seah *et al.*, 2000

Накопление (хлор)ГОФДК происходит из-за различий в активности ГОФДК-гидролазы. Показано, что VphD_{LB400} и VphD_{P6} активно разлагают ГОФДК, несущих атомы хлора в фенольной части молекулы (заместители у 8, 9, 10 углеродных атомов), но проявляют низкую гидролазную активность

к ГОФДК, хлорированным в диеноатной части молекулы (положения хлора у 3, 4 и 5 углеродных атомов). Однако имеются различия в активности данных ферментов к отдельным изомерам ГОФДК:

1) $VphD_{P6}$ гидролизует 9-Cl- и 10-Cl-ГОФДК в два раза быстрее, чем $VphD_{LB400}$;

2) $VphD_{LB400}$ осуществляет деструкцию 5-Cl-и 8-Cl-ГОФДК в пять раз активнее, чем $VphD_{P6}$;

3) для $VphD_{P6}$ 4-Cl ГОФДК является более сильным ингибитором, чем 3-Cl ГОФДК, тогда как для $VphD_{LB400}$ наблюдается обратная закономерность;

4) при инкубации штамма LB400 с 4,4'-диХБ или 2,4,4'-триХБ образуется 3,10-диCl ГОФДК, тогда как штамм P6 трансформирует данные изомеры ПХБ до 3,10-диCl и 3,8,10-триCl ГОФДК, соответственно.

Интересно отметить, что $VphD_{P6}$ не гидролизует 3-Cl- и 4-Cl-ГОФДК, однако, конечным продуктом трансформации 3,10-диCl и 4,9-диCl ГОФДК являются 3- и 4-хлорбензойные кислоты. Высказано предположение, что в штамме *R. globerulus* P6 присутствует несколько изофункциональных ГОФДК гидролаз, а также допускается, что присутствие заместителей в 9 и 10 положении в дихлорированных ГОФДК увеличивает афинность фермента к данным изомерам (Seah *et al.*, 2000, 2001).

Таким образом, ГОФДК-гидролаза также является ключевым ферментом «верхнего» пути трансформации ПХБ до менее токсичных продуктов.

Моноксигеназы

В последнее десятилетие появились сообщения, что в окислении полихлорированных бифенилов и их метаболитов у бактерий могут участвовать цитохром P450 монооксигеназы (КФ 1.14.14.1) (Luo *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Goto *et al.*, 2018). В результате действия монооксигеназ образуются моногидроксилированные производные ПХБ (рисунок 6).

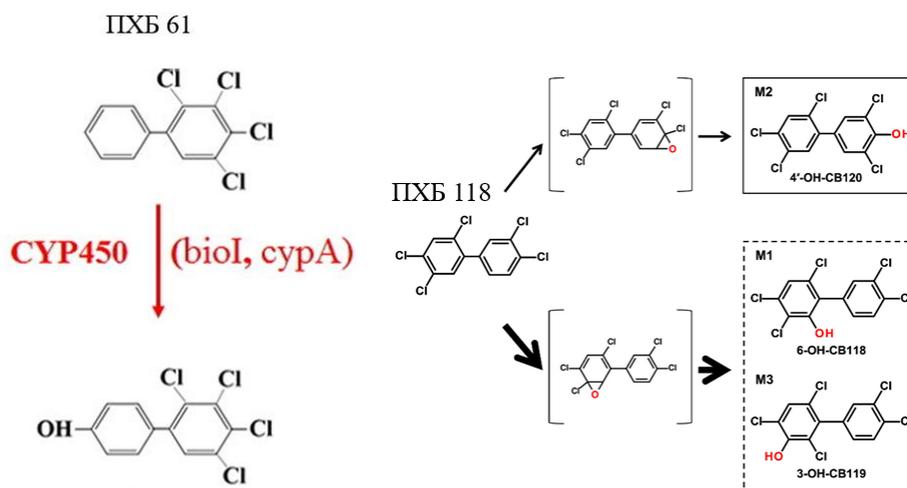


Рисунок 6 – Окисление ПХБ под действием монооксигеназ у бактерий (Goto *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018)

В работе (Luo *et al.*, 2016) описана цитохром P450 монооксигеназа штамма *Rhodococcus* sp. P14, проявляющая активность к широкому спектру ароматических соединений. Установлено, что данный фермент осуществляет окисление незамещенного бифенила, что приводит к образованию моногидроксилированного бифенила. Показано, что штамм *Bacillus subtilis* NCIB-3610 осуществляет окисление тетрахлорированного бифенила (ПХБ 61), несущего заместителей в одном кольце молекулы не по классическому «верхнему» пути, а при участии цитохром P450 монооксигеназы, кодируемой генами *bioI* и *cypA* (Sun *et al.*, 2018). В результате монооксигенирования образует 4-гидрокси-2',3',4',5'-тетрахлорбифенил (рисунок 6). Цитохром P450 монооксигеназа, выделенная из почвенного штамма *Bacillus megaterium* VM3, осуществляет окисление ПХБ 118 (расположение заместителей в обоих кольцах в соотношении {3+2}) (рисунок 6). Экспериментально подтверждено, что в результате монооксигенирования 3,4,2',4',5'-пентахлорбифенила (ПХБ 118) происходит образование 4-гидрокси-3,5,2',4',5'-пентахлорбифенила (Goto *et al.*, 2018). Также в работе предположено, что в результате действия P450_{VM3} могут формироваться моногидрокси-пентахлорбифенилы с расположением

гидроксильной группы по 3-му или 6-му атомам углерода более замещенного кольца ПХБ 118. Однако остается неясным дальнейший метаболический путь моногидроксипроизводных, которые образуются при монооксигеназной атаке конгенов ПХБ.

1.3.3. Метаболические пути разложения основных продуктов бактериальной трансформации бифенила/ПХБ

Основными метаболитами бактериальной аэробной деструкции ПХБ являются бензойная и хлорбензойные кислоты. Биохимическая трансформация данных соединений обусловлена действием ферментных комплексов, не связанных с ферментами окисления бифенила/ПХБ. Большинство штаммов, проявляющих активность к ПХБ, не способны разлагать бензойную и хлорбензойные кислоты.

Особенности разложения бензойной кислоты аэробными микроорганизмами подробно исследованы (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Основным ферментом деструкции является бензоат диоксигеназа, принадлежащая семейству бензоат диоксигеназ. Ферменты данного семейства являются двухкомпонентными и состоят из редуктазы и терминальной диоксигеназы. Каталитический центр фермента располагается на α -субъединице терминальной диоксигеназы. В результате диоксигенирования молекулы бензоата образуется катехол. Типичные бензоат диоксигеназы описаны на примере штаммов *Acinetobacter* sp. ADP1197, *P. putida* mt-2132 и *Rhodococcus* sp. 19070 (Field, Sierra-Alvarez, 2008). Также описаны гены, кодирующие данный фермент, у штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (Kitagawa *et al.*, 2001).

Анализ метаболических путей хлорбензойных кислот у выделенных и описанных аэробных штаммов-деструкторов показал, что за начальные пути трансформации отвечают различные ферментные системы. Ключевой реакцией разложения ХБК является реакция отщепления хлора от молекулы,

что приводит к повышению биодоступности. Дегалогенирование может осуществляться как до расщепления ароматического кольца, так и после.

Описаны три механизма дегалогенирования ХБК на первой стадии метаболизма (рисунок 7):

1) при реакции гидролитического дегалогенирования под действием гидролаз осуществляется замена атома хлора на гидроксильную группу. Такой механизм описан для аэробного бактериального разложения всех моноклорированных бензойных кислот штаммами родов *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* (Зайцев, Карасевич, 1981; Keil *et al.*, 1981; Muller *et al.*, 1984, 1988; Löffler, Muller, 1991; Löffler *et al.*, 1991; Copley, Crooks, 1992; Chang *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Benning *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2017);

2) реакции окислительного дегалогенирования обусловлены внедрением гидроксильной группы по углеродному атому, замещенному атомом хлора, под действием диоксигеназ. Наиболее подробно окислительное дегалогенирование описано на примере штаммов рода *Pseudomonas*, разлагающих 2-хлорбензойную кислоту (Романов и др., 1993; Fetzner, Lingens, 1994; Romanov, Hausinger, 1994; Fetzner, 1998; Xu *et al.*, 2017);

3) восстановительное дегалогенирование характерно для анаэробных бактерий и впервые описано на примере метаногенного консорциума, осуществлявшего восстановление 3-хлорбензойной кислоты. Однако известно, что штамм *Alcaligenes denitrificans* NTB-1 осуществляет восстановительное дегалогенирование 2,4-дихлорбензойной кислоты до 4-хлорбензойной, которая далее окисляется до 4-гидроксibenзойной кислоты (Mohn, Tiedje, 1992; Romanov, Hausinger, 1996; Valleys *et al.*, 1997; Fantroussi *et al.*, 1997; Genthner *et al.*, 1997; Haggblom, Young, 1999; Krasotkina *et al.*, 2001).

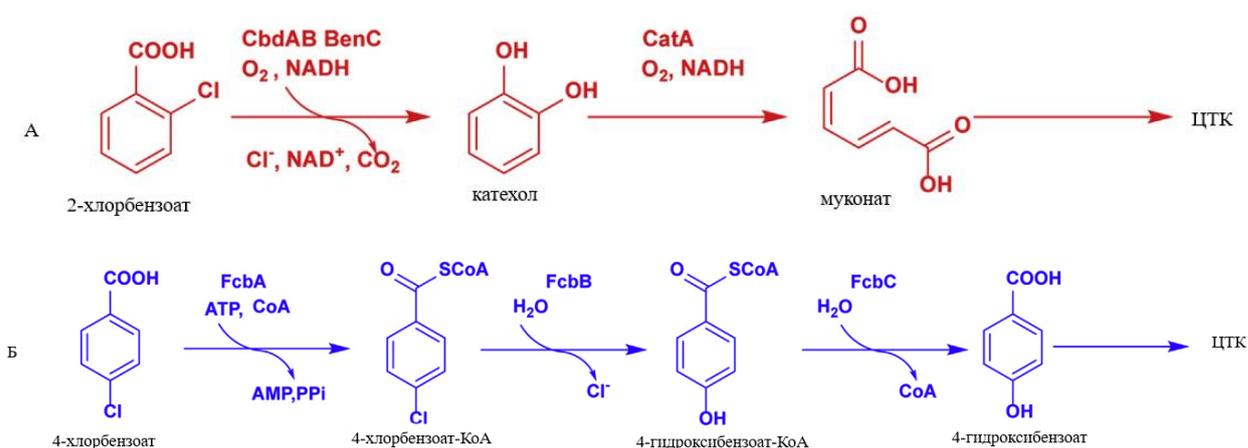


Рисунок 7 – Отщепление атома хлора на первых этапах метаболизма в результате окислительного (А) и гидролитического (Б) дегалогенирования (Xu *et al.*, 2017)

В результате гидролитического и окислительного дегалогенирования хлорбензойные кислоты трансформируются до стадии образования катехола, дальнейшее разложение которого происходит под действием ферментов *орто*-пути до соединений цикла Кребса. Основными ферментами данного пути являются катехол 1,2-диоксигеназа и муконат циклоизомераза или катехол 2,3-диоксигеназа (рисунок 8) (Дуган, Головлева, 1985; Blanco *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1999; Zaar *et al.*, 2001; Gascher *et al.*, 2002; van Duuren *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017).

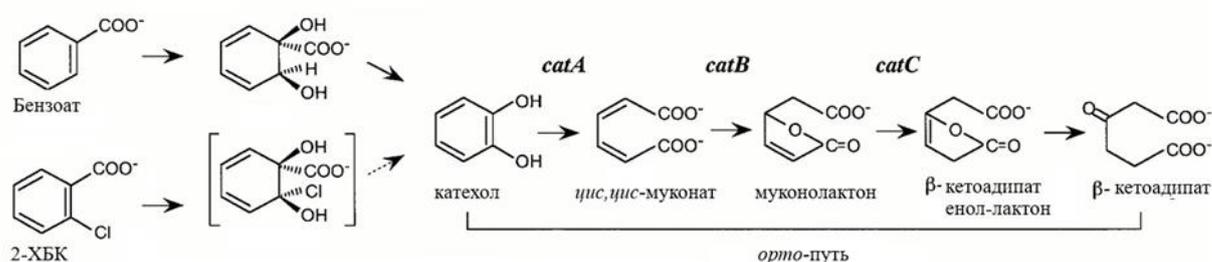


Рисунок 8 – Метаболический путь разложения бензойной и 2-хлорбензойной кислоты через стадию образования катехола (Francisco Jr *et al.*, 2001, van Duuren *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2017)

В случае, когда отщепления хлора на первой стадии не происходит, первыми метаболитами ХБК у аэробных бактерий являются хлоркатехолы

(рисунок 9). Известно, что у штаммов родов *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Stenotrophomonas* окисление молекулы хлорбензойных кислот может происходить под действием бензоат 1,2-диоксигеназы (Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017). В результате гидроксирования по 1 и 2 углеродным атомам ароматического цикла молекулы хлорбензойной кислоты образуются 3-хлор- или 4-хлоркатехолы. Аналогичный путь деструкции монохлорированных бензойных кислот описан для штамма *Burkholderia* sp. NK8 (Francisco Jr *et al.*, 2001). Однако окисление молекулы ХБК происходит под действием ферментов, кодируемых генами *cbeABCD*.

Разложение хлорированных катехолов происходит по модифицированному *орто*-пути (рисунок 9) (Reineke, 1988; Haggblum, 1990; Briganti *et al.*, 1998; Vollmer *et al.*, 1999; Potrawfke *et al.*, 2001; Kaschabek *et al.*, 2002; Lemmli *et al.*, 2002; Moiseeva *et al.*, 2002; Solyanikova *et al.*, 2003).

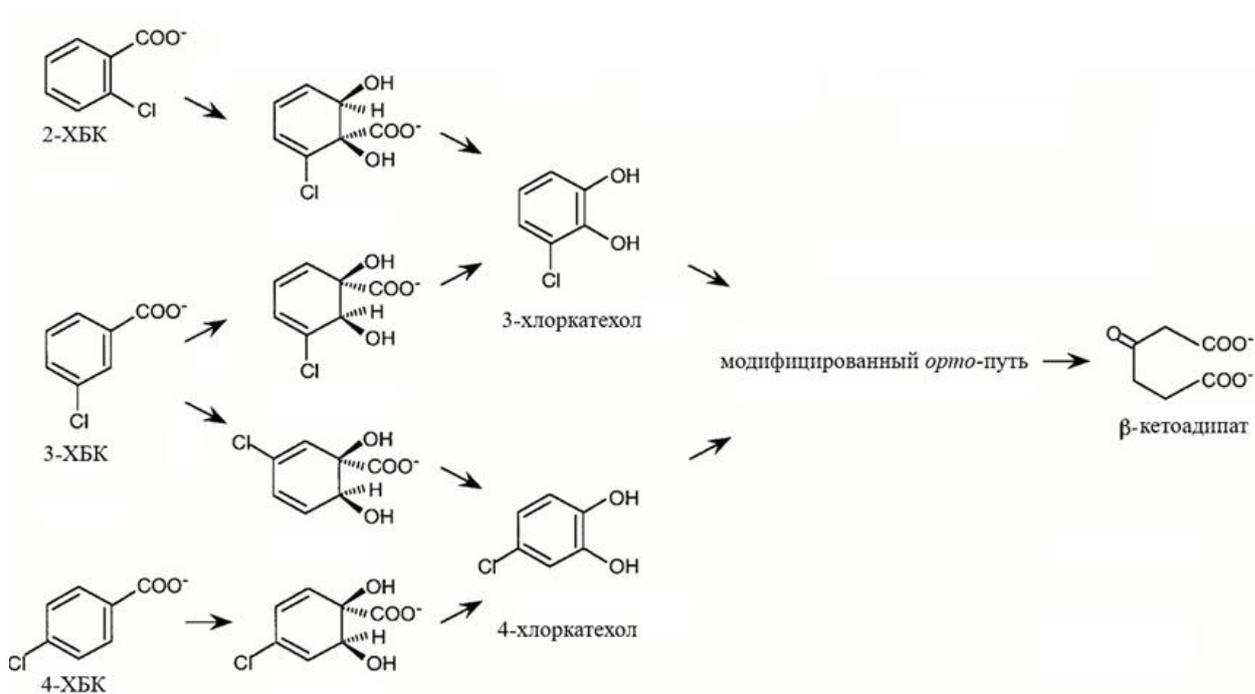


Рисунок 9 – Разложение хлорбензойных кислот аэробными бактериями через стадию образования хлоркатехола (Francisco Jr *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2017; Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008)

Однако описаны штаммы рода *Pseudomonas*, у которых обнаружена активность ферментов *орто*- и *мета*-пути при трансформации 3-хлорбензойной кислоты (FranckMokross, Schmidt, 1998). В процессе разложения хлоркатехолов происходит их окисление под действием хлоркатехол диоксигеназ до соответствующих хлорзамещенных *цис,цис*-муконовых кислот. Дальнейшая трансформация осуществляется в результате последовательного действия хлормуконат циклоизомеразы, хлормуконолактон дегалогеназы, диенлактон гидролазы и малеилацетат редуктазы. В результате конечным продуктом разложения хлоркатехолов является 3-оксоадипиновая кислота, которая включается в основной метаболизм клетки.

Таким образом, для штаммов-деструкторов, осуществляющих разложение ХБК, характерен комплекс ферментных систем, различающихся своей субстратной специфичностью.

1.3.4. Организация генетических систем деструкции ПХБ у аэробных бактерий

Развитие новых технологий анализа генетических структур бактерий наряду с применением классических молекулярных методов позволило получить обширные данные по организации геномов в целом и отдельных оперонов у штаммов-деструкторов. Результаты, полученные с применением методов высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS), подтвердили полученные ранее данные о том, что опероны генов, ответственных за разложение бифенила/ПХБ и (хлор)бензойных кислот могут располагаться как на хромосоме, так и в составе плазмид (Chaundhry, Chapalamadugu, 1991; Shuttleworth et al., 2000; Bhatt *et al.*, 2021). Основной чертой плазмид биodeградации (D-плазмиды) является их большая молекулярная масса (50–110 т.п.н.), при этом они могут быть как кольцевой, так и линейной формы (Don, Pemberton, 1981; Vandeberg *et al.*, 1981; Zaitsev *et*

al., 1991; Romine *et al.*, 1999; Tan, 1999; Shimizu *et al.*, 2001; Dennis, 2005; Nagata *et al.*, 2010; Willetts, 2019).

Геномы известных штаммов-деструкторов ПХБ

Анализ литературных данных и информации, размещенной в международной базе GenBank, позволил выявить штаммы-деструкторы бифенила/ПХБ, для которых получены полногеномные последовательности. Геномы двух наиболее изученных деструкторов ПХБ *R. jostii* RHA1 и *B. xenovorans* LB400 близки по размеру и составляют 9.72711 Mb и 9.71704 Mb, соответственно. Интересно отметить, что геном *R. jostii* RHA1 представлен хромосомой (7.8 Mb, GenBank CP000431.1) и тремя линейными плазмидами: pRHL1 (1.12 Mb, GenBank CP000432.1), pRHL2 (0.44 Mb, GenBank CP000433.1), pRHL3 (0.33 Mb, GenBank CP000434.1) (McLeod *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2010). В геноме *B. xenovorans* LB400 описаны хромосома I – 4.9 Mb (GenBank CP000270.1), хромосома II – 3.36 Mb (GenBank CP000271.1) и хромосома III – 1.47 Mb (GenBank CP000272.1) (Chain *et al.*, 2006; Daligault *et al.*, 2014). Размеры геномов других штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ находятся в диапазоне 3.4–7.5 Mb (Triscari-Barberi *et al.*, 2012; Ohtsubo *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2013; Vilo *et al.*, 2014; Shintani *et al.*, 2014; Fukuda *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015; Hirose *et al.*, 2015, 2019; Shumkova *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018; Ridl *et al.*, 2018; Vergani *et al.*, 2019).

Помимо *R. jostii* RHA1 плазмиды описаны в геномах штаммов *Pseudomonas putida* KF715, *Pseudomonas furukawaii* KF707, *Geobacillus* sp. JF8 и *Comamonas testosteroni* YAZ2 (GenBank PRJDB11572, дата регистрации 10.08.2021) (Triscari-Barberi *et al.*, 2012, Shintani *et al.*, 2014; Suenaga *et al.*, 2017, Kimura *et al.*, 2018). Для штаммов *P. furukawaii* KF707, *C. testosteroni* YAZ2 и *Geobacillus* sp. JF8 характерно наличие одной плазмиды, размером 60 т.п.н. (GenBank AP014863.1), 87 т.п.н. (GenBank AP024827.1) и 40 т.п.н. (GenBank CP006255.1), соответственно. Наибольшее количество D-плазмид

в геноме одного штамма представлено у *P. putida* KF715 (Suenaga *et al.*, 2017): плаزمида pKF715A (480 т.п.н., GenBank AP015030.1), плазмида pKF715B (280 т.п.н., GenBank AP015031.1), плазмида pKF715C (90 т.п.н., GenBank AP015032.1), плазмида pKF715D (30 т.п.н., GenBank AP015033.1).

Геномы штаммов *Comamonas testosteroni* ТК102 (= *Pseudomonas testosteroni* ТК102), *Pseudomonas alcaliphila* JAB1 и *Acidovorax* sp. KKS102 (= *Pseudomonas* sp. KKS102) представлены хромосомой и не содержат плазмид (Ohtsubo *et al.*, 2012; Fukuda *et al.*, 2014; Ridl *et al.*, 2018).

В GenBank находятся данные о полногеномных последовательностях штаммов *Burkholderia* sp. SK-3 (= *Cupriavidus* sp. SK-3), *Cupriavidus* sp. SK-4, *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, *Comamonas testosteroni* KF712 (= *Pseudomonas testosteroni* KF712), *Rhodococcus ruber* P25 и *Dyella ginsengisoli* LA-4 в виде комплекса контигов (фрагментов генома) (Kong *et al.*, 2013; Vilo *et al.*, 2014; Shumkova *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2015; Hirose *et al.*, 2015, 2019). Имеющиеся данные не позволяют однозначно утверждать присутствуют ли в геномах данных штаммов плазмидные элементы.

Организация *bph*-генов у активных штаммов-деструкторов ПХБ

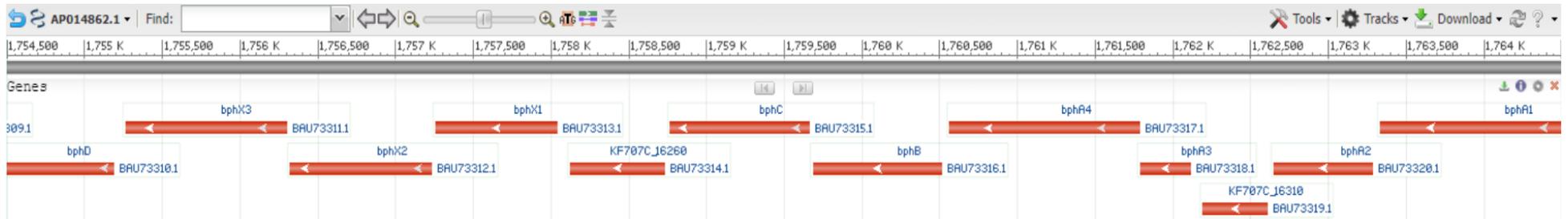
bph-Гены штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ организованы в кластеры, которые располагаются как на хромосоме, так и на плазмидах. Порядок расположения генов отличается у разных штаммов (рисунки 10, 11).

Анализ полногеномных последовательностей штаммов *B. xenovorans* LB400 и *P. furukawaii* KF707, а также данные, полученные в результате клонирования, показали, что *bph*-гены у данных штаммов расположены на хромосоме в идентичной последовательности: *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 8). Гены бифенил диоксигеназы расположены перед остальными генами деструкции бифенила.

Burkholderia xenovorans LB400 (хромосома 3)



Pseudomonas furukawaii KF707



Acidovorax sp. KKS102

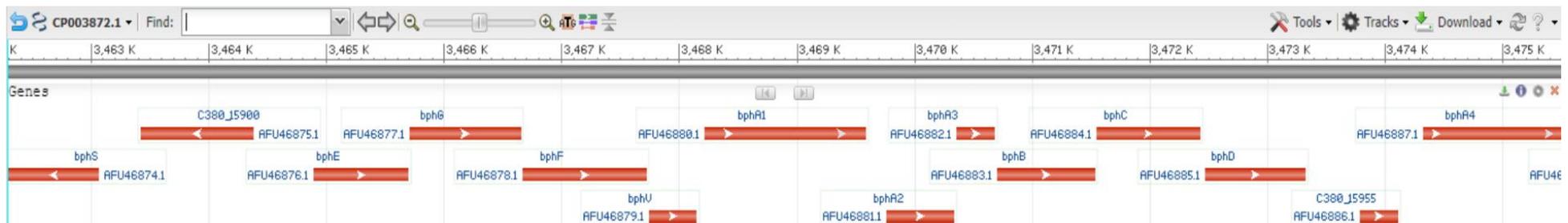
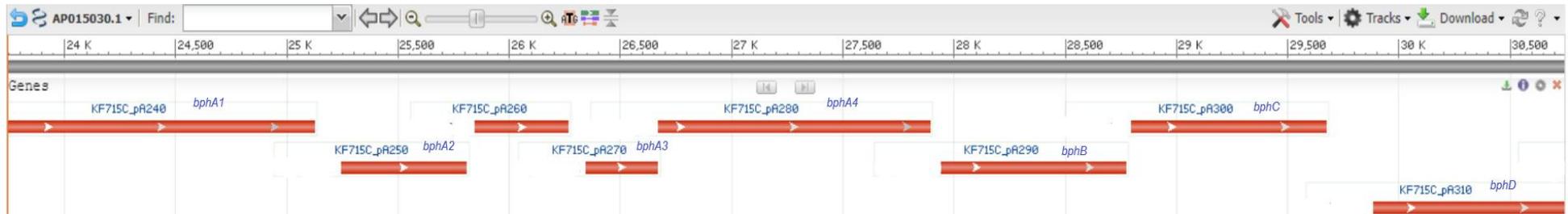
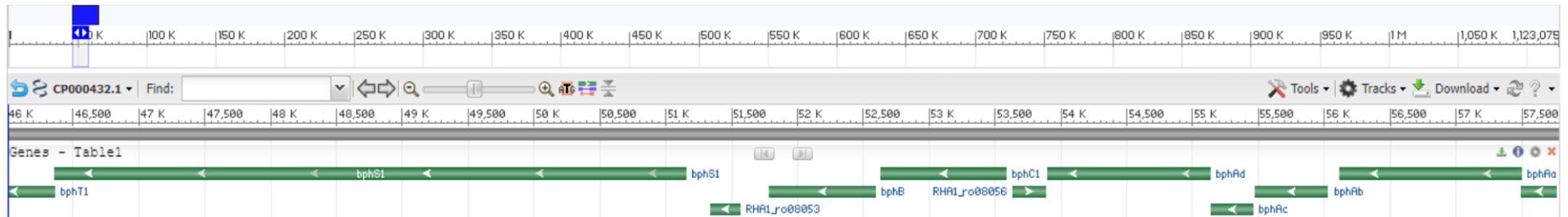


Рисунок 10 – *bph*-Опероны активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ, локализованные на хромосоме (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Pseudomonas putida KF715, pKF715A



Rhodococcus jostii RHA1, pRHL1



Rhodococcus jostii RHA1, pRHL2

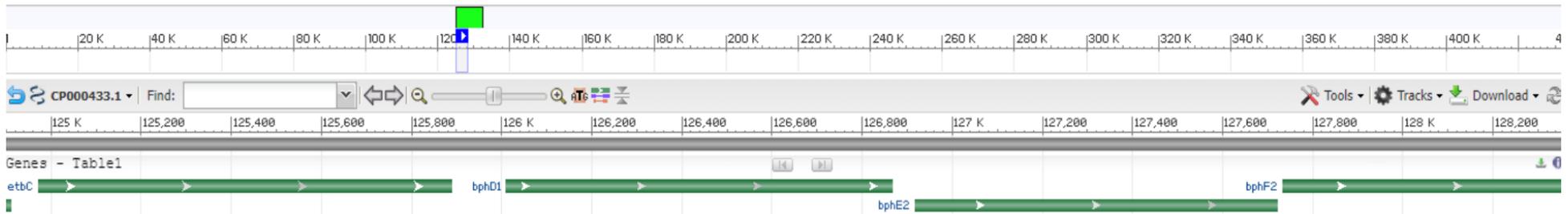


Рисунок 11 – *bph*-Опероны активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ, локализованные на плаزمидах (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Гены, кодирующие α и β субъединицы терминальной диоксигеназы (*bphA1* и *bphA2*), расположены перед геном ферредоксина (*bphA3*), за которым расположен ген ферредоксин редуктазы (*bphA4*). После генов бифенил диоксигеназы расположены гены, кодирующие бифенил-дигидродиол-дегидрогеназу (*bphB*), и 2,3-дигидроксибифенил диоксигеназу (*bphC*). Особенностью строения *bph*-оперона штаммов LB400 и KF707 является расположение генов «нижнего» пути деструкции бифенила/ПХБ (*bphK – bphH – bphJ – bphI*) между генами *bphC* и *bphD*, входящими в «верхний» путь деструкции бифенила/ПХБ (рисунки 2, 8). (Reineke, 1998; Watanabe *et al.*, 2000; Beltrametti *et al.*, 2001). Аналогичное расположение *bph*-генов описано для штамма *Ralstonia eutropha* H850 (Bedard *et al.*, 1987; Nishi *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2002).

На хромосоме штамма *Acidovorax* sp. KKS102 располагается *bph*-оперон, состоящий из 12 генов, при этом порядок расположения генов существенно отличается от описанного для штаммов *B. xenovorans* LB400 и *P. furukawaii* KF707 (рисунок 10): *bphE – bphG – bphF – bphA1 – bphA2 – bphA3 – bphB – bphC – bphD – bphA4*. Следует отметить, что гены, кодирующие ферменты «нижнего *bph*-пути»: *bphE – bphG – bphF*, расположены перед генами, кодирующими ферменты «верхнего» пути деструкции бифенила/ПХБ. Также установлено, что ген, кодирующий 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, 2012; Pieper, 2005) (рисунок 8). Подобное расположение *bph*-генов описано для штамма *Wautersia oxalatica* A5 (Merlin *et al.*, 1997).

Плазмидная локализация *bph*-оперонов выявлена у штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ *P. putida* KF715 и *R. jostii* RHA1 (рисунок 11).

Анализ последовательности *bph*-генов в плазмиде рKF715А штамма *P. putida* KF715 выявил делецию в области генов, кодирующих ферменты «нижнего» пути разложения бифенила, относительно последовательности *bph*-оперонов штаммов *B. xenovorans* LB400 и *P. furukawaii* KF707. Перед генами *bphEGF* расположен ген *bphS*, продукт которого осуществляет регуляцию *bph*-генов штамма *P. putida* KF715 (Ohtsubo *et al.*, 2001).

Гены деструкции бифенила штамма *R. jostii* RHA1 расположены на двух плаزمидах (рисунок 11). На плазмиде рRHL1 локализованы гены «верхнего» пути деградации бифенила: *bphA1* – *bphA2* – *bphA3* – *bphA4* – *bphC* – *bphB*. На плазмиде рRHL2 локализованы гены «нижнего» пути, а также гены *bphB* и *bphD*, являющиеся компонентами «верхнего» пути деструкции бифенила/ПХБ, в последовательности *bphD* – *bphE* – *bphF*, ген *bphB* не входит в единый кластер с указанными генами. Также следует отметить, что гены «нижнего» *bph*-пути (*BphE*, *BphG* и *BphF*) представлены как на плазмиде рRHL1, так и на рRHL2. Интересно отметить, что последовательность генов *bphA1A2A3A4-bphC-bphB* штамма RHA1 отличается от последовательности *bph*-генов двух других штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ рода *Rhodococcus*. Так, у штамма *Rhodococcus* sp. M5 *bph*-гены имеют расположение *bphC-bphB-bphA-bphD-bphE*, а у штамма *Rhodococcus* sp. TA421 – *bphA-bphB-bphC*. При этом у всех трех штаммов после генов, кодирующих ферменты деструкции бифенила/ПХБ, расположены гены *bphS-bphT*, кодирующие белки двухкомпонентной сигнальной системы, осуществляющей регуляцию *bph*-оперона (Labbe *et al.*, 1997; Simizu *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2004).

Иное расположение *bph*-генов описано для штамма *Rhodococcus* sp. R04. В международной базе GenBank представлен набор фрагментов, содержащих полногеномную последовательность данного штамма (номер GenBank PRJNA63847). Показано, что *bph*-гены располагаются в следующем порядке: *bphB-bphC-IR1-bphA1-bphA2-IR2-bphA3-IR3-bphA4-bphD*, где *IR* – некодирующие участки нуклеотидной последовательности (Yang *et al.*, 2011).

Рассматривая генетическую организацию *bph*-генов, стоит отметить, что в клетках штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ могут присутствовать изофункциональные гены. Наиболее изученным является штамм *R. jostii* RHA1, в геноме которого представлены три кластера, контролирующие гидрокселирующие диоксигеназы с разной субстратной специфичностью (*bphAaAbAcAd*, *etbAa1Ab1C*, *etbAa2Ab2AcD2*), семь последовательностей гомологичных *bphC*, три гомолога *bphD* и по два гомолога *bphE* и *bphF* (Goncales *et al.*, 2006; Iwasaki *et al.*, 2006; McLeod *et al.*, 2006). Также изофункциональные гены (три гена *bphC*) выявлены в геноме штамма *R. globerulus* P6 (Asturias *et al.*, 1994). Вероятно, наличие изофункциональных генов, и, соответственно, изофункциональных ферментов, обуславливает высокий деградационный потенциал штаммов в отношении смесей сходных по химической структуре веществ (Asturias *et al.*, 1994).

Анализ аминокислотной последовательности продуктов *bph*-генов штаммов *R. jostii* RHA1 и *Rhodococcus* sp. M5 выявил, что они на 49–79 % схожи с *tod*-генами (деструкция толуола) штамма *Pseudomonas putida* F1, и только на 30–65 % с *bph*-генами штаммов рода *Pseudomonas* (штаммы KF707 и KKS102). Уровень гомологии между генами *bphABC*_{RHA1} и *bphABC*_{M5} составляет 57–74 %. Обнаружены идентичные участки генов *bphB* и *bphC* у штаммов *Rhodococcus* sp. P6 и *Rhodococcus* sp. M5 (Masai *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1995). Yamada с коллегами показали, что *bphD* грамтрицательных штаммов образуют единое подсемейство, тогда как гены, кодирующие ГОФДК-гидроксилазу штаммов M5 и RHA1, значительно отличаются от них (Yamada *et al.*, 1998). Таким образом, гены биодегradации бифенила штаммов рода *Rhodococcus* значительно отличаются от *bph*-генов грамтрицательных штаммов-деструкторов.

Рядом авторов высказано предположение, что ключевую роль в распространении генов биодегradации среди бактериальных штаммов играют линейные плазмиды. Данное предположение базируется на результатах о переносе плазмиды pRHL2 в штаммы, лишённые *bph*-генов,

что приводило к возникновению бифенил-положительного фенотипа. Также в нуклеотидных последовательностях хромосомы и плазмид штамма *R. jostii* RNA1 выявлены инвертированные повторы, содержащие GCTXCGC-последовательность (Shimizu *et al.*, 2001). Показана возможность горизонтального переноса D-плазмиды pDK2 (молекулярная масса 220 т.п.н.) штамма *Rhodococcus* sp. DK17 (Shimizu *et al.*, 2001).

Кроме плазмид в распространении *bph*-генов участвуют транспозоны. Отмечено, что у ряда штаммов гены деградации бифенила/ПХБ находятся в окружении генов, кодирующих транспозазу. Так, кластеры *bph*- и *sal*-генов в штамме *P. putida* KF715 включены в транспозон с молекулярной массой 90 т.п.н. (Tan, 1999). Подробно изучен транспозон *Tn4371*, обнаруженный в хромосоме штамма *Ralstonia eutropha* A5 (Springael *et al.*, 1993). *Tn4371* – сложный транспозон с молекулярной массой 55 т.п.н, распространенный, в основном, среди штаммов группы β протеобактерий. В правой части данного транспозона локализованы *bph*-гены, расположенные в следующем порядке *bphEGFbphA1A2A3BCDA4* (Merlin *et al.*, 1997). Нуклеотидная последовательность данных генов на 94 % идентична *bph*-генам штамма *Acidovorax* sp. KKS102 (Springael *et al.*, 2001). Эксперименты по гибридизации различных участков *Tn4371* и ДНК из трех *Bph*⁺ трансконъюгантных штаммов показали, что *bph*-гены являются самостоятельным мобильным элементом. *Tn-bph* обладает собственной эксцизионно-интеграционной системой и способен к самостоятельному конъюгационному переносу, независимо от большого элемента (Merlin *et al.*, 1999).

bph-Гены, входящие в состав транспозона *Tn4371*, организованы в оперон, транскрипция которого начинается с σ^{70} -зависимого промотора. В результате анализа нуклеотидной последовательности *bph*-оперона *Tn4371* выше *bphE* идентифицирован регуляторный ген *bphS*, ниже *bphA4* – ген *bphR*. Делеция *bphR* не оказывала влияния на транскрипцию *bph*-оперона. Инактивация *bphS* приводит к конститутивной экспрессии генов,

ответственных за окисление молекулы бифенила. Сравнение аминокислотной последовательности BphS и ORF0 показало, что данные белки идентичны на 58 %. При этом BphS содержит в N-терминальной области последовательность, характерную для GntR-регуляторных белков. Анализ активности BphC в рекомбинантных штаммах, несущих плазмиды с клонированными генами *bph*-оперона, показал, что *bphS* кодирует белок негативной регуляции транскрипции *bph*-генов. Индукторами BphS являются дигидрокси-бифенил и ГОФДК (Mouz *et al.*, 1999).

Расположение генов деструкции бифенила как на хромосоме, так и в составе мобильных элементов обуславливает горизонтальный перенос данных генов между различными группами аэробных бактерий (рисунок 12) (Bhatt *et al.*, 2021).

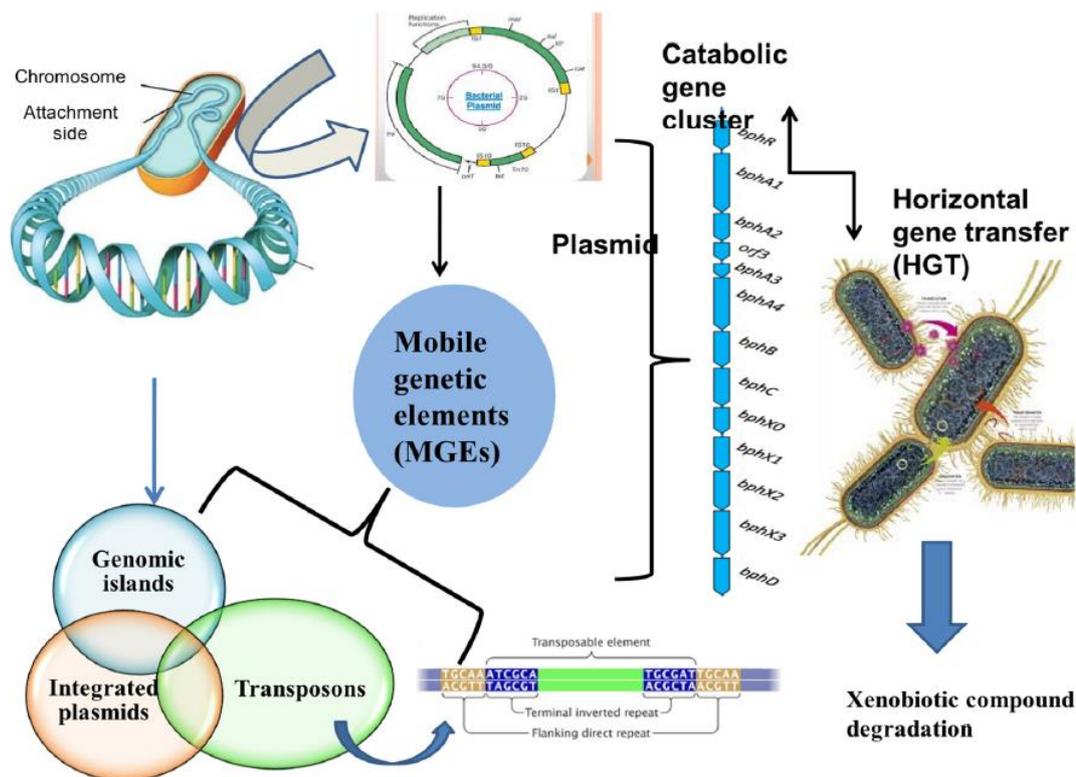


Рисунок 12 – Локализация *bph*-генов и их распространение среди бактерий-деструкторов (Bhatt *et al.*, 2021)

Распространение *bph*-генов в условиях длительного загрязнения биотопов полихлорированными бифенилами способствует адаптации

микробиоценоза к присутствию данной группы поллютантов, а также эффективной деструкции ПХБ в результате сукцессионных изменений внутри микробиоценоза, ведущих к доминированию штаммов-деструкторов полихлорированных бифенилов.

Генетические системы разложения метаболитов ПХБ

Для эффективной утилизации ПХБ необходимо, чтобы (хлор)бензойные кислоты, образующиеся при аэробной бактериальной трансформации, также были деградированы. Способность к трансформации замещенных и незамещенных бензойных кислот описана для представителей филумов *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* (Pieper, 2005; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Baggi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017).

Биоразложение *бензойной кислоты* начинается с окисления молекулы под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы (БенДО) (рисунки 3, 8) (Parales, Resnick, 2006). БенДО (КФ 1.14.12.10) состоит из двух α - и двух β -субъединиц (<https://www.genome.jp>). Показано, что субстратная специфичность обуславливается α -субъединицей БенДО (Parales, Resnick, 2006; Solyanikova *et al.*, 2015). Анализ генов, детерминирующих α субъединицу БенДО (в частности гена *benA*) показал, что они формируют отдельный кластер (подсемейство) на филогенетическом древе бактериальных диоксигеназ, окисляющих ароматическое кольцо, а также выявил существенные различия данного гена у грамположительных и грамотрицательных бактерий (Haddad *et al.*, 2001; Field, Sierra-Alvarez, 2008; Solyanikova *et al.*, 2015). Высказано предположение, что эволюция гена *benA* у данных групп бактерий протекала независимо друг от друга, однако они имеют общего предка (Haddad *et al.*, 2001; Field, Sierra-Alvarez, 2008a). В международной базе GenBank содержатся сведения о 125 последовательностях гена *benA* у аэробных бактерий, основная часть которых принадлежит родам *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Среди известных штаммов-

деструкторов ген *benA* описан у ряда представителей рода *Pseudomonas*: *Pseudomonas putida* KT2440 (GenBank LT799039.1), *Pseudomonas putida* B6-2 (CP015202.1), *P. putida* F1 (GenBank CP000712.1), *P. entomophila* L48 (GenBank CT573326) *Pseudomonas* sp. VLB120 (GenBank CP003961), а также у штамма-деструктора ПХБ *B. xenovorans* LB400 (Denef *et al.*, 2006). Обнаружение у территориально удаленных бактериальных штаммов высокоидентичных генов *benA* свидетельствует в пользу теории о передаче генетического материала между бактериями рода *Pseudomonas* в процессе адаптации к высокому уровню загрязнения ароматическими и хлорароматическими соединениями (Vodovar *et al.*, 2006; Coleman, Chisholm, 2010; Polz *et al.*, 2013; Syvanen, 2012; Köhler *et al.*, 2013).

В работе (Kitagawa *et al.*, 2001) показано, что ферменты, кодируемые кластером генов *benABCD* штамма *R. jostii* RHA1, участвуют в разложении не только бензойной, но и 3-хлорбензойной кислоты (рисунок 13).

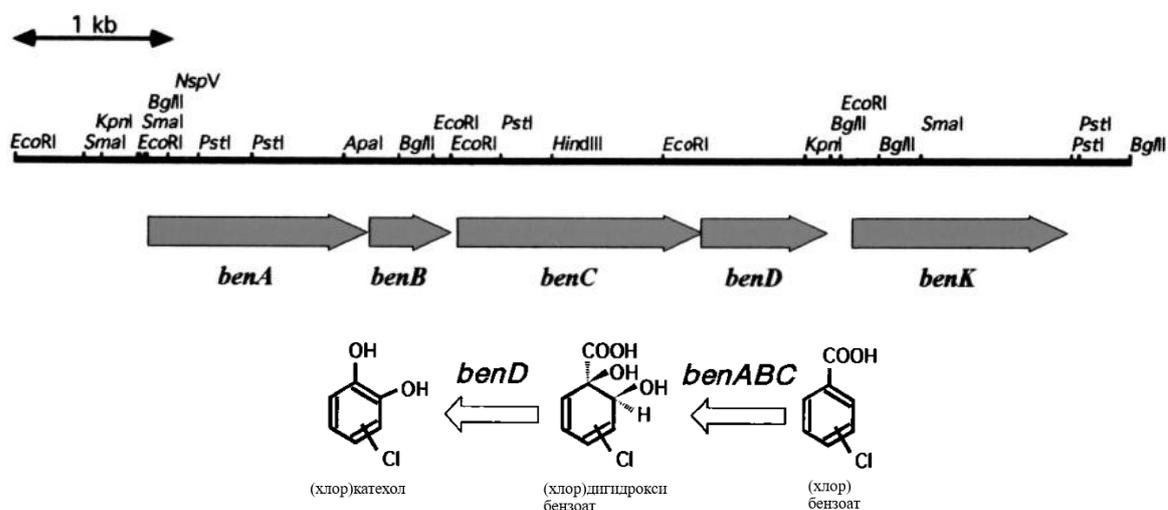


Рисунок 13 – Организация *benA* генов штамма *R. jostii* RHA1 и катализируемый ими путь деструкции хлорбензойной кислоты (Kitagawa *et al.*, 2001)

У штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* и *Cupriavidus necator*, входящих в состав сообщества 2МС, активно разлагающего 2-ХБК, 2,4-диХБК, 2,5-диХБК и 2,3,5-триХБК, выявлен ген *benA*, на 90-91% сходный

с гомологичным геном штаммов рода *Pseudomonas*, при этом в штаммах отсутствуют гены *cbdABC* и *ohbAB*, кодирующие ферменты первичной атаки хлорбензойных кислот (Baggi *et al.*, 2008). Предполагается, что окисление ХБК до хлоркатехолов происходит под действием бензоат 1,2-диоксигеназы.

Для штамма *Pseudomonas* sp. 3-CBA описан путь разложения 3-ХБК под действием ферментов, кодируемых кластером генов *benABCD* (Xu *et al.*, 2017). Показано, что гены *benABCD* штамма 3-CBA на 99% сходны с гомологичными генами штаммов *P. plecoglossicida* NyZ12, *P. monteilli* SB3101 и *P. putida* DLL-E4 (рисунок 14).

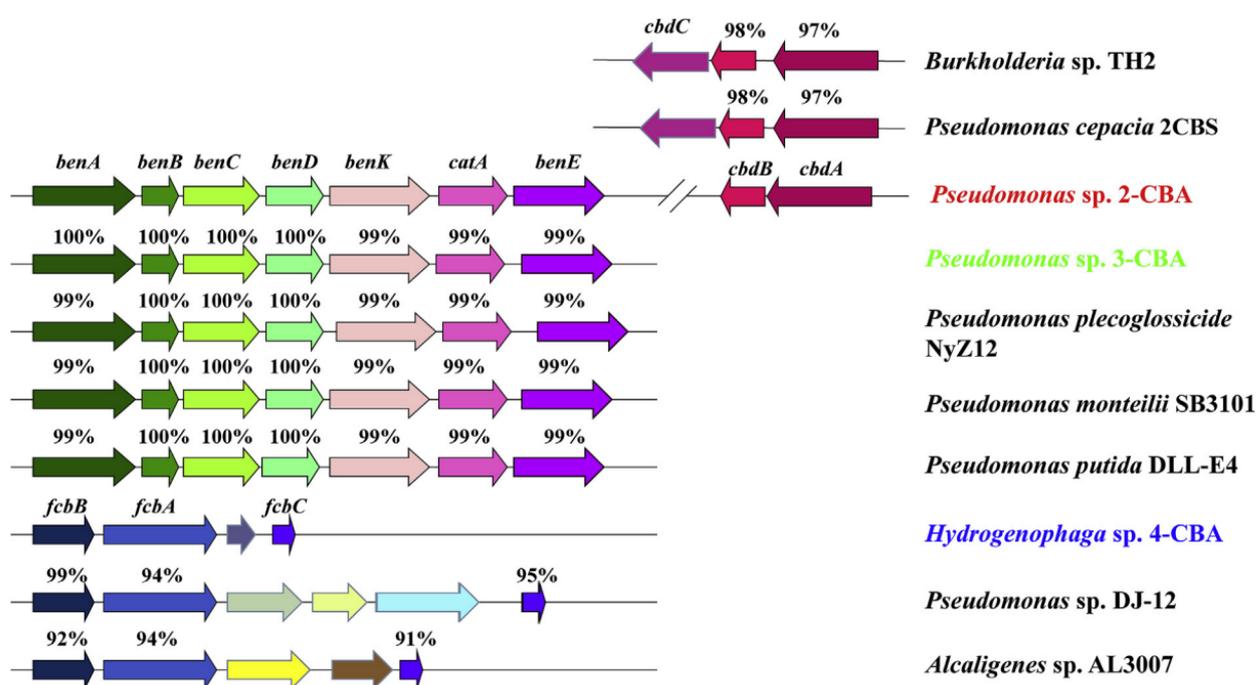


Рисунок 14 – Сравнение кластеров генов, ответственных за катаболизм 2-ХБК, 3-ХБК и 4-ХБК (Xu *et al.*, 2017)

Аэробная бактериальная деструкция хлорированных бензойных кислот обусловлена действием различных групп ферментов, кодируемых разными генами. Так, деструкция 4-ХБК обусловлена присутствием в геноме бактерий *fcb*-генов, деструкция 3-ХБК – обусловлена генами *tfd*, *cba*, *cbn*, деструкция 2-ХБК осуществляется ферментами, кодируемыми генами *clc* и *ohb*.

Наиболее подробно изучены гены, ответственные за разложение 2-ХБК у штаммов родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* (рисунки 14, 15).

Показано, что у штаммов *P. aeruginosa* 142 и *B. cepacia* 2-CBS, имеются различия в организации генов, кодирующих ферменты 2-ХБК-метаболизма. Во-первых, в штамме 2-CBS гены, кодирующие большую (*cbdA*) и малую (*cbdB*) субъединицы оксигеназы, сгруппированы с геном, кодирующим компонент транспорта электронов оксигеназы (*cbdC*) (Haak *et al.*, 1995; Hickey, Sabat, 2001; Hickey *et al.*, 2001).

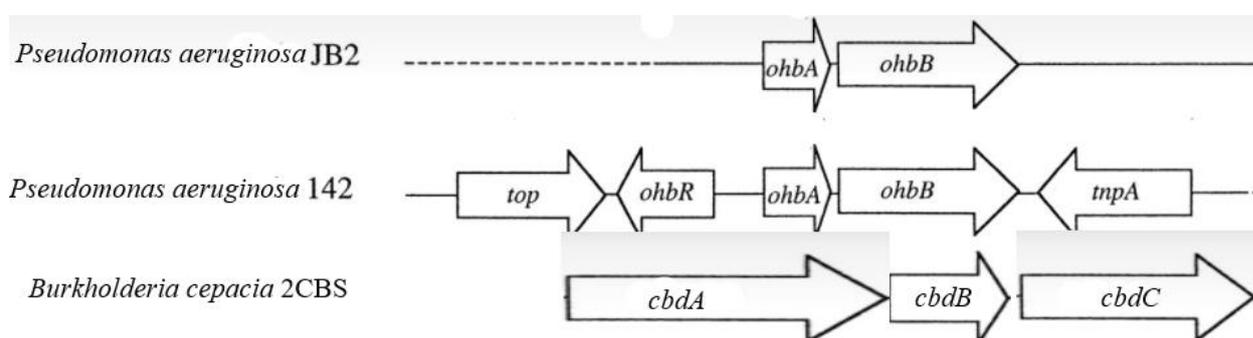


Рисунок 15 – Карта *ohb*-регионов штаммов *P. aeruginosa* 142 и *P. aeruginosa* JB2 и *cbd*-региона штамма *Burkholderia cepacia* 2-CBS (*Pseudomonas cepacia* 2CBS) (Hickey, Sabat, 2001; Tsoi *et al.*, 1999; Haak *et al.*, 1995; Hickey *et al.*, 2001)

Однако в штамме 142 гены, кодирующие α - и β -субъединицы оксигеназы (*ohbA*, *ohbB*, соответственно), отделены от генов, кодирующих компоненты транспорта электронов (Tsoi *et al.*, 1999). Во-вторых, сравнение аминокислотных последовательностей α - и β -субъединиц 2-ХБК оксигеназы данных штаммов показало низкий уровень сходства - 22 и 14% соответственно, но более высокий уровень сходства с бензоат / толуат диоксигеназой в случае штамма 2-CBS и салицилат гидроксилазой / нитротолуол диоксигеназой / бифенил диоксигеназой в случае штамма 142. Анализ нуклеотидной последовательности генов *ohbAB* штамма *P. aeruginosa* JB2 (GenBank CP028917.1), а также аминокислотной последовательности

кодируемых ими субъединиц 2-ХБК оксигеназы показал идентичность *ohbA*₁₄₂ и *ohbA*_{JB2}, но выявил существенные различия между *ohbB*₁₄₂ и *ohbB*_{JB2} (Haak *et al.*, 1995; Tsoi *et al.*, 1999; Hickey, Sabat, 2001; Hickey *et al.*, 2001).

Показано, что *cbdAB*-гены штамма *Pseudomonas* sp. 2-СВА на 97-98% идентичны гомологичным генам штаммов *Burkholderia* sp. TH2 и *P. ceparia* 2-CBS (Xu *et al.*, 2017). Однако, в геноме штамма 2-СВА отсутствовал ген *cbdC*, кодирующий НАДН-редуктазу.

Высокую активность по отношению к 3-ХБК и 4-ХБК демонстрирует штамм *Burkholderia* sp. NK8. Гены, кодирующие ферменты окисления ХБК (*cbeABCD*) и катехола (*catABC*), и регуляторный ген (*cbeR*) объединены в один кластер (рисунок 16). Хлорбензоат 1,2-диоксигеназа (*CbeABC*) на 50-65 % идентична бензоат диоксигеназе штамма *Acinetobacter* sp. ADP1, толуол- и 2-галобензоат диоксигеназам штамма *B. ceparia* 2-CBS, локализованных на плаزمидах (Francisco Jr *et al.*, 2001).

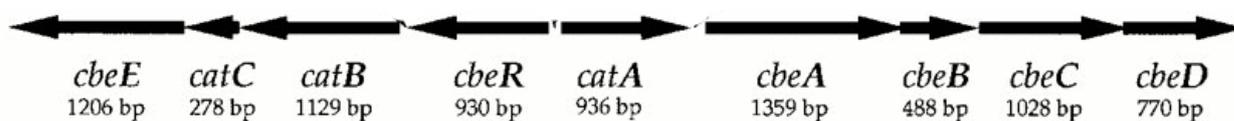


Рисунок 16 – Расположение генов, ответственных за разложение хлорбензоатов у штамма *Burkholderia* sp. NK8 (Francisco Jr *et al.*, 2001)

В штамме *Comamonas testosteroni* BR60 (*Alcaligenes* sp. BR60) выявлен кластер генов *cbaABC*, кодирующих ферменты разложения 3-ХБК. Трансформация 3-ХБК под действием ферментов *CbaABC* может проходить через стадию образования протокатеховой кислоты и через стадию 5-хлор-протокатеховой кислоты, которые далее трансформируются через *мета*-путь (экстрадиольное расщепление) (рисунок 17) (Providenti, Wyndham, 2001).

Регуляция транскрипции генов *cbaABC* осуществляется под действием 3-ХБК, а также в результате взаимодействия с белком-регулятором *CbaR*, ген которого располагается выше *cbaABC* (Providenti, Wyndham, 2001). Анализ нуклеотидной последовательности выявил высокий уровень

гомологии (99.3%) *cbaABC* у штаммов, изолированных в США и Италии (Di Gioia *et al.*, 1998).

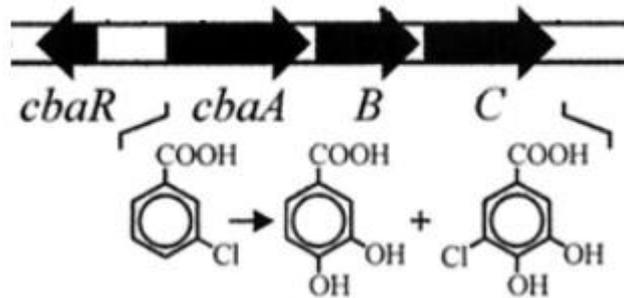


Рисунок 17 – Расположение *cba*-генов штамма *Comamonas testosteroni* BR60 в транспозоне Tn5271, входящем в состав плазмиды pBRC60 (Providenti, Wyndham, 2001)

Организация генов *fcbaBC*, кодирующих 4-хлорбензоат-КоА-лигазу, 4-хлорбензоил-КоА-дегалогеназу и 4-гидроксibenзоат-КоА-тиоэстеразу соответственно, описана у ряда штаммов-деструкторов 4-ХБК, принадлежащих родам *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Hydrogenophaga* и *Pseudomonas* (рисунки 14, 18).

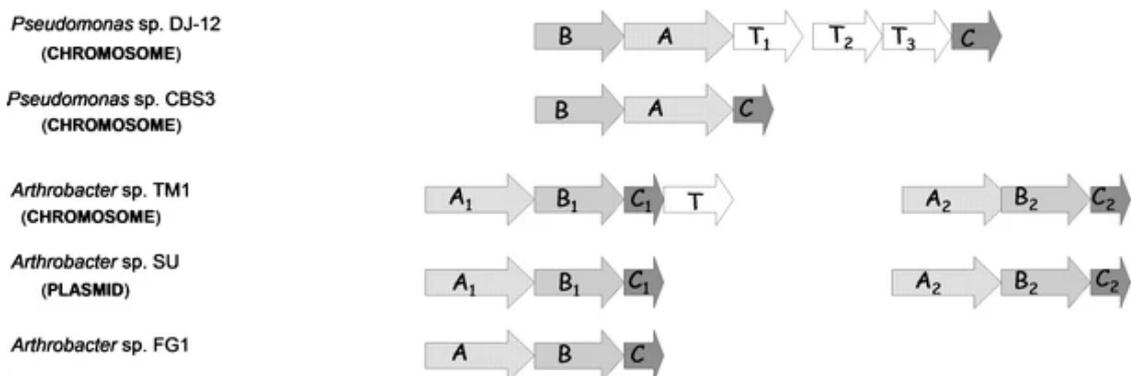


Рисунок 18 – Организация *fcb*-генов у штаммов-деструкторов 4-ХБК родов *Pseudomonas* и *Arthrobacter* (Radice *et al.*, 2007): A, A1, A2 – гены *fcbA*, B, B1, B2 – гены *fcbB*, C, C1, C2 – гены *fcbC*, T, T1 – гены *fcbT*

fcB-Гены локализованы в едином кластере, однако их расположение у отдельных штаммов различается. Так для штаммов *Arthrobacter* sp. SU, *Arthrobacter* sp. FG1 и *Arthrobacter* sp. TM1 характерно расположение *fcBA-fcB-fcC*, тогда как у штамма *Pseudomonas* sp. CBS3 гены расположены в порядке *fcB-fcBA-fcC*. При этом *fcC*_{CBS3} не гомологична *fcC*_{SU} и *fcC*_{КЗТ1}. Анализ нуклеотидных последовательностей *fcB*-генов штаммов *Arthrobacter* sp. SU (GenBank M93187) и *Arthrobacter globiformis* КЗТ1 (GenBank AF304300) выявил высокий уровень гомологии – 99.65%.

Следует отметить, что в кластере *fcB*-генов штамма *Pseudomonas* sp. DJ-12 между генами *fcBA* и *fcC* расположены гены *fcBT1T2T3*, кодирующие транспортные белки, осуществляющие перенос 4-ХБК в клетку. Сравнение генов *fcBA* и *fcC* штаммов *Pseudomonas* sp. CBS3 и *Pseudomonas* sp. DJ-12 выявило низкий уровень гомологии: 58% для генов *fcBA* и 65% для генов *fcC* (Chae *et al.*, 2000). В кластере *fcB*-генов штаммов *Hydrogenophaga* sp. 4-CBA и *Alcaligenes* sp. AL3007 гены *fcBA* и *fcC* разделены генами, не участвующими в разложении 4-ХБК (Xu *et al.*, 2017). Уровень сходства между *fcABC*-генами штаммов 4-CBA, AL3007 и DJ-12 составил 91–99%.

Гены деструкции хлорбензойных кислот, также, как и гены деструкции хлорбифенилов, могут иметь хромосомальную или плазмидную локализацию. Установлено, что у штаммов *Pseudomonas* sp. B13, *P. putida* AC858, *P. cepacia* HVC, *P. cepacia* 2-CBS, *Ralstonia eutropha* JMP134, *Alcaligenes eutrophus* JMP363, *A. eutrophus* NH9, *Arthrobacter globiformis* КЗТ-1, *Corynebacterium sepedonicum* КЗ-4 гены, детерминирующие разложение 2-ХБК, 3-ХБК и 4-ХБК, а также ряд дихлорбензойных кислот, расположены на D-плазмидах, молекулярная масса которых находится в диапазоне 4.7–120 т.п.н. Хромосомальная локализация генов деструкции ХБК описана у штаммов *Pseudomonas* sp. CBS3, *P. putida* P111, *Burkholderia* sp. NK8.

Распространение генов, обуславливающих трансформацию хлорированных бензойных кислот, между аэробными бактериями различных

континентов, может быть следствием их локализации на транспозонах (Di Gioia *et al.*, 1998). Подробно описаны транспозоны Tn5530, Tn5707, Tn5271, на которых обнаружены гены 3-ХБК, 4-ХБК и 3,4-ХБК. Кроме того показано, что у ряда штаммов родов *Arthrobacter* и *Micrococcus*, гены деструкции 4-ХБК расположены между IS-элементами, входящими в состав хромосомы (Gartemann, Eichenlab, 2001; Bhatt *et al.*, 2021).

Таким образом, организация генов деструкции ХБК способствует их распространению среди аэробных бактерий в микробиоценозах загрязненных территорий, в том числе, располагающихся на различных континентах.

1.4. Применение бактерий для очистки ПХБ-загрязненных почв

Производство ПХБ в промышленных масштабах и широкое использование в различных отраслях народного хозяйства послужило причиной загрязнения данными соединениями обширных территорий. Принимая во внимание особую опасность ПХБ для живых организмов, проблема очистки почв, производственных поверхностей и донных отложений является одной из активно исследуемых в последние десятилетия. Выявлены основные группы процессов, которые могут быть задействованы для уничтожения ПХБ в природных объектах (рисунок 19).

Анализ экспериментальных и литературных данных показал, что в естественных условиях разложение ПХБ протекает под действием физико-химических и биологических факторов, однако этот процесс очень длительный во времени и, по настоящее время, не обеспечивает полное разложение загрязнителя. Разработанные физико-химические технологии позволяют достичь 99.9% деструкции ПХБ, но при этом они энерго- и экономически затратны, а также приводят к разрушению очищаемого субстрата (почвы, донных отложений), при этом могут выделяться токсические соединения.

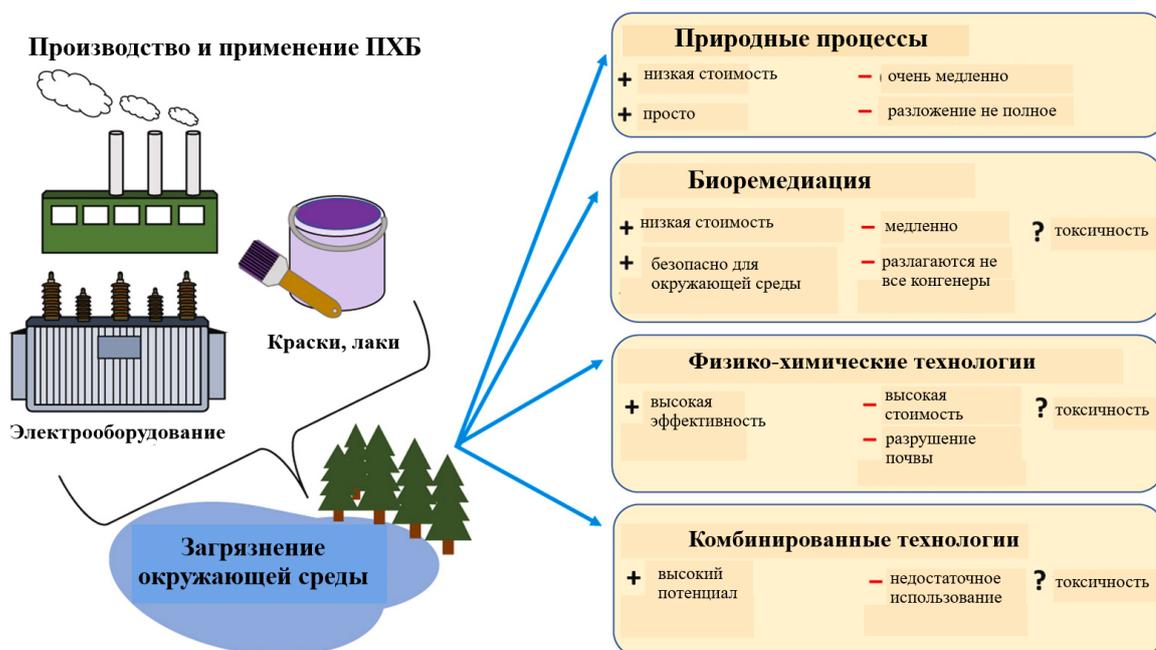


Рисунок 19 – Основные группы процессов, используемые для восстановления ПХБ-загрязненных территорий (Šrédlová, Cajthaml, 2022)

Биоремедиация является экологически безопасным методом очистки почв от ПХБ. С позиций экономических затрат данные технологии наиболее выгодны. Однако есть недостатки – процесс ремедиации относительно медленный (может занимать от нескольких месяцев до нескольких лет) и разрушению подвергаются не все конгенеры ПХБ. В последнее время появляются сообщения о применении комбинированных методов (сорбция ПХБ + бактериальная деструкция, электрохимическая обработка почв перед биоаугментацией и др.). Однако эти методы еще недостаточно используются и находятся в стадии изучения (Passatore *et al.*, 2014; Valizadeh *et al.*, 2021; Šrédlová, Cajthaml, 2022).

Основываясь на результатах проведенного анализа, можно заключить, что наиболее перспективным и эффективным подходом в восстановлении ПХБ-загрязненных почв является биоремедиация с применением бактериальных штаммов. Процесс биоремедиации почв в естественных условиях обусловлен активностью анаэробных и аэробных бактерий. Анаэробное восстановление ПХБ приводит к снижению количества заместителей в молекуле хлорбифенила, что способствует снижению

диоксин-подобной токсичности конгенов ПХБ и повышает их биодоступность для аэробных бактерий. Очистка почв от ПХБ может быть обеспечена только применением аэробных бактерий, так как в аэробном метаболизме происходит расщепление молекулы до не токсичных или менее токсичных соединений, тогда как в анаэробных условиях происходит снижение степени хлорирования без расщепления молекулы (Passatore *et al.*, 2014; Valizadeh *et al.*, 2021).

Основными направлениями биоремедиации ПХБ-загрязненных почв с использованием метаболического потенциала бактериальных штаммов являются биостимуляция и биоаугментация.

Применение методов биостимуляции (внесение азота, лактата, инкубация в анаэробных условиях) позволило снизить концентрацию высоко хлорированных конгенов ПХБ и достичь 32–62% деструкции ПХБ, присутствовавших в почве и донных отложениях (Chun *et al.*, 2013; Lehtinen *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015; Ewald *et al.*, 2020; Matturo *et al.*, 2020).

В рамках методов биоаугментации применяют внесение в почву как индивидуальных штаммов, так и их сообществ. При этом следует учитывать риски внесения новых видов в сложившийся микробиоценоз (Passatore *et al.*, 2014). Одним из подходов к снижению данных рисков является использование штаммов, ранее выделенных из загрязненных почв.

Одними из первых сообщений об эффективном применении для очистки почв от ПХБ являются патенты, связанные с применением штаммов *B. xenovorans* LB400 и *Alcaligenes eutrophus* H850 (патент США № 4843007, № 4843009, № 4876201, № 5009999). Внесение данных штаммов в почву, содержащую 50 ppm Aroclor 1242, 500 ppm Aroclor 1242 или 50 ppm Aroclor 1254, приводило к снижению концентрации смесей ПХБ на 43–85%. Наилучшие показатели отмечены при исходном уровне загрязнения в 50 ppm Aroclor 1242.

В результате внесения в почву, содержащую 100 мг Aroclor 1242/ г почвы, штамма *Arthrobacter* sp. B1B через 9 сут происходило снижение

концентрации дихлорбифенилов на 88%, трихлорбифенилов на 40%, тетрахлорбифенилов на 11% и пентахлорбифенилов на 3%. В случае, если почва была загрязнена ПХБ 2, ПХБ 3 и ПХБ 8 в концентрациях, сопоставимых с указанной выше (100 мг/г почвы), внесение штамма *Cupriavidus necator* JMS34 обуславливало снижение уровня загрязнения на 99%, а штамма *B. xenovorans* LB400 – на 85% (патент США № 7989194).

Российским агентством по патентам и товарным знакам выдан патент на штамм *Alcaligenes latus* ТХД-13, внесение которого в почву обеспечивает снижение содержания ПХБ на 35–50% при начальной концентрации загрязнителя 52.3–70.2 мг/кг почвы (патент РФ 2155804 С1). Жариков с коллегами (2013) сообщает об эффективной биоаугментации двух штаммов микроорганизмов в почву г. Серпухов. На территории завода «Конденсатор» степень разложения ПХБ составила 90% (концентрация снизилась с 1600 до 160 мг/кг), на территории сквера концентрация ПХБ снизилась с 12-14 мг/кг до 0.1 мг/кг, а в сельскохозяйственных почвах, загрязненных высокохлорированными бифенилами, на участке в 1 га удалось достичь снижение ПХБ на 80–90 % (Жариков и др., 2013).

Применение бактериальных консорциумов позволяет эффективно восстанавливать ПХБ-загрязненные почвы. Совместное внесение трех аэробных бактерий (*Mycobacterium frederiksbergense* IN53, *Rhodococcus erythropolis* IN129, *Rhodococcus* sp. IN306) приводит к снижению концентрации ПХБ в почве через 6 месяцев на 84.5%, в том числе – на 58.6% ПХБ 180 (Steliga *et al.*, 2020). Близкие результаты получены в случае применения штаммов родов *Rhodococcus* и *Achromobacter* (Horváthová *et al.*, 2018).

Для повышения эффективности биоаугментации, а также улучшения технологических свойств вносимых биопрепаратов, предлагается использовать в качестве носителей различные органические материалы, а также дополнительно вносить в почву сурфактанты и другие соединения, повышающие биодоступность ПХБ (Passatore *et al.*, 2014; Valizadeh *et al.*,

2021; Šrédlová, Cajthaml, 2022). Внесение сурфактантов «Saponin» и «Rhamnolipids R-90» при биоаугментации штамма *Achromobacter xylosoxidans* приводило к повышению эффективности удаления ПХБ с 30% до 55% и 60% соответственно (Lászlóvá *et al.*, 2018). В качестве носителей предлагается использовать альгинатный гель, гранулированный активированный уголь, биоуголь (biochar) (Sowers, May, 2013; Valizadeh *et al.*, 2021; Ouyang *et al.*, 2021). Показано, что иммобилизация бактериального консорциума GYB1 в альгинатных гранулах снижает время полураспада ПХБ 118 с 8.14 до 3.79 дней (Ouyang *et al.*, 2021). Внесение биоугля, полученного из бамбука, совместно с бактериальным сообществом приводило к снижению концентрации ПХБ в почве на 65.68–78.93% при начальном содержании 60 мг Aroclor 1242 /кг почвы (Huang *et al.*, 2018).

Сочетание биостимуляции и биоаугментации также используется в технологиях биоремедиации ПХБ-загрязненных почв. Одним из примеров реализации данного подхода является очистка почвы с разным уровнем загрязнения ПХБ (127 мкг/г и 484 мкг/г). Внесение питательных веществ совместно с четырьмя бактериальными штаммами, обуславливало деградацию 58% и 60.8% ПХБ соответственно (Cervantes-Gonzales *et al.*, 2019).

Таким образом, разработка технологий восстановления ПХБ-загрязненных почв на основе бактериальных штаммов является в настоящее время актуальным и перспективным направлением для решения вопросов сохранения безопасных условий окружающей среды.

Заключение по главе 1

Анализ данных многочисленных исследований выявил высокий интерес к проблеме обезвреживания полихлорированных бифенилов, входящих в перечень стойких органических загрязнителей (СОЗ) (Горбунова и др., 2011; Final act..., 2001; Negreet-Bolagay *et al.*, 2021). Острую актуальность данной проблемы подтверждает тот факт, что Стокгольмская

конвенция, регламентирующая список СОЗ и процедуры обращения с веществами данной группы, ратифицирована 185 странами (<http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatifications/PartiesandSignatoires/tabid/4500/Default.aspx>).

Наиболее перспективным подходом для решения данной проблемы является деструкция ПХБ при участии аэробных бактерий (Горбунова и др., 2011; Elangovan *et al.*, 2019; Negret-Bolagay *et al.*, 2021). Глобальная распространенность ПХБ обуславливает негативное давление на биоценозы как в регионах с развитой промышленностью, так и на территориях, удаленных от техногенных воздействий, что приводит к изменениям в составе микробиоценозов, направленных на увеличение доли бактерий, осуществляющих трансформацию/деструкцию ПХБ. Анализ мест выделения бактерий-деструкторов ПХБ показал, что в большинстве случаев экотопы были загрязнены полихлорбифенилами, а география охватывает все континенты (Демин, 2013; Трегер, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014, Zhu *et al.*, 2020; Negret-Bolagay *et al.*, 2021). Однако, остается открытым вопрос встречаемости бактерий с ПХБ-деградативным потенциалом в незагрязненных почвах, либо в почвах, содержащих хлорорганические поллютанты, отличного от ПХБ химического строения. Несмотря на масштабность проводимых исследований по поиску, выделению и изучению ПХБ-деградирующих бактерий, территория Российской Федерации ими практически не охвачена.

Следует отметить, что описанные в литературе штаммы-деструкторы ПХБ существенно отличаются спектром разлагаемых конгенов хлорбифенилов (всего существует 209 конгенов ПХБ, отличающихся количеством и положением заместителей в молекуле) (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; Iori *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Atago *et al.*, 2016; Shuai *et al.*, 2016; Kour *et al.*, 2019). Выявлена основная закономерность – наиболее доступными для аэробных бактерий

являются хлорбифенилы, содержащие от 1 до 4 атомов хлора в молекуле, преимущественно в *орто*- или *мета*-положении. Описано незначительное количество штаммов, способных разлагать конгенеры ПХБ с количеством заместителей более 5, а также несущих атомы хлора в *пара*-положении (Bedard *et al.*, 1987; Furukawa, 2000; Goris *et al.*, 2004; De *et al.*, 2006; Pori *et al.*, 2008; Vako *et al.*, 2021). Однако, ПХБ производились и применялись в виде смесей, основную долю в которых составляли высокохлорированные конгенеры (Кириченко и др., 2000; Трегер, 2013; Первова и др., 2015; Erikson, Kaley II, 2011). В связи с этим существует необходимость поиска бактериальных штаммов, осуществляющих разложение широкого спектра ПХБ, в том числе представленных в составе коммерческих смесей.

Адаптация аэробных бактерий к ПХБ-загрязнению привела к эволюции метаболических процессов. Разложение ПХБ осуществляется под действием ферментного комплекса, обуславливающего поэтапное окисление ароматического кольца. В основе лежит биохимический путь трансформации незамещенного бифенила (Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). Ключевым ферментом первичной атаки на молекулу ПХБ является бифенил 2,3-диоксигеназа (ДО) (Elangovan *et al.*, 2019). На современном этапе установлена общая структура бифенил 2,3-ДО, выявлено расположение каталитического центра, а также взаимосвязь между строением активного центра фермента и спектром разлагаемых ПХБ на примере отдельных штаммов (Zielinski *et al.*, 2002; Ferraro *et al.*, 2007; Шумкова, Плотникова, 2012, Wang *et al.*, 2021). Для выявления основных закономерностей между строением бифенил 2,3-ДО и ее активностью в отношении различных конгенов ПХБ требуются исследования с привлечением современных аналитических, генетических, молекулярных и биоинформатических методов.

Одной из проблем аэробной деструкции хлорбифенилов является образование в качестве конечных продуктов хлорбензойных кислот (ХБК) (Pieper, 2005; Sharma *et al.*, 2017). Несмотря на то, что ХБК менее токсичны

(4 класс опасности), их накопление в окружающей среде также несет экологическую угрозу. В мировой практике описано незначительное количество бактериальных штаммов, осуществляющих разложение как хлорбифенилов, так и хлорбензойных кислот (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal, 2000; Park *et al.*, 2001; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009). При этом отсутствует исчерпывающая информация об особенностях метаболизма ХБК у штаммов-деструкторов ПХБ.

Биотрансформация ПХБ в условиях окружающей среды может приводить к образованию вторичных поллютантов – гидроксированных и метоксилированных полихлорбифенилов (Camara *et al.*, 2004; Passatore *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2016, 2018; Li *et al.*, 2019). В литературе представлены ограниченные сведения о бактериальной деструкции отдельных конгенов моногидрокси-ПХБ, и отсутствуют данные о разложении метокси-ПХБ и смесей гидрокси-ПХБ (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Учитывая тот факт, что ПХБ поступали в природные резервуары в виде смесей, то становится очевидным необходимость изучения возможности разложения смесей гидрокси- и метокси-ПХБ аэробными бактериями.

Одной из основных мировых тенденций является развитие природоподобных технологий, направленных на удаление ПХБ из объектов окружающей среды, а также из мест складирования (Šrédlová, Cajthaml, 2022). Данные технологии должны сочетать экологическую безопасность и экономическую эффективность. На современном этапе исследований показано, что основными агентами экобиотехнологий являются штаммы аэробных бактерий. Описанные выше особенности бактериальной деструкции ПХБ обуславливают необходимость дальнейшего поиска перспективных штаммов, а также новых направлений в развитии ПХБ-утилизирующих технологий.

Таким образом, можно выделить основные аспекты изучения аэробных бактерий, обладающих ПХБ-деградативным потенциалом: изучение филогенетического и функционального разнообразия штаммов аэробных бактерий, выделенных из ранее не исследованных экотопов; молекулярно-генетических анализ генов/оперонов, обуславливающих способность бактериальных штаммов разлагать ПХБ до соединений основного обмена клетки; оценка биodeградативного потенциала природных бактерий в отношении ПХБ, содержащих в молекуле различные заместители; определение целесообразности применения в экобиотехнологиях штаммов-деструкторов ПХБ и значимости данных разработок для очистки объектов окружающей среды и уничтожения невостробованных смесей ПХБ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в период с 1998 по 2021гг на базе лаборатории микробиологии техногенных экосистем “Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН” – филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, г. Пермь. Дизайн исследования представлен на рисунке 20.



Рисунок 20 – Дизайн проведенного исследования

2.1. Отбор образцов почв

Образцы почв и техногенно-минеральных образований (ТМО) были отобраны в период 1998–2018 гг в соответствии с государственной нормативной документацией (ГОСТ 17.4.4.02-84, ГОСТ 12071-2014, ГОСТ 17.4.3.01-83, ПНД Ф 2.1:2:2.2:2.3.2-03) из верхнего аэрируемого слоя (5-20 см). Отбор производился методом «конверта», для исследований брали усредненную пробу.

Образцы с территории Пермского края:

1. ОАО «Галоген», г. Пермь – 58°1'30"N 55°53'34"E;
2. ОАО «Пермский завод смазок и СОЖ», г. Пермь – 57°58'12"N 56°14'22"E;
3. территории городских парков, г. Пермь – 57°58'56"N 56°12'18"E, 57°59'36"N 56°11'11"E, 58°0'45"N 56°16'11"E, 58°2'N 56°11"E;
4. предприятия БКРУ1 ОАО «Уралкалий», г. Березники – 59°28'N 56°46'E;
5. ООПТ «Осинская лесная дача», г. Оса – 57°17'16"N 55°09'0"E, 57°17'26"N 55°08'21"E, 57°18'34"N 55°10'39"E;
6. заказник «Предуралье» – 57°22'N 57°09'E.

Образцы с территории Московской области - территория г. Серпухов - 54°54'12"N 37°25'43"E.

Образцы с территории Самарской области - ОАО «Средне-Волжский завод химикатов», г. Чапаевск - 53°00'18"N 49°41'32"E, 53°00'02"N 49°42'00"E, 52°59'39"N 49°41'37"E, 52°59'56"N 49°41'13"E, 53°00'03"N 49°41'10"E, 53°00'08"N 49°41'11"E.

Образцы с территории республики Бурятия:

1. территория, прилегающая к озеру «Сульфатное» Селенгинского района - 51°22'N 106°35'E;
2. территория, прилегающая к озеру «Белое» Иволгинского района - 51°32'N 107°1'E.

Образцы с территории Украины - хвостохранилище г. Калуш, Ивано-Франковская область - 49°2'53"N 24°17'34"E.

Карты-схемы мест отбора почвенных образцов приведены в Приложении 2.

Эколого-географическая характеристика территорий отбора почв в г. Пермь и Пермском крае

Пермский край расположен на востоке европейской части России, занимает площадь 160237 км² в восточной части Восточно-Европейской

равнины и на западных склонах Среднего и Северного Урала (Приложение 2, рисунок 73 а). Характеризуется значительными перепадами температуры в летний и зимний периоды. На территории Пермского края сосредоточены ресурсо-добывающие и перерабатывающие предприятия, а также представлен ряд других отраслей промышленности и сельское хозяйство. Согласно инвентаризации ПХБ-содержащего оборудования, проводившейся с 2000 по 2009 год, в Пермском крае присутствует 32.28 тонны ПХБ (www.unido-russia.ru).

Административный центр – город Пермь. Площадь города составляет 803 км², население - 1 051 583 человека. На территории города располагаются предприятия тяжелой промышленности, нефте- и газопереработки, химического синтеза. Город подразделен на 7 административных районов. Основная доля предприятий сконцентрирована в Индустриальном районе. Выбросы от промпредприятий по районам города распределяются следующим образом: Индустриальный (~ 50%), Орджоникидзевский (~ 20%), Свердловский и Кировский (~ 10% каждый), Дзержинский и Мотовилихинский (~ 4%), Ленинский (1%). Промышленные предприятия и нефтеперерабатывающие заводы, которые использовали ПХБ в технологическом цикле, расположены в Индустриальном (завод Нефтеоргсинтез) и Свердловском (Завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей) районах Перми.

В качестве площадок для отбора образцов почв были выбраны (Приложение 2 рисунок 73 б, в):

1. Территория предприятия АО «Галоген», Кировский район, г. Пермь (Приложение 2, рисунок 73 в) – образцы почв были отобраны на территории 4 складов, в которых ранее были захоронены галогенированные (фторированные, хлорированные, бромированные, йодированные) органические и неорганические соединения. Анализ почв выявил присутствие алифатических (10.7%), циклических (69.6%), ароматических

(2.1%) углеводов, а также их галогенированных производных (17.6%) (Рыбкина и др., 2005).

2. Территория предприятия ОАО «Завод смазок и СОЖ», Свердловский район, г. Пермь (Приложение 2, рисунок 73 в) – образцы почв отобраны в местах бывшего расположения цехов предприятия. Химический анализ почвы не позволил установить концентрацию ПХБ, однако известно, что на предприятии производили смазочно-охлаждающие жидкости, различные масла и смазки, в том числе для оборудования, эксплуатируемого в условиях низких температур. В составе таких масел использовали «Совол пластификаторный» - коммерческую смесь ПХБ (<http://phb.ecdl.su/node/93>).

3. Территория лесопарковых зон г. Пермь – образцы почв отобраны на территории Черняевского леса (6.37 км²) (Индустриальный район), Соснового бора (1.20 км²) (Дзержинский район), городского сада им. В.Л. Миндовского (0.10 км²) (Индустриальный район), не действующих кладбищ «Егошихинское» (0.20 км²) (Ленинский район) и «Южное» (0.43 км²) (Свердловский район) (Приложение 2, рисунок 73 в). Данные территории попадают согласно розе ветров в основные зоны возможного загрязнения при выбросах веществ в воздух от промышленных городских комплексов. Химический анализ почвенных образцов выявил присутствие ПХБ в концентрациях $(2.78-101.87) \pm 0.03$ мкг / кг сухой почвы (Рыбкин, Рыбкина, 2006; Egorova, Vuzmakov, 2020).

4. Территория ОАО «Уралкалий» г. Березники, Пермский край (Приложение 2, рисунок 73 б, 74) – город Березники располагается в 208 км (при движении по воде) к северу от г. Пермь, площадь составляет 431.1 км². Основой активного развития города в 20 веке послужила разработка «Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей», два участка которого (Березниковский и Дурыманский) расположены на территории города. В составе отобранных почвенных образцов выявлены алифатические углеводороды с длиной цепи от 16 до 28 углеродных атомов, гетероциклические углеводороды (тетрабромтиофен, дибромбензотиофен) и

ароматические углеводороды (три- и тетра-бромбензол, дибромнафталин, дибром- и трибромбифенил, ДДЕ, ДДТ, диоктилфталат, дибутилфталат) (Егорова и др., 2014). Несмотря на то, что на предприятиях ОАО «Уралкалий» активно использовалось оборудование, содержащее ПХБ, в отобранных образцах данные соединения не выявлены. Однако, присутствуют бром-производные бифенила. Можно предположить, что данные соединения образуются в технологическом цикле при добыче и переработке руды.

5. Особо охраняемая природная территория (ООПТ) Охраняемый ландшафт «Осинская лесная дача», Пермский край – ООПТ «Осинская лесная дача» располагается на берегу Воткинского водохранилища в 10 км к западу от г. Осы в южной части Пермского края (Приложение 2, рисунок 72б, 74). Общая площадь составляет 12 168 га, территория подразделена на кварталы и зоны (Приложение 2, рисунок 75). На основании архивных данных известно, что в 1960-1970 гг на данной территории осуществлялась обработка почвы и растительности инсектицидами хлорорганического ряда, которые в настоящее время включены в список СОЗ. Газохроматографический анализ полученных почвенных образцов показал, что в настоящее время хлорорганические соединения присутствуют только в почве квартала 11 (Приложение 2, рисунок 75). Основными загрязнителями являются: три-, тетра- и пентахлорбензолы, гексахлорциклогексаны (изомеры α , β , γ и δ), пента- и гексахлорбифенилы, ДДТ, дибутилфталат (Пьянкова и др., 2015; Егорова и др., 2017; Egorova et al., 2017).

6. Территория ООПТ заказника «Предуралье», Пермский край – ООПТ ландшафтный заказник «Предуралье» расположен в долине реки Сылва между г. Кунгур и селом Усть-Кишерть Пермского края. Площадь заказника составляет 2290 га, подразделена на кварталы и зоны (Приложение 2, рисунок 73 б, 76). Данная территория не подвергалась обработкам химическими соединениями, а в статусе охраняемого ландшафта

находится уже более 50 лет. Анализ почв подтвердил отсутствие галогенорганических загрязнителей в образцах (Корсакова, Егорова, 2015).

Особенности загрязнения почв г. Чапаевска Самарской области

Самарская область расположена в Европейской части России во II климатическом поясе с умеренно-континентальным климатом. Город Чапаевск Самарской области находится в 43 км к юго-западу от областного центра г. Самары (Приложение 2, рисунок 73 а, 77). По территории протекает река Чапаевка. Площадь города составляет 18749 га, население 70944 человека.

Около 80% территории города занимают промышленные и коммунально-бытовые предприятия. Несколько десятилетий в городе функционировал ОАО «Средне-Волжский завод химикатов», в состав продукции которого входили хлорорганические соединения, такие как гексахлорциклогексан, гексахлорбензол, пентахлорфенол, трихлорбензол (использовался при производстве коммерческой смеси ПХБ торговой марки «Совтол-10»). Часть данных веществ отнесена к группе СОЗ согласно Стокгольмской конвенции. Несмотря на прекращение деятельности завода, соединения группы СОЗ продолжают присутствовать в почвах и объектах г. Чапаевск, а также были обнаружены в организме его жителей (Назаров и др., 2016, Hauser *et al.*, 2005). Комплексные исследования показали, что соединения группы СОЗ, в том числе и ПХБ, выявляются в грудном молоке женщин, в крови всех групп населения, а также в продуктах питания, что негативно сказывается на здоровье населения (Ulaszewska *et al.*, 2011, Plaku-Alakbarova *et al.*, 2021). Образцы почв и грунта отбирали с территории ОАО «СВЗХ» (Приложение 2, рисунок 77).

Химический анализ показал высокий уровень загрязнения данных почв соединениями группы СОЗ (таблица 2). Анализ спектра выявленных ПХБ показал, что в почвах присутствует набор конгенов хлорбифенилов, характерный для коммерческой смеси Совол. Содержание фенолов и

хлорфенолов в исследуемых образцах не превышало 0.01 мг/кг почвы (Назаров и др., 2016).

Таблица 2 – Результаты анализа образцов почвы и ила на содержание соединений группы СОЗ (мг/кг сух. образца)

Образец почвы/ила	Смесь ПХБ	Гексахлор- бензол	ГХЦГ (Линдан)	ДДТ, ДДЕ, ДДД
Ch1	0.213 ± 0.001	н.о.*	н.о.	н.о.
Ch 2	1.073 ± 0.002	0.924 ± 0.002	1.843 ± 0.001	<0.01
Ch 3	0.328 ± 0.001	0.405 ± 0.001	4.174 ± 0.002	н.о.*
Ch 4	0.732 ± 0.003	22.513 ± 0.003	53.449 ± 0.005	н.о.
Ch 5	0.289 ± 0.002	0.100 ± 0.001	0.393 ± 0.001	н.о.
Ch 6	0.408 ± 0.001	0.816 ± 0.002	5.468 ± 0.001	н.о.
Ch 13	<0.06	0.840 ± 0.002	9.57 ± 0.008	н.о.
Ch 14	<0.06	97.840 ± 0.001	41.470 ± 0.008	37.67 ± 0.02 3.67 ± 0.03 12.5 ± 0.2
ОДК/ПДК, мг/кг	0.06	0.03	0.1	0.1

* н.о. – не обнаружено при анализе

Эколого-географическая характеристика г. Серпухов Московской области

Московская область расположена в европейской части России (Приложение 2, рисунок 73 а). Для данной территории характерен умеренно-континентальный климат. Город Серпухов находится в южной части Московской области на расстоянии 93 км от Московской кольцевой автодороги. Площадь города составляет 32.1 км², численность населения более 125 тыс. человек. Уровень загрязнения атмосферного воздуха и почв

г. Серпухов высокий вследствие работы крупных промышленных предприятий. Для настоящего исследования образцы почвы были отобраны вблизи ООО «Серпуховской конденсаторный завод «КВАР»». Анализ почв на территории города показал, что содержание ПХБ в них варьирует от 5.5 до 4300 мг/кг сухой почвы (Лапушкин и др., 2020).

Особенности техногенного загрязнения почв г. Калуш

Город Калуш является промышленным центром Западной Украины, располагается на северо-востоке Ивано-Франковской области, на левом берегу реки Ломница. Площадь города составляет 64.53 км², численность населения – 65849 человек. На территории города располагаются предприятия по производству калийных минеральных удобрений, металлического магния, полиэтиленов. В 2010 г территория г. Калуш была признана зоной чрезвычайной экологической ситуации. Помимо проседания грунтов и засоления питьевой воды на территории города расположено единственное в Европе хранилище токсичных отходов, в том числе соединений группы СОЗ (Приложение 2, рисунок 78).

Образцы почв были отобраны на территории хранилища (хвостохранилище 2) СОЗ. Химический анализ почв показал, что концентрация ПХБ в образцах составляла 485 мг/кг сухой почвы, что превышает ПДК более чем в 8000 раз. Спектр выявленных конгенов ПХБ свидетельствует, что почва загрязнена коммерческими смесями Delor 103 (Словакия)=Трихлорбифенил (СССР) и Совол (СССР) (Егорова и др., 2013).

Характеристика территории отбора образцов почв в республике Бурятия

Республика Бурятия расположена на юге Восточной Сибири, характеризуется континентальным климатом (Приложение 2, рисунок 73 а). На территории республики расположены 2 биосферных заповедника (Байкальский и Баргузинский), 1 государственный заповедник, 3 национальных парка и 13 заказников. Поверхностные водные запасы

республики представлены реками (более 30 000) и озерами (более 35 000). Кроме озера Байкал, особый интерес при изучении влияния различных условий окружающей среды, в том числе возможного естественного и искусственного загрязнения химическими соединениями, на микрофлору представляют малые озера.

Образцы почв были отобраны по берегам озер Котокельское, Белое и Соленое (Сульфатное) (Приложение 2, рисунок 78). Озеро Соленое лежит в бессточной котловине к югу от пресных Убукунских озер, при этом само озеро характеризуется присутствием сульфатов, а жесткость составляет 23 мг-экв/л. Озеро Белое расположено в левобережной части долины реки Оронгой и характеризуется высокой минерализацией (12.667 г/дм³). Озеро Котокельское располагается между реками Турка и Кика, расстояние до озера Байкал составляет 2 км. Озеро пресное. Было высказано предположение, что в 2008 г в озеро попали химические соединения, послужившие причиной гибели животных, питавшихся рыбой из озера (<https://www.baikal-media.ru/news/society/119013/>)

Проведенный газохроматографический анализ почв показал, что в образцах с озера Котокельское и Белое присутствуют в следовых количествах соединения группы СОЗ – гексахлорбензол и линдан (Егорова и др., 2014). В образцах почв с озера Соленое поллютантов не обнаружено.

2.2. Бактериальные штаммы

Исследуемые бактериальные штаммы были изолированы из образцов почв с различным уровнем загрязнения. Перечень штаммов представлен в Приложении 3.

2.3. Среды, реактивы и условия культивирования

Для выделения и культивирования микроорганизмов-деструкторов были использованы:

1. минеральная среда К1, состава (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O - 4.0$, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O - 0.4$, $(NH_4)_2SO_4 - 0.5$, $Ca(NO_3)_2 - 1.0$, $MgSO_4 \times 7H_2O - 0.15$,

$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0.04$, дополненная 1 мл/л раствора микроэлементов. рН среды 7.3; (Tsoi *et al.*, 1991).

2. минеральная среда Раймонда, состава (г/л): $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0.1$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.2$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O} - 1.0$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O} - 1.5$. рН 7.4. (Raymond, 1961).
Для культивирования галотолерантных штаммов в среду вносили NaCl до конечной концентрации 10–60 г/л.
3. модифицированная среда Раймонда (БСР), состава (мг/л): к основной среде Раймонда добавляли 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта;
4. среда Лурия-Бертани (Luria-Bertani, LB), состава (г/л): дрожжевой экстракт – 5.0, триптон – 10.0, $\text{NaCl} - 10.0$. рН 7.0 (Ausbel *et al.*, 1995).
5. минеральная среда АММ (г/л): $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.2$, $\text{MgCl}_2 - 0.1$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.5$, $\text{KCl} - 0.2$, $\text{NaCl} - 1.0$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 3.0$, $\text{NaHCO}_3 - 10.0$. рН 8.0 (Заварзина и др., 2006).
6. раствор микроэлементов (г/л): ЭДТА – 2.50, $\text{ZnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 10.95$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 5.0$, $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 1.54$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0.39$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.24$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O} - 0.17$.
7. растворы витаминов (мкг/л): биотин – 0.02, тиамин – 0.5, рибофлавин – 0.5, инозитол – 0.5.

Для получения плотных сред вносили агар до 1.5 %.

В работе использованы аналитически чистые (>98%): бензол, толуол, фенол, бифенила нафталин, фенантрен, бензойная кислота (БК), 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4Д), 2-гидроксибензоат/салицилат (2-НО-БК), 3-гидроксибензоат (3-НО-БК), 4-гидроксибензоат (4-НО-БК), 2,4-дигидроксибензоат (2,4-диНО-БК), 2,5-дигидроксибензоат (2,5-диНО-БК), 3,4-дигидроксибензоат (3,4-диНО-БК), гентизат, орто-фталат, 2-хлорбензойная (2-ХБК), 3-хлорбензойная (3-ХБК), 4-хлорбензойная (4-ХБК), 2,4-дихлорбензойная (2,4-диХБК), 2,3-дихлорбензойная (2,3-диХБК), 2,5-дихлорбензойная (2,5-диХБК), 2,6-дихлорбензойная

(2,6-диХБК), 3,5-дихлорбензойная (3,5-диХБК), 3,4-дихлорбензойная (3,4-диХБК) кислоты, ПХБ 1 (2-хлорбифенил), ПХБ 2 (3-хлорбифенил), ПХБ 3 (4-хлорбифенил), ПХБ 4 (2,2'-дихлорбифенил), ПХБ 8 (2,4'-дихлорбифенил), ПХБ 12 (3,4-дихлорбифенил), ПХБ 15 (4,4'-дихлорбифенил), ПХБ 17 (2,4,2'-трихлорбифенил), ПХБ 28 (2,4,4'-трихлорбифенил), ПХБ 29 (2,4,5-трихлорбифенил), ПХБ 30 (2,4,6-трихлорбифенил), Трихлорбифенил (ТХБ) (ОСТ 6-01-24-85, Россия), Совол (ОСТ 6-01-24-75, Россия), Delor 103 (Chemko Strážske, Чехословакия).

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

В работе использованы экспериментальные смеси химически модифицированных полихлорбифенилов (Приложение 4), синтезированных в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (ИОС УрО РАН) в рамках совместно выполняемых проектов (Егорова и др., 2013, 2019; Горбунова и др., 2014, 2019; Egorova et al., 2020; Gorbunova et al., 2021).

Условия накопительного культивирования

Образцы почвы (10 г) были помещены в 250 мл колбы с 100 мл соответствующей минеральной среды. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали один из субстратов, перечисленных выше, и/или смесь полихлорированных бифенилов марки Совол. Инкубацию осуществляли 2–4 недели на термокачалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) (100 об/мин.) либо в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при +28°C.

Условия периодического культивирования бактериальных ассоциаций – 10 мл бактериальной культуры, полученной при накопительном культивировании с Соволом, помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащей 90 мл минеральной среды и 100 мг субстрата (перечень

субстратов приведен в разделе 2.5). Культивирование проводили на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C в течение 14–28 дней. Последующие пересевы (на минеральную среду и ростовой субстрат в концентрации 1 г/л) производили через каждые 7 дней. Бактериальное сообщество считали стабильным, если при 10 последовательных посевах его состав не изменялся.

Условия периодического культивирования индивидуальных культур – засев штаммов производили с твердой или жидкой среды (1 мл) в колбы Эрленмейера объемом 250 мл, содержащие 100 мл минеральной/полноценной среды и соответствующий источник углерода. Культивирование проводили на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C. Культуры поддерживали на плотных питательных средах, инкубацию осуществляли в термостате (ТС-1/80 СПУ, Россия) при +28°C.

Выделение индивидуальных штаммов производили из накопительных культур путем посева на агаризованную минеральную среду с соответствующим субстратом методом серийных разведений, из отдельных колоний выделяли чистые культуры микроорганизмов-деструкторов. Чистота культур контролировалась посевом на агаризованную среду LB.

Для длительного хранения штаммов применяли криоконсервацию (криопротектор – глицерин, температурный режим -80°C, период хранения до 10 лет с последующим посевом и повторным замораживанием).

2.4. Анализ ростовых параметров бактериальных ассоциаций и индивидуальных штаммов

Бактериальные ассоциации и индивидуальные штаммы культивировали в минеральной среде с соответствующим субстратом в условиях аэрирования

на термостатируемой круговой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C. Каждые 24 часа производили измерение оптической плотности культуры на спектрофотометре BioSpec-mini, «Shimadzu», Япония, при длине волны 600 нм. Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по классической методике

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

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

Количество колониобразующих единиц (КОЕ/мл) определяли методом серийных разведений с последующим высевом на чашки Петри с агаризованной средой LB и подсчетом колоний на 3–7 сутки культивирования при +28°C.

2.5. Ароматические соединения, использованные в качестве субстратов культивирования

Способность штаммов к утилизации различных ароматических соединений, их галогенпроизводных и возможных метаболитов определяли путем выращивания в минеральной среде при добавлении в качестве ростовых субстратов бензола, толуола, фенола, бифенила, нафталина, фенантрена, бензойной кислоты и ее хлор- и гидроксипроизводных, гентизата, *орто*-фталата, катехола, смесей ПХБ (Совола, Delor 103/ТХБ), моно- и дихлорированных бифенилов. Ароматические незамещенные соединения помещали на крышку чашки Петри с последующим культивированием «в парах», либо в жидкую среду без предварительного растворения. Ароматические кислоты предварительно растворяли в воде с доведением уровня рН до нейтрального NaOH, ПХБ предварительно растворяли в ацетоне, далее вносили в среду культивирования. Появление видимых колоний при культивировании на плотной среде и повышение

оптической плотности культуры при культивировании в жидкой среде свидетельствовало об использовании субстрата в качестве источника углерода.

2.6. Методы идентификации бактерий

Морфологические методы

Морфологию колоний описывали по общепринятым методикам (Методы общей бактериологии, 1983).

Морфологию и жизненный цикл клеток изучали у 12–72 часовых культур, выращенных на агаризованной среде LB с использованием световой микроскопии (фазовый контраст). Подвижность бактерий определяли путем микроскопирования препарата "раздавленная" капля.

Отношение к окраске по Граму изучали общепринятыми методами (Методы общей бактериологии, 1983).

Определение физиолого-биохимических характеристик

У изолированных штаммов определяли отношение к кислороду, кислотоустойчивость, образование флюоресцирующего пигмента, способность к разжижению желатина, наличие каталазы, оксидазы, фосфатазы, лецитиназы, способность к гидролизу крахмала, денитрификации, разложению тирозина, восстановлению нитратов в нитриты, OF-тест, целлюлолитическую активность, способность к росту на этаноле, образование индола, кислоты из углеводов и спиртов и использование органических кислот (Методы общей бактериологии, 1983).

Методы анализа хемотаксономических признаков

Для изучения хемотаксономических признаков грамположительные бактерии выращивали аэробно на пептонно-дрожжевой среде (глюкоза – 5 г, пептон – 5 г, дрожжевой экстракт – 3 г, K_2HPO_4 – 0.2). Диагностические аминокислоты и сахара клеточных стенок определяли, как описано (Becker *et al.*, 1964).

Обнаружение аминокислот проводили в гидролизатах целых клеток согласно методике (Becker *et al.*, 1964). Выявление сахаров и миколовых кислот проводили также в гидролизатах целых клеток, согласно (Goodfellow, Minnikin, 1985).

Экстракция липидов клеточной стенки. Культуру штамма КТ112-7 предварительно выращивали в БСР с добавлением NaCl (10–90 г/л) как описано выше. Клетки осаждали центрифугированием при 8240 g (3K30, «Sartorius», Германия) 10 мин при 20°C и высушивали до постоянной массы. Экстракцию проводили из 100 мг сухих клеток 30 мл смеси этанол – хлороформ – вода 14:7:4. Полученные экстракты центрифугировали при 15093 g 7 мин на центрифуге miniSpin («Eppendorf», Германия). Надосадочную жидкость переносили в реакторы емкостью 3 мл, помещали их в термостат на 60°C и упаривали досуха.

Анализ жирных кислот клеточной стенки. Анализ проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детекторами. В реакторы с экстрактами липидов добавляли 1 мл этилового спирта и 0.1 мл концентрированной серной кислоты, смесь перемешивали. Реактор помещали в водяную баню и выдерживали 30-40 мин при температуре 80°C, затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Далее в реактор добавляли 1 мл гексана и переносили полученную смесь в мерную пробирку на 10 мл, добавляли 5 мл дистиллированной воды и проводили отмывку-экстракцию 2 раза по 2 мин. После расслоения фаз проводили анализ гексанового слоя в условиях ГХ-ПИД и ГХ-МСД.

Условия ГХ-ПИД. Для анализа использовали газовый хроматограф «Shimadzu GC 2010» (Япония), с пламенно-ионизационным детектором, кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм. Начальная температура колонки 40°C (выдержка 3 мин), далее нагрев со скоростью 10°C/мин до 280°C (выдержка 30 мин).

Температура испарителя - 250°C, детектора 300°C, газ-носитель – азот, деление потока 1:30, расход через колонку 1.0 мл/мин. Объем пробы 1.0 мкл.

Условия ГХ-МСД. Для анализа использовали газовый хроматограф-масс-спектрометр «Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI» (США) с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм. Параметры, при которых проводился анализ: толщина пленки - 0.25 мкм; электронная ионизация 70 эВ; сканирование по полному ионному току в интервале m/z 20-1000 Da; газ-носитель – гелий, деление потока 1:50, расход через колонку 1.0 мл/мин; температура колонки – начальная 40°C (выдержка 3 мин), программирование со скоростью 10°C/мин до 290°C (выдержка 30 мин), температура испарителя – 250°C, температура источника – 230°C, квадруполь – 150°C, переходной камеры – 280°C, объем пробы 1.0 мкл.

Идентификацию компонентов проводили на основании базы масс-спектров NIST05 и анализа индивидуальных кислот. Количественную оценку проводили на основании величины хроматографических пиков.

Генетические методы идентификации бактерий

ВОХ-ПЦР. Генетическое сходство/различие выделенных штаммов определяли методом ВОХ-ПЦР по стандартной методике (Versalovic *et al.*, 1994). Продукты реакции разделяли при электрофоретической разгонке в 1.5% агарозном геле, приготовленном на 1 x TBE буфере (Маниатис и др., 1984).

Идентификация на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Амплификацию генов 16S рРНК на матрице ДНК бактерий осуществляли на приборе C1000 Touch («Bio-Rad», США) с универсальными бактериальными праймерами 27F и 1492R. Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли на приборе Genetic Analyzer 3500x1 («Applied Biosystems», США), с применением реактивов Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 («Applied Biosystems», США).

Полученные нуклеотидные последовательности проанализированы с использованием программы CLUSTAL X 1.83. и MEGA 6.0/7.0/X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей произведен по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>). Для построения филогенетических деревьев использовали алгоритм UPGMA (MEGA 6.0–X). Оценку статистической достоверности ветвления («bootstrap-анализ») проводили на основе 1000 альтернативных деревьев.

Полногеномное секвенирование. Секвенирование генома штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 осуществлено на приборе Illumina HiSeq 1500 (США) на базе ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия).

Анализ филогенетического сходства полных геномов. Для более точного установления филогенетического положения штамма был проведен тест «средней идентичности нуклеотидов (ANI)», осуществляющий сравнение полногеномной последовательности исследуемого штамма с полногеномными последовательностями штаммов из баз данных GenBank и ISJEM с применением программного обеспечения базы данных NCBI.

2.7. Модельные системы для изучения бактериальной деструкции полихлорбифенилов

Метод с «отмытыми» клетками

Бактериальные ассоциации или индивидуальные штаммы выращивали в жидкой минеральной среде с бифенилом (1 г/л) в качестве единственного источника углерода при 28°C на круговой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 («BioSan», Латвия) со скоростью 180 об/мин до ОП₆₀₀=1.0. Оптическую плотность измеряли на BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм и длине оптического пути кюветы 1.0 см. Отмытые дважды в минеральной среде клетки (1 мл, ОД₆₀₀ = 2.0) переносили во флаконы с тефлоновыми крышками («Sigma-Aldrich», Германия). В каждый флакон вносили источник углерода в виде трудноразлагаемого

соединения/смеси соединений и инкубировали на круговой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 («BioSan», Латвия) со скоростью 120 об/мин. Монохлорбифенилы добавляли до конечной концентрации 94.25 мг/л, дихлорбифенилы – 22.3 мг/л, трихлорбифенилы – 12.8 мг/л, смеси ПХБ – 0.13–0.6 г/л, смеси модифицированных ПХБ – 0.1–1.5 г/л. Биодеструкцию осуществляли при 28°C в течение 1–14 сут, в зависимости от внесенного субстрата.

Модельные почвенные системы

Для модельных систем использовали почвы, отобранные в загрязненных районах (г. Пермь, г. Калуж, г. Чапаевск, Россия), и почвы, отобранные в экологически чистом районе (заказник Предуралье). Разработано 5 схем модельных почвенных систем для изучения биодegradативного потенциала индивидуальных штаммов или их ассоциаций (рисунок 21).

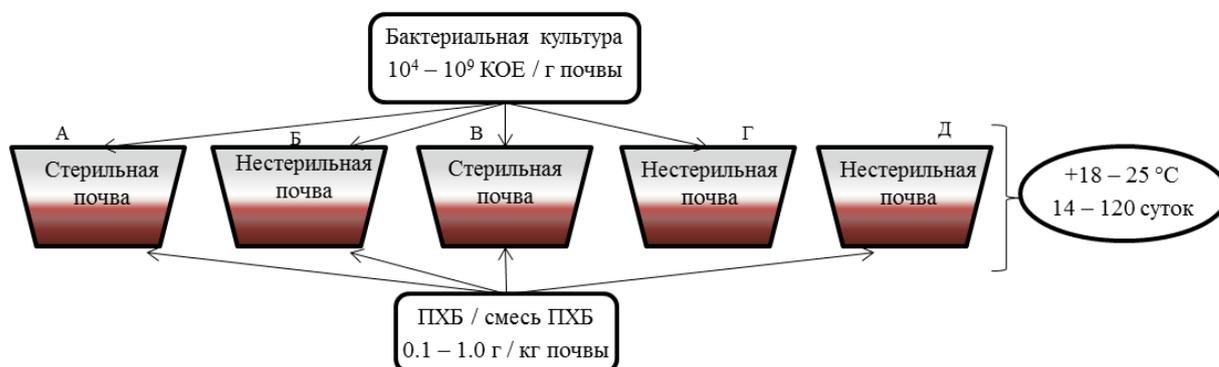


Рисунок 21 – Схемы модельных почвенных экспериментов

А) Почву (10–300 г) стерилизовали автоклавированием (1 атм., 30 мин, три раза с интервалом в 24 ч) и помещали в контейнер. Увлажнение производили минеральной средой до 40% общей влажности. Вносили в виде ацетонового раствора индивидуальные хлорбифенилы (ПХБ 1, ПХБ 3) до конечной концентрации 100 мг/кг или смеси ПХБ (искусственные смеси ПХБ, коммерческая смесь ПХБ «Совол») до конечной концентрации 0.1-1.0 г/кг почвы. Бактериальные культуры вносили в почву до конечной

концентрации клеток 10^4 – 10^9 КОЕ/г почвы. Если эксперимент производился с ПХБ-загрязненной почвой (образцы, отобранные в г. Калуж и г. Чапаевск), то дополнительно ПХБ не вносили.

Б) В модельной системе использовали нестерильную почву. Хлорированные бифенилы и бактериальные культуры вносили как в схеме А.

В) В контейнеры со стерильной почвой вносили в виде ацетонового раствора смеси ПХБ и убитые культуры штаммов-деструкторов, для оценки сорбции ПХБ клетками штаммов в модельных условиях.

Г) В нестерильную почву вносили культуры штаммов-деструкторов, как описано в схеме А, но не вносили полихлорированные бифенилы.

Д) В нестерильную почву вносили полихлорированные бифенилы как в схеме А, но не вносили штаммы-деструкторы.

Культивирование производили в стационарных условиях при температуре $+18$ – 25°C , в течение 1–4 мес.

2.8. Аналитические методы

2.8.1. Определение концентрации ПХБ

Экстракцию ПХБ из экспериментальных образцов осуществляли одним из способов:

1) культуральную жидкость экстрагировали смесью конц. H_2SO_4 –12.5%-ный ДДС–Na–гексан (1:10:25) в течение 60 мин при 30°C , скорость перемешивания 200 об/мин. Экстракты обезвоживали Na_2SO_4 ;

2) во флакон с культуральной жидкостью добавляли 0.1 мл $\text{HCl}_{\text{конц}}$, экстрагировали гексаном в соотношении водная : органическая фаза 2:1. Для лучшего разделения фаз флаконы с экстрагентом подвергали центрифугированию на центрифуге Sigma 3-16P («Sigma», Германия) со скоростью 10000 об/мин в течение 5 мин. Проводили анализ органического слоя;

3) обработку проб почвы и твердой части ила проводили по «Методике выполнения измерений массовой концентрации

полихлорбифенилов в воздухе рабочей зоны, промвыбросах, природных и сточных водах и почвах методом газожидкостной хроматографии» № 88-16358-25-2000. Пробу почвы 10 г заворачивали в фильтр «белая лента» и помещали в аппарат Сокслета и экстрагировали смесью гексан : ацетон в соотношении 50:70 в течение 3 часов. После экстракции колбу с экстрактом охлаждали до комнатной температуры. Охлажденный экстракт сливали в делительную воронку и приливали около 150 мл дистиллированной воды, встряхивали 2 раза по 2 мин. После разделения фаз водный раствор ацетона удаляли, а гексановый экстракт сушили над безводным сульфатом натрия в течение 15–20 мин. Высушенный экстракт помещали в грушевидную колбу и проводили отгонку гексана на ротационном испарителе при вакууме, создаваемом водоструйным насосом, и экстракт концентрировали до объема 3 мл. Полученный экстракт переливали в делительную воронку на 25 мл, в колбу добавляли 2 мл гексана, смывали остатки раствора и присоединяли к экстракту. Объем экстракта составил 5 мл. В воронку добавляли 2 мл концентрированной серной кислоты, встряхивали, после расслоения фаз кислотный слой отделяли, а гексановый слой промывали 10 мл дистиллированной воды. После расслоения фаз гексановый экстракт отделяли и сушили 10 мин над безводным сульфатом натрия. Проводили анализ полученного раствора.

Полученные экстракты анализировали методом газовой хроматографии с применением различных детекторов:

ГХ-ПИД условия: газовый хроматограф «Shimadzu GC 2010», с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм. Начальная температура колонки 40°C (выдержка 3 мин), далее нагрев со скоростью 10°C/мин, до 280°C (выдержка 30 мин). Температура испарителя 250°C, детектора 300°C. Газ-носитель – азот, деление потока 1:30, расход через колонку 1.0 мл/мин. Вводили 1.0 мкл.

ГХ-ЭЗД условия: газовый хроматограф «Shimadzu GC 17A», с электронно-захватным детектором (ГХ-ЭЗД), кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм. Начальная температура колонки 40°C (выдержка 3 мин), далее нагрев со скоростью 10°C/мин, до 270°C (выдержка 30 мин). Температура испарителя 250°C, детектора 300°C. Газ-носитель – азот, деление потока 1:30, расход через колонку 1.0 мл/мин. Вводили 1.0 мкл.

ГХ-МСД условия: а) газовый хроматограф GC6890N («Agilent Technology», США) с масс-селективным детектором MSD5973N («Agilent Technology», США) и кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS SN US15189741-1 (30 м x 0.25 мм) («Agilent Technology», США) при программировании температуры согласно (Hernandez *et al.*, 1997). Газ-носитель – гелий (1 мл/мин), температура испарителя 230°C. Объем пробы 0.2 мкл;

б) газовый хроматограф-масс-спектрометр «Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XL EI/CI» с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором, кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщина пленки 0.25 мкм.; электронная ионизация (70 эВ); сканирование по полному ионному току в интервале m/z 20-1000 аму; газ-носитель – гелий, деление потока 1:50, расход через колонку 1.0 мл/мин; температура колонки – начальная 40°C (выдержка 3 мин), программирование со скоростью 10°C/мин до 290°C (выдержка 30 мин), температура испарителя – 250°C, температура источника – 230°C, квадруполь – 150°C, переходной камеры – 280°C. Вводили 1.0 мкл.

Расчет содержания ПХБ/модифицированных ПХБ в каждом исследуемом образце проводили методом внутренней нормализации, рассчитывая вклад отдельных соединений в суммарную площадь пиков. На основании полученных расчетных площадей пиков оценивали содержание исходных ПХБ/модифицированных ПХБ после процесса биодеструкции.

2.8.2. Анализ продуктов расщепления ПХБ

Для анализа культуральную жидкость очищали от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g в течение 3 мин на центрифуге miniSpin («Eppendorf», Германия)). Образование продуктов расщепления ароматического кольца хлорбифенилов – 2-гидрокси-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК) анализировали в надосадочной жидкости на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ от 390 нм до 440 нм. Для количественного определения использовали коэффициент экстинкции ($8\text{Cl-ГОФДК} = 28100 \text{ l}/(\text{M} \times \text{cm})$, $9\text{Cl-ГОФДК} = 17500 \text{ l}/(\text{M} \times \text{cm})$) (Fortin *et al.*, 2005) согласно формуле:

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

где A – значение оптической плотности при длине волны с максимальным поглощением, ε – коэффициент молярной экстинкции, $1/(\text{M} \times \text{cm})$, c – концентрация, M , l – длина оптического пути кюветы, см.

2.8.3. Анализ концентрации основных метаболитов бактериальной деструкции ПХБ

Метаболиты деструкции хлорбифенилов и модифицированных хлорбифенилов определяли в культуральной жидкости, освобожденной от клеток центрифугированием (описано выше), методом ВЭЖХ. Были использованы хроматограф LC-10ADvp («Shimadzu», Япония) с колонкой Lichrosorb RP-18 10U (250 x 4.6 мм) («Alltech», США) и УФ-детектором, а также хроматограф LC-20AD Prominace («Shimadzu», Япония) с колонкой (C-18 150x4.6 мм; «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором SPD-20A. Анализ проводили в системе ацетонитрил–0.1%-ная H_3PO_4 (70:30 или 60:40). Детекцию осуществляли при длине волны 205 нм, 226 нм и 232 нм. Идентификацию продуктов метаболизма проводили при сравнении времени удержания на колонке образовавшихся и стандартных соединений (Maltseva *et al.*, 1999). Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине

площади и высоты пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений.

2.8.4. Анализ концентрации ионов хлора

Динамику дегалогенирования контролировали измерением оптической плотности раствора хлорида серебра, образующегося через 5 мин реакции ионов хлора с азотнокислым серебром, на спектрофотометрах КФК-3 (Россия) и UV-Visible Bio-Spec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ 460-540 нм (длина оптического пути кюветы 1 см) в культуральной жидкости, освобожденной от клеток. Концентрацию ионов хлора рассчитывали по калибровочным графикам. Для построения калибровочного графика брали растворы хлорида натрия в концентрации от 0.001 до 0.4 г/л.

2.9. Определение активности ферментов разложения основных метаболитов деструкции ПХБ

Биомассу штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxudans* B51 для выделения и очистки ферментов выращивали в условиях периодического культивирования как описано выше, используя бензойную кислоту, 2-ХБК или 4-ХБК в качестве единственного источника углерода и энергии (1 г/л). Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали 50 мМ трис-НСl буфером, рН 7.4. Биомассу хранили при -20°C.

Бесклеточный экстракт получали методом экструзионной дезинтеграции на прессе типа Хьюза как описано ранее (Суворова и др., 2006).

Определение активности ферментов проводили спектрофотометрически, используя спектрофотометр UV-160 («Shimadzu», Япония), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при 25°C.

Активность *para*-гидроксibenзоат гидроксилазы (ПГБГ, КФ 1.14.13.33) определяли по НАДН или НАДФН-зависимому снижению поглощения при 340 нм. Реакционная смесь содержала 100 мМ трис/НСl, рН 7.8, 1мМ

n-гидроксibenзоата, 0.2 мМ НАДН или НАДФН, 0.5 мМ ЭДТА, 10 мкМ FAD (Jadan *et al.*, 2004). Фермент преинкубировали с FAD и НАДФН в течение 5 мин, реакцию начинали добавлением ПГБК. Расчет активности ПГБГ проводили по НАДН (коэффициент молярной экстинкции для НАДН или НАДФН составляет $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Активность протокатехоат 4,5-диоксигеназы (ПКК 4,5-ДО, КФ 1.13.11.8) определяли по увеличению поглощения при 410 нм, соответствующему образованию 2-гидрокси-4-карбоксимуконowego полуальдегида, используя для расчета коэффициент молярной экстинкции, равный $11200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ono *et al.*, 1970).

Активность протокатехоат 3,4-диоксигеназы (ПКК 3,4-ДО, КФ 1.13.11.3) определяли по снижению поглощения при 290 нм, соответствующему убыли протокатехоата. Реакционная смесь содержала 50 мМ трис/HCl буфер, pH 7.5, и субстрат, реакцию начинали внесением фермента, для расчета активности использовали коэффициент молярной экстинкции, равный $6.77 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Stanier *et al.*, 1954).

Активность катехол 1,2-диоксигеназы (ПК 1,2-ДО, КФ 1.13.11.1) и катехол 2,3-диоксигеназы (ПК 2,3-ДО, КФ 1.13.11.2) определяли как описано ранее (Haddad *et al.*, 2001).

Единицу активности определяли как количество фермента, катализирующее превращение 1 мкМ субстрата или образование 1 мкМ продукта в минуту.

Очистку ПГБГ проводили, используя 50 мМ трис/HCl буфер, pH 7.2, содержащий 10 мкМ FAD, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ДТТ (буфер А). Бесклеточный экстракт наносили на колонку с Q-Sepharose (2.6×20 , объем носителя 60 мл), предварительно уравновешенную стартовым буфером. Белки элюировали линейным возрастающим градиентом 0-0.5 М NaCl в 1200 мл стартового буфера со скоростью 2 мл/мин. Фракции, содержащие активность ПГБГ, объединяли, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1.6 М и после центрифугирования (20000g, 20 мин) наносили

на колонку (1.6×20 , объем носителя 30 мл) с Buthyl-Sepharose, предварительно уравновешенную буфером А с 1.6 М сульфата аммония. Белки элюировали линейным снижающимся 1.6-0 М градиентом сульфата аммония в 300 мл стартового буфера. Фракции с активностью ПГБГ объединяли, концентрировали в ячейке с мембраной РМ-10 и наносили на колонку Superdex 75 (1.6×60), уравновешенную буфером А с 0.1 М NaCl. Наиболее активные фракции объединяли и наносили на колонку Resource Q (6 мл) уравновешенную буфером А. Элюцию вели возрастающим линейным градиентом 0-0.5 М NaCl со скоростью 2 мл/мин. Наиболее активные фракции объединяли, концентрировали в ячейке с мембраной РМ-10 и хранили в присутствии 10 мкМ ФАД, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ДТТ. Для определения активности ПГБГ использовали ПГБК и НАДН.

При очистке протокатехоат диоксигеназы бесклеточный экстракт наносили на колонку с Q-Sepharose (2.6×20 , объем носителя 60 мл), уравновешенную 50 мМ трис/HCl буфером, pH 7.5 (буфер Б), элюировали возрастающим линейным градиентом 0-0.5 М NaCl в 1200 мл стартового буфера со скоростью 2 мл/мин. Фракции, содержащие активность ПКК ДО, объединяли и наносили на колонку Resource Phe (объем 1 мл), уравновешенную буфером Б, содержащим 1.6 М сульфата аммония. Элюцию вели снижающимся 1.6-0 М градиентом сульфата аммония в 25 мл стартового буфера со скоростью 1 мл/мин. После проведения гель-фильтрации в колонке с Superdex 75 (16×60), уравновешенной буфером Б с 0.1 М NaCl, к активным фракциям добавляли сульфат аммония до 1.6 М и после центрифугирования наносили на колонку Resource Iso (1 мл), элюируя белки снижающимся линейным градиентом сульфата аммония 1.6-0 М в 25 мл буфера со скоростью 2 мл/мин. Далее следовала ионообменная хроматография на колонке Resource Q (6 мл) с элюцией возрастающим 0-0.5 М градиентом NaCl в 90 мл стартового буфера со скоростью 2.5 мл/мин. Активные фракции объединяли и использовали для характеристики

ферментов. ПКК использовали в качестве субстрата во время очистки ПКК ДО.

Все процедуры по оценке чистоты и количеству белков, определения их состава и массы проводили как описано ранее (Суворова и др., 2006).

Константы Михаэлиса (K_m) и значения V_{\max} определяли методом двойных обратных величин в координатах $1/V_0$ от $1/S$, где S – концентрация субстрата.

2.10. Молекулярно-генетические методы

Выделение тотальной ДНК

Тотальную ДНК выделяли из образцов почвы с использованием коммерческого набора реактивов FastDNA Spin Kit («MP Biomedicals», США), из индивидуальных культур бактерий и бактериальных ассоциаций – методом щелочного лизиса (Ausbel *et al.*, 1995). Концентрацию полученной ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer («Invitrogen», США) с использованием реактивов производителя.

Выявление структуры микробного сообщества

Анализ структуры микробного сообщества проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ). Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК, составляющего 566 п.н. по нумерации *E. coli*, применяли праймеры: 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост на 5'-конце, и 518R (Tiirola *et al.*, 2005). Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 0.25 мМ дНТФ, 0.3 мкМ праймера (каждого), 1.5 мМ $MgCl_2$, 1x *Green* буфер для *Dream Taq*-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США), 2 ед. акт. *Dream Taq*-полимеразы («Thermo Fisher Scientific», США) и 2мкл ДНК-матрицы в термоциклере My Cycler («Bio-Rad», США). Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле в 0.5x TBE-буфере в напряжении электрического поля 5.0 V/см в течение 40 минут. ДНК была визуализирована после окрашивания

бромистым этидием (0.5 мкг/мл) в проходящем УФ-свете и документирована системой Gel Doc XR («Bio-Rad», США).

ДГГЭ фрагментов гена 16S рРНК был выполнен в 6% (в/об) полиакриламидном геле, содержащем линейный денатурирующий химический градиент от 30 до 60%, где 100% составляет 7М мочевины и 40% формамид. Разделение проводили в течение 16 часов при 45 V и 60°C на приборе Dcode™ Universal Mutation System («Bio-Rad», США). Гели красили 15 мин в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл), визуализировали в проходящем УФ-свете и документировали системой Gel Doc XR («Bio-Rad», США).

Анализ ДГГЭ-профилей осуществляли путем детекции полос в геле, используя алгоритм поиска полос пакета программ Quantity One 4.6 («Bio-Rad», США). Для расчета степеней сходства ДГГЭ-профилей использовали коэффициент Дайса, построение дендрограммы осуществляли с помощью метода UPGMA из пакета программ Quantity One 4.6 («Bio-Rad», США). Полученные ДГГЭ-профили были проанализированы с помощью индекса Шеннона-Уивера. При этом предполагалось, что одна полоса в геле (операциональная таксономическая единица (ОТЕ)) соответствует одному виду, а интенсивность свечения отражает ее численность. При операциях учитывали положение полосы в геле. В анализ включали полосы, имеющие выше 0.2% от суммарной интенсивности полос дорожки.

Для подготовки к секвенированию фрагменты ДНК были элюированы из геля и использованы в качестве матрицы для амплификации с праймерами 27F и 518R. Описание условий секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей приведены ниже, в главе 2.10.7.

Методы выделения плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали метод щелочного лизиса, метод Бабыкина, метод Портного-Уайта, а также метод пульс-

электрофореза (Бабыкин и др., 1984, Методы общей бактериологии, 1983; Marko *et al.*, 1982,).

Пульс-электрофорез осуществляли с использованием прибора CHEF DR II («Bio-Rad Laboratories», США). Штаммы выращивали в минеральной среде с соответствующим углеводородом (БК, бифенил (1 г/л)) или в среде LB до $ОП_{600}=1.0$. Клетки осаждали центрифугированием (9660 g, 3 мин) и отмывали дважды в ТЭ-буфере (10мМ трис/HCl, pH 7.6; 1 мМ ЭДТА, pH 8.0). Агарозные блоки готовили согласно рекомендациям производителя («Bio-Rad», США). Блоки обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) при 37°C в течение 5–16 ч, протеиназой К (1 мг/мл) – при 50°C в течение 12-18 ч, нуклеазой S1 (5 ед. на агарозный блок) – при 37°C, 3.5 ч. Электрофорез образцов осуществляли в 1%-ном агарозном геле (Pulsed Field Certified Agarose, «Bio-Rad», США) в 0.5 ТБЭ-буфере (108 г трис, 55 г борная кислота, 40 мл 0.5М ЭДТА, до 1 л H₂O) при 14°C, 6 V/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 геле-документации («Bio-Rad», США). Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad», США).

Амплификация функциональных генов

Для амплификации функциональных генов использовали праймеры, представленные в таблице 3. Амплификацию функциональных генов проводили на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США) согласно протоколов (Шумкова, Плотникова, 2013; Mesarch *et al.*, 2000; Hickey, Sabat, 2001; Baldwin *et al.*, 2003; García *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Baggi *et al.*, 2008; Iwai *et al.*, 2011).

Таблица 3 – Олигонуклеотиды, использованные при ПЦР-анализе функциональных генов

Ген / праймеры	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Литература
1	2	3	4	5
<i>bphA1</i> / <i>bphA</i>		F: 5'-AAGGCCGGCGACTTCATGAC-3' R: 5'-TGCTCCGCTGCGAACTTCC-3'	452	Baldwin <i>et al.</i> , 2003
<i>bphA1</i> / BPHD-f3 <i>bphA1</i> / BPHD-r1		F: 5'-AACTGGAARTTYGCIGCVGA-3' R: 5'-ACCCAGTTYTCICCRTCGTC-3'	520	Iwai <i>et al.</i> , 2011
<i>bphA1</i> / BphA1F450	Бифенил диоксигеназа	F: 5'-CCGGCGACTTYATSACSAMSTACAT-3' R: 5'-ACCCAGTTYTCICCRTCGTC-3'	970	Шумкова и Плотникова, 2013
<i>bphA1</i> / BPHD-r1 <i>bphA1</i> / BphA1F462	(α - субъединица) (КФ 1.14.12.18)	F: 5'-TGACCACGTACATGGGBGARGA-3' R: 5'-ACCCAGTTYTCICCRTCGTC-3'	960	Шумкова и Плотникова, 2013
<i>bphA1</i> / BphA1R900		R: 5'-TCSGCDGCRAWYTTCCAGTT-3'		Шумкова и Плотникова, 2013
<i>benA</i> , / <i>benA</i>	Бензоат диоксигеназа	F: 5'-GCCCACGAGAGCCAGATTCCC-3' R: 5'-GGTGGCGGCGTAGTTCCAGTG-3'	521	Baggi <i>et al.</i> , 2008
<i>ohbA</i> / <i>ohbA</i>	(α - субъединица) (КФ 1.14.12.10) <i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа	F: 5'-GAGGGTCAAGAGGAGGGAGAGTTGATGAAC-3' R: 5'-GGCGCACGAGGAGCGTGTTCGATTA-3'	547	Hickey, Sabat, 2001
<i>ohbB</i> / <i>ohbB</i>	(β - субъединица) (КФ 1.14.12.13) <i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа	F: 5'-GCGGACAAGCGTTTTTCGATACAGGA-3' R: 5'-GCTTGCAGTTGCGCTTGATGAT-3'	580	Hickey, Sabat, 2001

1	2	3	4	5
<i>fcxA</i> / <i>fcxA</i>	4ХБК-КоА-лигаза (КФ 6.2.1.33)	F: 5'-AACTGATCCGCCGAGACAACATTC-3' R: 5'-AGGCATTTTTTCGAGACGCTTCA-3'	599	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
<i>fcxB</i> / <i>fcxB</i>	4ХБК-КоА- дегалогепаза (КФ 3.8.1.6)	F: 5'-GGTCCAGCGAGCGAAATCCAGTC-3' R: 5'-CCCCCGCACACCGCATCAAG-3'	599	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
<i>C23O</i> , / <i>cat238</i>	Катехол 2,3- диоксигеназа (КФ 1.13.11.2)	F: 5'-CGACCTGATCTCCATGACCGA-3' R: 5'-TCAGGTCAGCACGGTCA-3'	238	Mesarch <i>et al.</i> , 2000
<i>clcA</i> / <i>clcA</i>	Хлоркатехол 1,2- диоксигеназа (КФ 1.13.11.1)	F: 5'-ACGAGTCATGGATAAACGA-3' R: 5'-TTGCGTTGCTCGGCCTGCTCA-3'	720	Baggi <i>et al.</i> , 2008
<i>pcaH</i> / Pro3.4	Протокатехоат 3,4- диоксигеназа (β-субъединица) (КФ 1.13.11.3)	F: 5'-GCSCCSCTSGAGCCSAACTTC-3' R: 5'-GCCGCGSAGSACGATRTCGAA-3'	336	García <i>et al.</i> , 2005

Рестрикционный анализ

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) проводили в соответствии с рекомендациями (Маниатис и др., 1984). Обработку ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили при 37°C в течение 1–2 часов в объеме реакционной смеси 20 мкл. Реакцию останавливали прогреванием при 65°C 10 минут. В работе использовали эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *HhaI* и *HaeIII* («Boehringer Mannheim», Германия; «Fermentas», Литва).

Визуализация амплифицированных фрагментов ДНК

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в агарозном геле (концентрация агарозы 0.8–1.5%) в 1x Трис-боратном буфере («Thermo scientific», Литва) при напряжении 10 V/см. Для нанесения проб использовали буфер (20 % фикал (тип 400), 0.1 M Na₂ЭДТА, 1.0 % SDS, 0.25 % бромфенол синий, 0.25 % ксилоцианол). Агарозные гели окрашивали раствором бромистого этидия (1–2 мкг/мл) в течение 15–20 минут и визуализировали в проходящем УФ-свете с использованием системы Gel Doc XRtm («Bio-Rad», США).

Секвенирование и анализ продуктов амплификации функциональных генов

Определение нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов функциональных генов проводили по методу Сэнгера с применением наборов CEQ Cycler Sequencing kit («JSC GE Healthcare», США) и Big Dye Terminator Ready Reaction kit 3.1 («Applied Biosystems», США) на приборах MegaBACE 1000 («JSC GE Healthcare», США) и Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ CLUSTAL W, CLUSTAL X 1.83 TREECON v. 1.3b, CLC Sequence Viewer 6.5.3, MEGA 6.0/7.0/X (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных

последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогенетический и кластерный анализ, а также визуализацию деревьев выполняли в программах MEGA. Статистическую достоверность ветвления («bootstrap»-анализ) оценивали на основе 1000 альтернативных деревьев. Дедуктивные аминокислотные последовательности получали на основании нуклеотидных последовательностей с использованием программ MEGA.

Анализ полногеномной нуклеотидной последовательности

Анализ нуклеотидной последовательности генома штаммов-деструкторов осуществляли с использованием платформ PATRIC 3.6.6. (<https://patricbrc.org>) и SEED Viewer 2.0. (<https://rast.nmpdr.org/>), а также пакета программ CONTIGuator_v2.7. и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Депонирование нуклеотидных последовательностей

Данные по нуклеотидным последовательностям амплифицированных участков функциональных генов, гена 16S рРНК и полногеномная последовательность депонированы в международной базе данных GenBank. Номера приведены ниже, в главе 4 и Приложении 3.

2.11. Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы и метаболических путей

Пути разложения бифенила, хлорированных бифенилов, химически-модифицированных хлорбифенилов и основных метаболитов анализировали и моделировали, основываясь на базах данных Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info>), KEGG (<http://www.genome.jp>), ExplorEnz (<http://www.enzyme-database.org>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с учетом экспериментальных результатов по метаболическому профилю, активности ферментов и исследованию функциональных генов.

Первичную, вторичную и третичную структуру α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы моделировали на основе экспериментально определенной нуклеотидной последовательности с применением известных моделей ферментов класса диоксигеназ с использованием программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net>), SwissDock (<https://www.swissdock.ch>), SwissModel (<https://www.swissmodel.expasy.org>), UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>).

2.12. Кинетические параметры деструкции ПХБ

Эффективность деструкции хлорбифенилов и их производных оценивали в процентах согласно формуле:

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

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

Для описания процесса разложения хлорбифенилов при разной концентрации NaCl в среде использовали 4 математические модели анализа данных с применением аппроксимации:

$$C_t - C_0 = Kt; T_{1/2} = C_0 / 2K_0$$

$$\ln C_t = K_1 t + \ln C_0; T_{1/2} = \ln 2 / K_1$$

$$1/C_t = 1/C_0 + K_2 t; T_{1/2} = C_0 / 2K_2$$

$$C_t = C_0 e^{-Kt}; T_{1/2} = \ln 0.5 / -K'$$

где C_t – концентрация хлорбифенила через определенный промежуток времени; C_0 – концентрация хлорбифенила в начальный момент времени; K – константа деструкции, $ч^{-1}$; $T_{1/2}$ – период полужизни (полуразложения) субстрата.

Также для анализа кинетических параметров деструкции вычисляли уравнение первого приближения зависимости концентрации субстрата от времени инкубации с учетом коэффициента достоверности аппроксимации (R^2) и последующим вычислением периода полуразрушения субстрата ($T_{1/2}$).

Скорость деструкции субстрата рассчитывали по формуле

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

где C_0 – концентрация смеси ПХБ в начальный момент времени, мг/л, C_i – концентрация смеси ПХБ в конечный момент времени, мг/л, t_i – конечный момент времени, сут, t_0 – начальный момент времени, сут, $C_{\text{клет}}$ – концентрация клеток бактериальной ассоциации, г.

Концентрацию клеток рассчитывали исходя из того, что 0.432 мг сухих клеток соответствует 1 мл бактериальной суспензии с $ОП_{600} = 1.0$ о.е.

Удельную скорость деструкции смесей ПХБ и химически модифицированных ПХБ рассчитывали по формуле

$$V_{\text{уд}} = (\ln C_0 - \ln C_i) / (t_i - t_0),$$

где C_0 – концентрация смеси ПХБ в начальный момент времени, мг/л, C_i – концентрация смеси ПХБ в конечный момент времени, мг/л, t_i – конечный момент времени, сут, t_0 – начальный момент времени, сут.

2.13. Безопасность штаммов-деструкторов для животных и человека

Определение антибиотикочувствительности бактериальных штаммов проводили диско-диффузионным методом (Методич. указ..., 2004). Использовали бумажные диски с антибактериальными препаратами в стандартных концентрациях (Минмедпром РФ ПО «Мосмедпрепарат»). Исследовали чувствительность штаммов по отношению к четырем группам антибиотиков: «а» (β -лактамы) – бензилпенициллин, ампициллин, оксациллин; «б» (аминогликозиды) – стрептомицин, неомицин; «е» (препараты группы левомецетина) – левомецетин; «з» (антибиотики разных химических групп) – ристомицин. Диски помещали в чашки Петри с агаризованной полноценной средой LB, инокулированной бактериальной культурой, на расстоянии 15–20 мм друг от друга. Инокулят готовили в концентрации 1.5×10^8 КОЕ/мл, культуру брали в экспоненциальной фазе роста, и по 100 мкл равномерно распределяли по поверхности среды в чашке

Петри. Инкубацию осуществляли в течение 24–48 часов при 28°C. Учет результатов проводили в отраженном свете. Диаметр зоны задержки бактериального роста измеряли с точностью до 1 мм.

Токсичность штаммов Microbacterium sp. B51 и R. ruber P25 для животных и человека определяли на клинически здоровых беспородных белых мышах массой 17–20 г. Бактериальную суспензию готовили на основе убитых прогреванием культур исследуемых штаммов в дозе 1.4×10^5 и 2.5×10^7 КОЕ/животное (доза, максимально возможная для введения) и вводили экспериментальным животным внутрижелудочно по 0.5 мл. Контрольным животным вводили 0.5 мл физиологического раствора (0.9% NaCl). Каждая экспериментальная и контрольная группы включали в себя по шесть мышей. Наблюдение вели ежедневно в течение трех суток, токсический эффект оценивали по проявлению характерного симптомокомплекса и по количеству летальных случаев в экспериментальных группах (Частная..., 2005).

2.14. Статистическая обработка данных.

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

ГЛАВА 3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ- ДЕСТРУКТОРОВ БИФЕНИЛА/ПХБ

3.1. Разнообразие аэробных бактерий, осуществляющих деструкцию (хлор)ароматических соединений

Анализ литературных данных показал, что аэробные штаммы-деструкторы бифенила/ПХБ широко распространены в различных почвах, подвергнутых химическому загрязнению (Bedard *et al.*, 1987, Field, Sierra-Alvarez, 2008; Ang *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Gioia *et al.*, 2014; Vilo *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Hirose *et al.*, 2015; Suenaga *et al.*, 2015). В настоящем исследовании осуществлен скрининг почв, характеризующихся различным уровнем химического загрязнения, на присутствие в них бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ и возможных промежуточных соединений разложения ПХБ - хлорбензойных кислот (рисунок 22).

В работе использованы образцы почв девяти территорий (РФ, Украина), отличающихся экологическими условиями, количеством и качеством загрязнителей (см. раздел 2.1, Приложение 2). Используя метод накопительного культивирования, где в качестве селективного фактора применяли бифенил, ПХБ, бензойную кислоту, ХБК, выделено и описано 313 штаммов, обладающих активностью к (хлор)ароматическим соединениям (рисунок 22, Приложение 3).

Идентификация изолированных штаммов с применением комплекса методов показала, что наибольшее филогенетическое разнообразие представлено среди штаммов-деструкторов, выделенных из почв с территории г. Перми (125 штаммов, 15 родов), а наименьшее – среди штаммов, выделенных из почв г. Серпухов (9 штаммов, 1 род). Следует отметить, что преобладающими поллютантами в почвах г. Серпухов являются ПХБ, тогда как в почвах г. Перми представлен широкий спектр



Рисунок 22 – Общая схема результатов выделения штаммов-деструкторов (галоген)ароматических соединений из почв, отличающихся экологическими условиями и спектром загрязняющих веществ

(галоген)ароматических синтетических соединений (Рыбкина и др., 2005; Рыбкин, Рыбкина, 2006; Лапушкин и др., 2020; Egorova, Vuzmakov, 2020). Статистический анализ показал, что существует сильная прямая корреляционная зависимость между разнообразием химических загрязнителей в почве и филогенетическим разнообразием изолированных штаммов-деструкторов бифенила (коэффициент корреляции Пирсона составляет 0.924). Взаимосвязь между преобладающим типом загрязнения в почве и доминирующим филумом штаммов-деструкторов не установлена.

В экспериментах по биоремедиации ПХБ-загрязненных почв описано, что снижение концентрации бифенила/ПХБ приводит к увеличению филогенетического разнообразия бактерий и смене доминирующих видов. Так, индекс Шеннона, характеризующий разнообразие микрофлоры в ризосфере, в экспериментах по очистке почв от ПХБ 77 за 105 дней увеличивался в 1.05 – 1.18 раза (Tu *et al.*, 2017). В экспериментах с меченым углеродом в составе бифенила показано, что через 2 сут ремедиации в сообществах преобладали представители семейства *Sphingomonadaceae* (род *Kaistobacter*), на 4 сутки доминантную позицию занимали представители семейств *Xanthomonadaceae* и *Isosphaeraceae*, а через 6 суток наиболее многочисленными группами становятся бактерии семейств *Isosphaeraceae*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Enterobacteriaceae* (Song *et al.*, 2018). Полученные в настоящем исследовании данные позволяют предположить, что данная закономерность проявляется не только в условиях эксперимента, но и в природных условиях.

В ряде работ указано, что при однотипном загрязнении природных субстратов (почв, донных отложений), когда преобладают поллютанты схожего химического строения, филогенетическое разнообразие штаммов-деструкторов ограничивается несколькими родами. Из образцов донных отложений, загрязненных преимущественно ПХБ (0.2–1.66 мг/кг), выделено шесть штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* и один штамм рода *Sphingomonas* (Kolar *et al.*, 2007). Из почв, отобранных в Мексике и

загрязненных трансформаторным маслом (преимущественно ПХБ), изолированы три штамма рода *Ochrobactrum*, и по одному штамму родов *Pandoraea* и *Brevibacterium* (Liz *et al.*, 2009). Штамм-деструктор *Achromobacter xylosoxidans* IR08 выделен из ПХБ-загрязнённых почв Нигерии (Pori *et al.*, 2008). В настоящем исследовании из почв, преимущественно загрязненных ПХБ (образцы из г. Калуш) удалось изолировать штаммы-деструкторы бифенила родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Напротив, штаммы-деструкторы, выделенные из почв с широким спектром загрязнений (образцы почв с территории ОАО «Галоген», г. Пермь и ПАО «Уралкалий», г. Березники) принадлежали десяти и восьми различным родам соответственно. Подобным разнообразием характеризовались штаммы донных отложений, загрязненных отходами мусороперерабатывающего завода на территории Китая (Su *et al.*, 2015).

Доминирующая филогенетическая группа среди бактерий, осуществляющих трансформацию бифенила/ПХБ, по всей видимости, определялась не только составом поллютантов, присутствующих в почве/донных отложениях, но и другими факторами. В образцах почв MZ1 и MZ2, отобранных в Мексике и загрязненных ПХБ, доминирующими являлись представители филумов *Actinobacteria* (42.79%) и *Firmicutes* (42.32%), а представители филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexis* и *Gemmatimonadetes* занимали минорное положение (Cervantes-Gonzalez *et al.*, 2019). В работе (Matturo *et al.*, 2015) показано, что в ПХБ-загрязненных осадках доминируют *Proteobacteria* (58.4%). Также *Proteobacteria* (44–48%) преобладали в почвах, загрязненных коммерческой смесью ПХБ Delor 103 (Stella *et al.*, 2015). В ряде работ отмечено, что в почвах, загрязнённых отдельными конгенерами ПХБ или коммерческой смесью Aroclor 1224, доминантами являлись как представители *Proteobacteria*, так и *Actinobacteria* (Macedo *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2010). В настоящем исследовании показано, что в почвах, отобранных на территориях г. Калуш, содержащих ПХБ коммерческих смесей Delor 103/ПХБ и Совол, доминирующее положение

занимали штаммы-деструкторы бифенила филума *Actinobacteria* (62%), тогда как в почвах г. Серпухов, также загрязнённых ПХБ, доминантами, среди штаммов-деструкторов бифенила, являлись представители филума *Proteobacteria* (100%). Интересно отметить, что в почвах ООПТ «Осинская лесная дача» и г. Чапаевска, часть спектра поллютантов которых качественно совпадает, также преобладают штаммы-деструкторы филума *Proteobacteria* (65% и 75%, соответственно). При этом в почвах, загрязнённых широким спектром галогенароматических соединений, отобранных с территорий ОАО «Галоген», ОАО «Уралкалий» и ОАО «Пермский завод смазок и СОЖ», доминантными группами являлись *Proteobacteria* (47%), *Actinobacteria* (53%) и *Firmicutes* (50%), соответственно. Отсутствие статистически значимых закономерностей и анализ опубликованных данных подтверждает наше предположение, что доминирование филогенетической группы штаммов-деструкторов имеет сложную зависимость от целого ряда факторов.

3.2. Бактериальное разложение индивидуальных конгенов хлорированных бифенилов, содержащих заместители в одном из колец молекулы

Особенности бактериальной трансформации конгенов ПХБ, содержащих заместители в одном кольце молекулы были изучены у бактерий родов *Bacillus* (11 штаммов), *Microbacterium* (7 штаммов), *Rhodococcus* (42 штамма), *Pseudomonas* (53 штамма). В качестве субстрата деструкции использовали ПХБ 1 – 2-хлорбифенил, ПХБ 2 – 3-хлорбифенил, ПХБ 3 – 4-хлорбифенил, ПХБ 12 – 3,4-дихлорбифенил, ПХБ 29 – 2,4,5-трихлорбифенил и ПХБ 30 – 2,4,6-трихлорбифенил (таблица 4).

Увеличение числа заместителей в молекуле хлорбифенила оказывало влияние на эффективность разложения. Установлено, что у штаммов *Bacillus* sp. BD, BP9ST, Ch5-7, DI, EK1, EK2, EK4, EK6, K25, K53, MD7, *Microbacterium oxydans* B51, Ch2-8, *M. foliorum* BN2, *Microbacterium* sp. EK24, EK26, EK29, EK28, *Rhodococcus ruber* P25, S9a, *R. erythropolis* B7b,

Таблица 4 – Разложение аэробными бактериальными штаммами хлорированных бифенилов* с заместителями в одном кольце

ПХБ	Эффективность деструкции, %	Удельная скорость деструкции, ч ⁻¹	ГОФДК: $\lambda_{\text{макс}}$ / ОП (о.е.)	ХБК
Штаммы рода <i>Bacillus</i>				
ПХБ 1	100	0.048–0.051	н.д.	2-ХБК
ПХБ 2	100	0.048–0.049	н.д.	3-ХБК
ПХБ 3	100	0.053–0.055	н.д.	4-ХБК
ПХБ 12	100	0.041–0.048	$\lambda_{\text{макс}}=390$ / <0.098	3,4-ХБК
ПХБ 29	98–99	0.027–0.032	$\lambda_{\text{макс}}=394$ / <0.351	2,4,5-ХБК
ПХБ 30	98–99	0.029–0.034	$\lambda_{\text{макс}}=449$ / <0.254	2,4,6-ХБК
Штаммы рода <i>Microbacterium</i>				
ПХБ 1	100	0.051–0.052	$\lambda_{\text{макс}}=395$ / <0.068	2-ХБК
ПХБ 2	100	0.050–0.051	$\lambda_{\text{макс}}=392$ / <0.051	3-ХБК
ПХБ 3	100	0.051–0.053	$\lambda_{\text{макс}}=434$ / <0.012	4-ХБК
ПХБ 12	100	0.045–0.047	$\lambda_{\text{макс}}=390$ / <0.157	3,4-ХБК
ПХБ 29	96–97	0.021–0.025	$\lambda_{\text{макс}}=394$ / <0.134	2,4,5-ХБК
ПХБ 30	95–97	0.021–0.023	$\lambda_{\text{макс}}=449$ / <0.275	2,4,6-ХБК
Штаммы рода <i>Rhodococcus</i>				
ПХБ 1	96–100	0.148–0.149	$\lambda_{\text{макс}}=390$ / <0.268	2-ХБК
ПХБ 2	96–100	0.143–0.145	$\lambda_{\text{макс}}=392$ / <0.401	3-ХБК
ПХБ 3	96–100	0.142–0.144	$\lambda_{\text{макс}}=416$ / <0.538	4-ХБК
ПХБ 12	75–98	0.091–0.097	$\lambda_{\text{макс}}=390$ / <0.372	3,4-ХБК
ПХБ 29	69–89	0.048–0.057	$\lambda_{\text{макс}}=394$ / <0.652	2,4,5-ХБК
ПХБ 30	69–89	0.049–0.055	$\lambda_{\text{макс}}=449$ / <0.297	2,4,6-ХБК
Штаммы рода <i>Pseudomonas</i>				
ПХБ 1	97–100	0.146–0.148	н.д.	2-ХБК
ПХБ 2	95–100	0.135–0.149	н.д.	3-ХБК
ПХБ 3	82–100	0.072–0.105	н.д.	4-ХБК
ПХБ 12	78–98	0.031–0.043	$\lambda_{\text{макс}}=390$ / <0.071	3,4-ХБК
ПХБ 29	78–89	0.032–0.034	$\lambda_{\text{макс}}=394$ / <0.358	2,4,5-ХБК
ПХБ 30	79–91	0.031–0.033	$\lambda_{\text{макс}}=449$ / <0.397	2,4,6-ХБК

* Начальная концентрация хлорбифенилов 94.25 мг/л

B106a, G12a, P2m, P2kr, P2(51), P23a, P1-1, R14-3, *R. opacus* EK9, EK11, R6-511, *R. jostii* EK8, *R. wratislaviensis* Ch6-511, CH625, CH628, EK7, EK10, G10, KT112-7, MD1, MD2, P1, P12, P13, P20, RO112, *Rhodococcus* sp. B7a, BBL12-2, BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, EK12, KBB16, MD3, MD4, MD5, SN31, *Pseudomonas benzenivorans* Ch3-2, *P. geniculata* Ch3-4, *P. monteilli* Ch1-C3, Ch1-C7, Ch2-1, *P. plecoglossicida* Ch3-9, Ch6-5, Ch6-7, *Pseudomonas* sp. A-134, B2, B7, B8, B106, EK-30, EK34, G1, G11, G12, G13, G127, G128, G129, G132, G134, MD8, P8, P8a, P9, P22, P23, P24, R6-411, SIB3, SIB6, SIB7, SIB9, SIB10, SKL2, SKL3, S9, S13, S210, S211, S212, S213, S214, SBE14a, SKE2, SKE1, SKE11, SKE4, VRP2-2, VRP2-6 эффективность деструкции убывала в ряду моно-замещенный > ди-замещенный > три-замещенный хлорбифенил. Аналогичная закономерность описана и для других бактерий-деструкторов ПХБ, в частности, для штаммов *Aquamicrobium* sp. SK-2, *Bacillus* sp. JF8, *Enterobacter* sp. SA-2, *Ralstonia* sp. SA-4 и SA-5, *Pseudomonas* sp. SA-6, *Rhodococcus* sp. SK-1, SK-3 и SK-4 (Shimura *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Gioia *et al.*, 2014).

Следует отметить, что штаммы *Bacillus* sp. BD, MD7, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a, P2m, P2kr, P2(51), P23a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, EK7, KT112-7, MD1, MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, BBL12-2, BP9-1, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, KBB16 более эффективно разлагали моно- и ди-замещенные хлорбифенилы с заместителями в одном кольце, чем описанные ранее штаммы родов *Aquamicrobium*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Burkholderia* (Shimura *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Gioia *et al.*, 2014).

Анализ метаболического профиля показал, что бифенил 2,3-диоксигеназа исследуемых штаммов осуществляет окисление вицинальных атомов углерода в незамещенном ароматическом цикле молекулы хлорированных бифенилов. При этом основным метаболитом является соответствующая хлорбензойная кислота (рисунок 23).

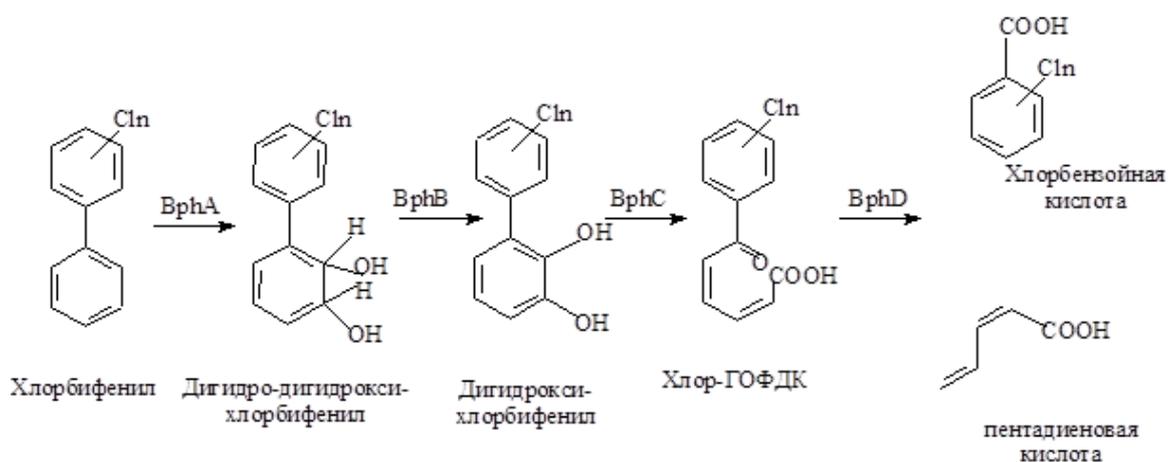


Рисунок 23 – Схема «верхнего» пути разложения хлорбифенилов с заместителями в одном кольце молекулы. n – количество атомов хлора в молекуле бифенила

Аналогичная активность описана для бифенил 2,3-диоксигеназы известных штаммов-деструкторов ПХБ родов *Rhodococcus*, *Burkholderia* и *Pseudomonas* (Pieper, 2005; Furukawa, 2010). По-видимому, в данном случае определяющим моментом в ферментативной атаке хлорбифенила является не строение и активность самой бифенил 2,3-диоксигеназы, а наличие незамещенного ароматического кольца в молекуле хлорбифенила.

3.3. Особенности деструкции дихлорированных бифенилов с заместителями в обоих кольцах молекулы активными штаммами-деструкторами

Известно, что основными продуктами восстановительного дегалогенирования смесей полихлорбифенилов являются конгенеры, содержащие заместители в *орто*- и *пара*-положениях (Maltseva *et al.*, 1999). В качестве модельных соединений нами выбраны дихлорированные бифенилы, с заместителями в каждом кольце молекулы: ПХБ 4 – 2,2'-дихлорбифенил, ПХБ 8 – 2,4'-дихлорбифенил и ПХБ 15 – 4,4'-дихлорбифенил. Изучена деградационная активность представителей родов *Microbacterium* (4 штамма), *Rhodococcus* (28 штаммов) и *Pseudomonas* (15 штаммов) к данным конгенерам ПХБ (таблица 5).

Таблица 5 – Разложение аэробными бактериальными штаммами дихлорированных бифенилов*

ПХБ	Эффективность деструкции, %	Удельная скорость деструкции, ч ⁻¹	ГОФДК: $\lambda_{\text{макс}}$, ОП (о.е.)	ХБК
Штаммы рода <i>Microbacterium</i>				
ПХБ 4,	99–100	0.417–0.428	н.д.	2-ХБК
ПХБ 8	99–100	0.398–0.408	$\lambda_{\text{макс}}=397$, < 1.911	4-ХБК
ПХБ 15	99–100	0.405–0.411	$\lambda_{\text{макс}}=432$, ОП <0.952	4-ХБК
Штаммы рода <i>Rhodococcus</i>				
ПХБ 4	99–100	0.406–0.412	$\lambda_{\text{макс}}=390–394$, ОП=0.196–0.962	2-ХБК
ПХБ 8	99–100	0.185–0.504	$\lambda_{\text{макс}}=390–396$, $\lambda_{\text{макс}}=436$, ОП=0.245–2.383	2-ХБК, 4-ХБК
ПХБ 15	78–97	0.308–0.327	$\lambda_{\text{макс}}=428$, ОП <0.508	4-ХБК
Штаммы рода <i>Pseudomonas</i>				
ПХБ 4	98–100	0.486–0.491	$\lambda_{\text{макс}}=394$, ОП=0.102–1.342	2-ХБК
ПХБ 8	98–100	0.243–0.397	$\lambda_{\text{макс}}=390–396$, ОП=0.015–3.985	4-ХБК
ПХБ 15	76–91	0.199–0.284	$\lambda_{\text{макс}}=428$, ОП <0.224	4-ХБК

* Начальная концентрация хлорбифенилов 22.3 мг/л

Анализ полученных результатов показывает, что исследуемые штаммы способны окислять как ди(*орто*)-, так и ди(*пара*)-замещенные хлорированные бифенилы. Однако прослеживаются различия в активности ферментного комплекса к конгенерам ПХБ с *орто*- и *пара*-замещенными кольцами.

Бифенил диоксигеназы штаммов *Microbacterium* sp. P26, EK24, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, EK7, KT112-7, MD1, MD2, P12, P13, P20, *Rhodococcus* sp. B7a, BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, EK12, G10, SN31, DB11, *R. opacus* EK9, *R. jostii* EK8, *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a, P2kr, P23a и *Pseudomonas* sp. P24, S210, B106, G13, G11, G12, S212, B2, B7, B8, P22, P23, S211, VRP2-6, MD8 активнее окисляют *орто*-замещенное кольцо в молекуле

ди(*орто*-)хлорированного бифенила, чем *пара*-замещенное кольцо в молекуле ди(*пара*-)хлорбифенила, о чем свидетельствуют более высокие значения удельной скорости деструкции при разложении ПХБ 4, чем при разложении ПХБ 15 (таблица 5). При этом в случае окисления ПХБ 4 у перечисленных штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* образуется 8Cl-ГОФДК и продукт ее гидролиза ГОФДК-гидроксилазой – 2-хлорбензойная кислота (Seach *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2005). Вероятно, VphA исследованных штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* окисляет *орто*-замещенное кольцо дихлорбифенила по 2 и 3 углеродным атомам, а не по свободным от заместителей 4 и 5 углеродным атомам (рисунок 24).

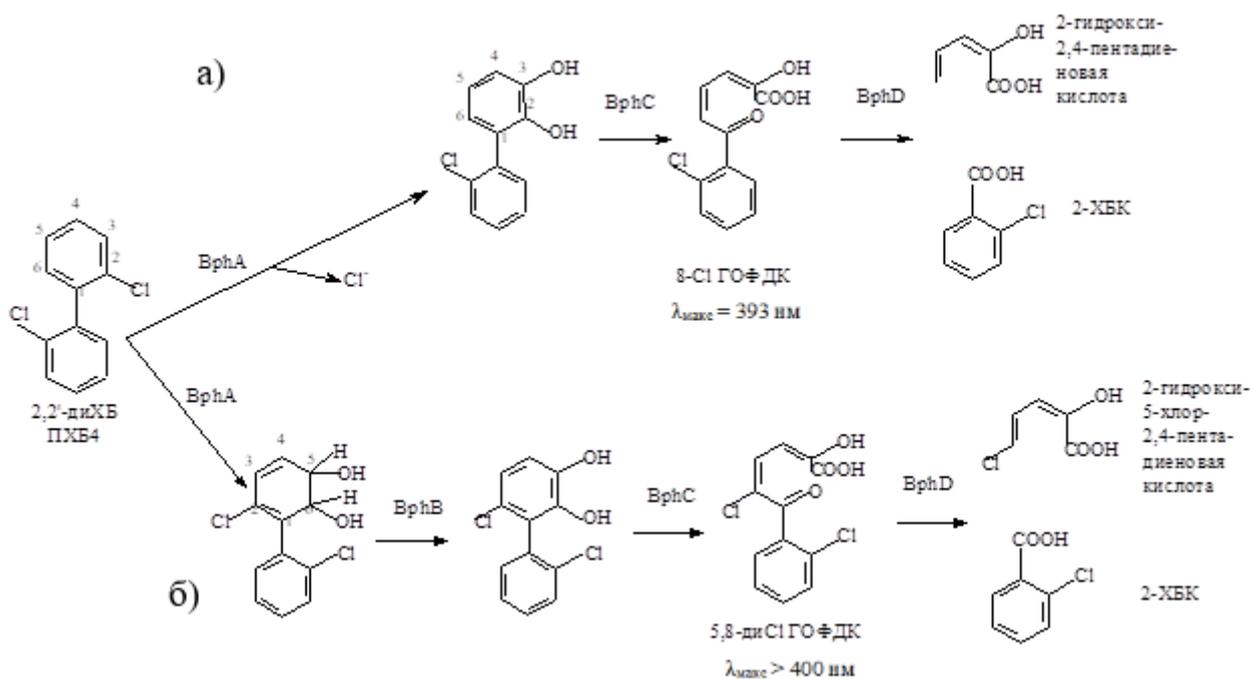


Рисунок 24 – **Общая схема разложения ПХБ 4:** а – наиболее вероятный биохимический путь у штаммов, представленных в настоящем исследовании, б – теоретически возможный путь на основании международных баз данных (KEGG, NCBI)

Значения оптической плотности образующейся ГОФДК в пределах $OP_{\text{макс}} = 0.1\text{--}1.3$ о.е. свидетельствуют о высокой активности VphD данных штаммов. В целом, эффективность деструкции ПХБ4 исследованными

штаммами в 2–4 раза превышает аналогичный показатель для штаммов рода *Pseudomonas*, выделенных из ПХБ-загрязненной почвы (Fedi *et al.*, 2001). У штаммов рода *Microbacterium* (P26, EK24, B51, BN2) зафиксировать в среде ГОФДК для определения положения заместителя в молекуле и, соответственно, определения места атаки *VphA* на ПХБ 4, не удалось. При этом в культуральной среде обнаруживается 2-ХБК (таблица 5), что свидетельствует о протекании биотрансформации ПХБ4 по «верхнему» бифенильному пути с диоксигенированием одного из *орто*-замещенных колец молекулы.

Окисление ПХБ 15 штаммами *Microbacterium* sp. P26, EK24, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, EK7, KT112-7, MD1, MD2, P12, P13, P20, *Rhodococcus* sp. B7a, BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, EK12, G10, SN31, DB11, *R. opacus* EK9, *R. jostii* EK8, *R. erythropolis* B7b, B106a, G12a, P2kr, P23a и *Pseudomonas* sp. P24, S210, B106, G13, G11, G12, S212, B2, B7, B8, P22, P23, S211, VRP2-6, MD8 сопровождалось образованием ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 428 нм (штаммы родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*) и 432 нм (штаммы рода *Microbacterium*), основным конечным метаболитом являлась 4-хлорбензойная кислота (таблица 5). Известно, что 10Cl-ГОФДК характеризуется $\lambda_{\text{макс}} = 438$ нм и может образовываться в случае диоксигенирования одного из колец 4,4'-дихлорбифенила по 3 и 4 углеродным атомам (таблица 1) (Seach *et al.*, 2000). Однако экспериментально полученные значения $\lambda_{\text{макс}}$ существенно отличаются от такового для 10Cl-ГОФДК. Также среди метаболитов не выявлено присутствие хлорацетофенона, образующегося при разложении ПХБ, первоначально окисленных по 3 и 4 углеродным атомам (Ines *et al.*, 2021). Вероятно, *VphA* осуществляет окисление *para*-хлорированного кольца ПХБ 15 по 2 и 3 углеродным атомам, что приводит к образованию 3,10диCl-ГОФДК, как и в случае *B. xenovorans* LB400 (рисунок 25).

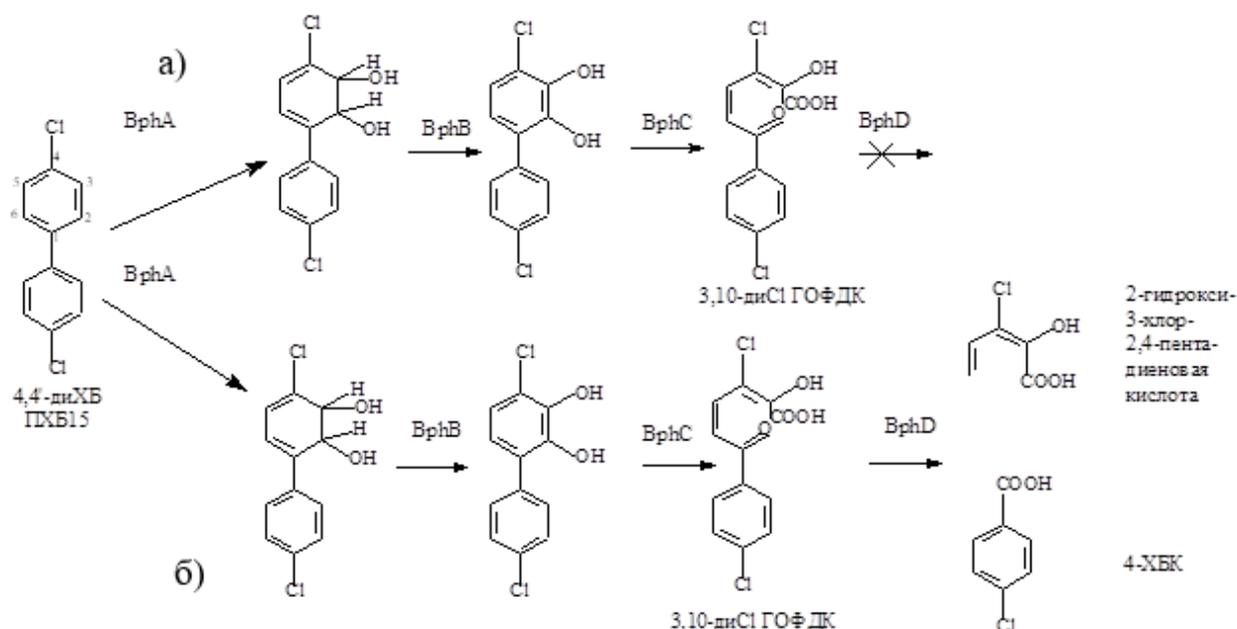


Рисунок 25 – Схема разложения ПХБ 15: а – биохимический путь трансформации ПХБ 15 штаммом *B. xenovorans* LB400 (Seach *et al.*, 2000), б – наиболее вероятный биохимический путь у штаммов, представленных в настоящем исследовании

При гидролизе 3,10диCl-ГОФДК под действием VphD образуется 4-ХБК и хлор-пентадиеновая кислота. Из литературных данных известно, что присутствие заместителя в диеноатной части молекулы ГОФДК может оказывать ингибирующее действие на ГОФДК-гидролазу. Так VphD_{LB400} не осуществляет гидролиз 3,10диCl-ГОФДК, образующейся при разложении 4,4'-дихлор- и 2,4,4'-трихлорбифенилов (Seach *et al.*, 2000). Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой активности ГОФДК-гидролазы исследованных 45 штаммов родов *Microbacterium*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas* к 3,10диCl-ГОФДК. Известно, что штаммы *Achromobacter xylosoxidans* IR08, *Bacillus* sp. JF8, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 также проявляют высокую деградационную активность к ПХБ 15, осуществляя его трансформацию до 4-ХБК (Mondello *et al.*, 1997; Shimura *et al.*, 1999; Piori *et al.*, 2008; Natamian-Zarmi *et al.*, 2009). Однако, в отличие от остальных

известных штаммов, ферментный комплекс ПХБ-трансформации штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707 не осуществляет окисление ПХБ 4 (2,2'-диХБ). По всей видимости, VphABCD представленных в настоящей главе штаммов отличаются спектром разлагаемых конгенов ПХБ от Vph-ферментов описанных штаммов.

Таким образом, различия в эффективности разложения ди(*орто*)- и ди(*пара*)-хлорбифенилов исследованными штаммами обусловлены деградационной активностью и специфичностью первого фермента окисления конгенов ПХБ - бифенил диоксигеназы.

Интересные результаты получены при анализе наиболее вероятных метаболических путей разложения 2,4'-дихлорбифенила (ПХБ 8) исследуемыми штаммами. Основываясь на полученных данных, что бифенил диоксигеназа исследуемых штаммов проявляет окислительную активность как к *орто*- так и к *пара*-замещенным кольцам, было предположено, что скорость разложения 2,4'-дихлорбифенила будет выше, чем для 2,2'- и 4,4'-дихлорбифенилов. Однако, более высокая удельная скорость деструкции отмечена только у штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CH628, G12a, B7a и штамма *M. oxydans* B51. У штаммов *Microbacterium* sp. P26, EK24, и *M. foliorum* BN2 удельная скорость деструкции ПХБ 8 сопоставима с аналогичным показателем для ПХБ 4 и ПХБ 15, а у штаммов *Pseudomonas* sp. P24, S210, B106, G13, G11, G12, S212, B2, B7, B8, P22, P23, S211, VRP2-6, MD8 выше, чем при разложении ПХБ 15 в 1.2–1.4 раза, но ниже, чем при деструкции ПХБ 4 в 1.2–2.0 раза (таблица 5).

Среди основных метаболитов, образующихся при расщеплении ПХБ 8, у исследованных штаммов родов *Microbacterium* (4 штамма), *Pseudomonas* (15 штаммов) и штаммов *R. wratislaviensis* CH625, MD1, MD2, *R. erythropolis* B7b, B106a, *R. jostii* EK8, *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11, G10, SN31, выявлена 4-хлорбензойная кислота, а у штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* CH628, EK7, KT112-7, P12, P13, P20, *Rhodococcus* sp. B7a – 2-хлорбензойная и 4-хлорбензойная кислоты (таблица 5). Основываясь

на описанных схемах «верхнего» бифенильного пути, можно предположить, что в случае, когда конечным метаболитом является 4-ХБК, бифенил диоксигеназа осуществляет окисление *орто*-замещенного кольца молекулы ПХБ 8 (рисунок 26, путь а, б).

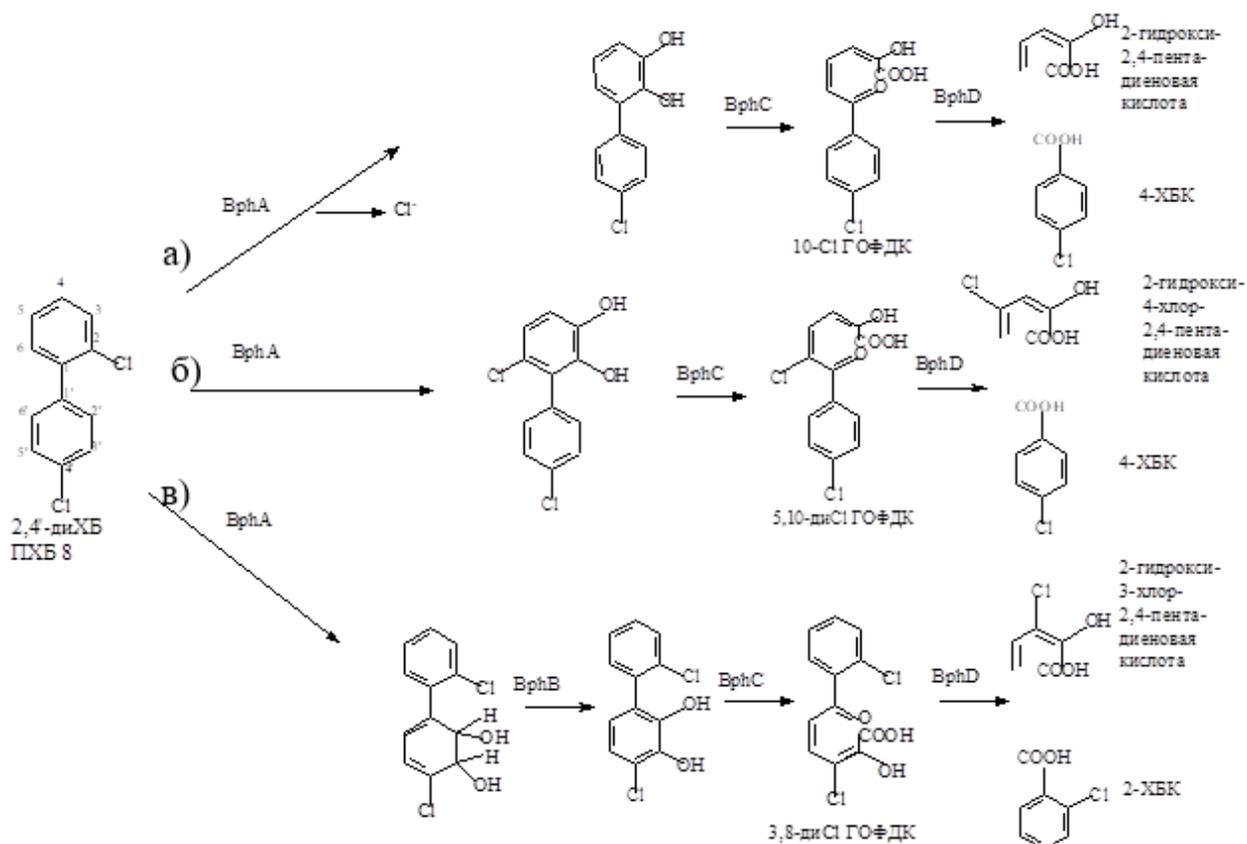


Рисунок 26 – Схема аэробного бактериального разложения ПХБ 8, построенная на основании экспериментальных данных и сведений из международных баз данных (KEGG, NCBI). Описание приведено в тексте

Так как установлено, что VphA исследованных штаммов способна взаимодействовать как с вицинальными атомами углерода, свободными от хлор-заместителей, так и с парой атомов углерода, один из которых несет атом хлора, то диоксигенирование возможно как по 2 и 3 атомам углерода (рисунок 26, путь а), так и по 5 и 6 атомам углерода в *орто*-замещенном кольце молекулы ПХБ 8 (рисунок 26, путь б). При дальнейшей работе ферментов «верхнего» пути образуются 10Cl-ГОФДК или 5,10диCl-ГОФДК. Однако, из литературы известно, что 10Cl-ГОФДК характеризуется

$\lambda_{\text{макс}} = 438$ нм, а 5Cl-ГОФДК - характеризуется $\lambda_{\text{макс}} = 402$ нм (Seach *et al.*, 2000). Сочетание заместителей в 5 и 10 положении в одной молекуле ГОФДК вероятно приведет к тому, что длина волны максимального поглощения будет иметь значение, промежуточное между 402 нм и 438 нм. Аналогичная закономерность подтверждена для 4,9диCl-ГОФДК (Seach *et al.*, 2000, Fortin *et al.*, 2005).

Однако, в экспериментальных условиях ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}}$, входящей в указанный диапазон, выявлена только у *R. wratislaviensis* MD1, MD2, *R. erythropolis* B7b, B106a, *R. jostii* EK8, *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, DB11. Можно предположить, что одним из путей трансформации ПХБ 8 у бактерий рода *Rhodococcus* является разложение молекулы ПХБ 8 под действием комплекса ферментов BphABC в результате диоксигенирования по 5 и 6 атомам углерода *орто*-замещенного кольца, с последующей трансформацией до 5,10диCl-ГОФДК (рисунок 26, путь б). Далее под действием ГОФДК-гидроксилазы происходит расщепление данного соединения до 4-ХБК и хлор-пентадиеновой кислоты (рисунок 26, путь б). Отсутствие в культуральной среде исследованных штаммов *Microbacterium* и *Pseudomonas* ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}} > 402$ нм и накопление 4-ХБК, свидетельствует о высокой активности BphD к ГОФДК, образующейся при окислении *орто*-хлорированного кольца ПХБ 8.

В культуральной среде штаммов *Microbacterium* sp. P26, EK24, *M. oxydans* B51, *M. foliorum* BN2, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, EK7, KT112-7, P12, P13, P20, *Rhodococcus* sp. B7a, G10, SN31, DB11, *R. opacus* EK9, *R. erythropolis* G12a и *Pseudomonas* sp. P24, S210, B106, G13, G11, G12, S212, B2, B7, B8, P22, P23, S211, VRP2-6, MD8 детектируется ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 390–397 нм. Как известно, $\lambda_{\text{макс}} < 400$ нм характерна для 3Cl-ГОФДК ($\lambda_{\text{макс}} = 392$ нм), 8Cl-ГОФДК ($\lambda_{\text{макс}} = 392\text{--}393$ нм) и 8,12диCl-ГОФДК ($\lambda_{\text{макс}} = 392$ нм) (таблица 1) (Fortin *et al.*, 2005). Образование ГОФДК с подобным расположением заместителей возможно в случае окисления под действием

бифенил диоксигеназы *para*-хлорированного кольца 2,4'-дихлорбифенила по 2 и 3 углеродным атомам, с последующим разложением под действием ферментов «верхнего» пути (рисунок 26, путь в). Расщепление 3,8диС1-ГОФДК гидроксилазой (VphD) приведет к образованию 2-ХБК и хлорпентадиеновой кислоты (рисунок 26, путь в). Однако 2-ХБК зафиксирована только среди метаболитов у штаммов рода *Rhodococcus* (P25, SN628, EK7, KT112-7, P12, P13, P20, B7a) (таблица 5). Вероятно, ГОФДК-гидролаза штаммов *Microbacterium* и *Pseudomonas* обладает низкой активностью к 3,8диС1-ГОФДК. Полученные результаты позволяют предположить, что на активность VphD оказывает влияние не только в какой (диеноатной или фенольной) части молекулы ГОФДК расположен заместитель, но и у которого углеродного атома. 5,10ДиС1-ГОФДК и 3,8диС1-ГОФДК несут по одному заместителю как в диеноатной, так и в фенольной частях молекулы. Однако в случае 5,10диС1-ГОФДК один из атомов хлора связан с углеродным атомом, участвующим в реакции гидролиза под действием VphD. Вероятно, атом хлора смещает электронную плотность с С-С связи, атакуемой ГОФДК-гидролазой, что обуславливает эффективное расщепление 5,10диС1-ГОФДК под действием VphD исследуемых штаммов.

Таким образом, метаболические пути трансформации дихлорированных бифенилов, несущих по одному заместителю в каждом кольце молекулы, и эффективность их разложения бактериями родов *Microbacterium*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas* зависит от активности и специфичности двух ключевых ферментов: бифенил диоксигеназы (VphA) и ГОФДК гидролазы (VphD).

3.4. Разложение трихлорированных бифенилов с расположением заместителей {2+1} представителями класса *Actinobacteria*

Увеличение степени хлорирования молекулы бифенила может оказывать негативный эффект на скорость окисления ПХБ ферментами аэробных бактерий (Furukawa, 2000; Furukawa, Fujihara, 2008; Cao *et al.*,

2011). Для исследования способности осуществлять разложение трихлорированных бифенилов были отобраны штаммы *Microbacterium oxydans* B51, *Rhodococcus ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *Rhodococcus* sp. B7a (класс *Actinobacteria*). Так как ранее нами было показано, что данные штаммы проявляют активность к *орто*- и *пара*-монозамещенным кольцам хлорбифенилов, то в качестве субстрата деструкции были выбраны два конгенера ПХБ с расположением заместителей по типу {2+1}: ПХБ 17 и ПХБ 28. Оба конгенера несут в одном из колец молекулы бифенила заместители в *орто*- и *пара*-положении, но отличаются заместителями во втором кольце молекулы. ПХБ 17 несет во втором кольце атом хлора в *орто*-положении, а ПХБ 28 – в *пара*-положении. В результате проведенных исследований установлено, что штаммы осуществляют деструкцию ПХБ 17 и ПХБ 28 (таблица 6).

Таблица 6 – Разложение трихлорированных бифенилов* с расположением заместителей {2+1} представителями родов *Microbacterium* и *Rhodococcus*

ПХБ	Эффективность деструкции, %	Удельная скорость деструкции, ч ⁻¹	ГОФДК, $\lambda_{\text{макс}}$, ОП (о.е.)	ХБК
ПХБ 17	40–89	0.092–0.103	$\lambda_{\text{макс}}=393\text{--}449$, ОП = 0.209–0.299	2-ХБК, 2,4-диХБК
ПХБ 28	10–67	0.046–0.053	$\lambda_{\text{макс}}= 392\text{--}397$, ОП <1.842	4-ХБК, 2,4-диХБК

* Начальная концентрация хлорированных бифенилов 12.8 мг/л

Полученные данные согласуются с высказанным ранее предположением и литературными данными, что повышение степени хлорирования молекулы хлорбифенила приводит к снижению ее биодоступности. Ни для одного из субстратов за отрезок времени, аналогичный для деструкции моно- и дихлорированных бифенилов, не было

достигнуто 100%-ное разложение. Удельная скорость деструкции снижалась в 1.8–8.6 раза. Однако, эффективность деструкции у исследуемых штаммов не уступала аналогичному показателю аэробных бактерий, описанных в литературе (Bedard, Haberl, 1990; Shimura *et al.*, 1999; Maltseva *et al.*, 1999; Fedi *et al.*, 2001; Lambdo, Patel, 2006).

Анализ основных метаболитов при разложении ПХБ 17 показал, что бифенил диоксигеназы данных штаммов осуществляют окисление как моно-, так и дизамещенного кольца молекулы трихлорбифенила. В случае, когда атаке подвергается моно(*орто*)-хлорированное кольцо, разложение происходит до 2,4-дихлорбензойной кислоты (рисунок 27, путь а, б). Определить пару вицинальных атомов углерода, по которым происходит диоксигенирование молекулы трихлорбифенила, не представляется возможным. Однако нами предположены наиболее вероятные пути.

Диоксигенирование по 2 и 3 углеродным атомам моно(*орто*)-хлорированного кольца молекулы ПХБ 17 приводит к формированию 8,10-диСl-ГОФДК (рисунок 27, путь а). При этом в среде отмечена ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 393 нм. Основываясь на литературных данных, можно предположить, что данная $\lambda_{\text{макс}}$ соответствует 8,10-диСl-ГОФДК. В работе Fortin с коллегами показано, что $\lambda_{\text{макс}}$ 8,12-диСl-ГОФДК = 392 нм (таблица 1) (Forti *et al.*, 2005). Однако, под действием VrhA возможно окисление по 5 и 6 углеродным атомам *орто*-хлорированного кольца ПХБ 17. В этом случае образуется 5,8,10-триСl-ГОФДК (рисунок 26, путь б). Данный изомер ГОФДК содержит заместителей как в фенольной, так и в диеноатной частях молекулы (рисунок 27, путь б).

В обоих случаях под действием VrhD происходит гидролиз до стадии образования 2,4-диХБК. Учитывая, что значения оптической плотности культуральной среды, содержащей данные ГОФДК, низкие, можно предположить, что ГОФДК-гидролаза исследованных штаммов класса *Actinobacteria* проявляет высокую активность.

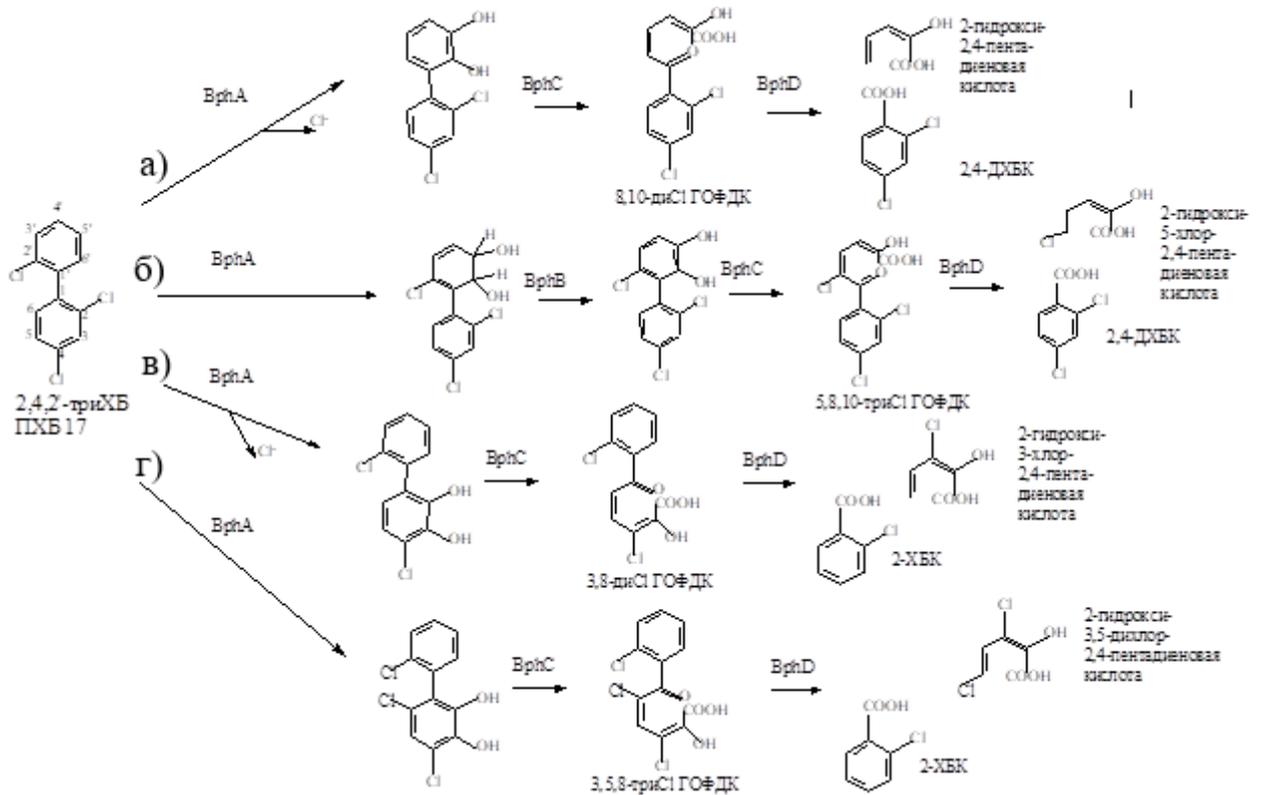


Рисунок 27 – Вероятные метаболические пути аэробного бактериального окисления ПХБ 17 штаммами *M. oxydans* B51, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *R. ruber* P25. Описание приведено в тексте

У штаммов *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a и *R. wratislaviensis* KT112-7 в качестве основного метаболита ПХБ 17 зафиксирована 2-ХБК. Наиболее вероятно, что VphA данных штаммов окисляет ди(*орто-пара*)-хлорированное кольцо молекулы ПХБ 17. Диоксигенирование может происходить как с отщеплением атома хлора, то есть по 2 и 3 углеродным атомам, так и по паре свободных углеродных атомов (рисунок 27, пути в, г). В первом случае (рисунок 27, путь в) в качестве промежуточного метаболита будет образовываться 3,8-диС1-ГОФДК, во втором – 3,5,8-триС1-ГОФДК (рисунок 27, путь г). При анализе деструкции ПХБ 8 было отмечено, что VphD штамма *M. oxydans* B51 проявляет низкую гидроксилазную активность к 3,8-диС1-ГОФДК, а появление заместителя у 5-го углеродного атома приводит к повышению

гидроксилирования (см. раздел 3.3). Полученные результаты свидетельствуют о высокой активности BphD к изомеру ГОФДК, образующемуся при гидролизе 2,4,2'-хлорбифенила по дихлорированному кольцу.

Анализ соединений, образующихся при разложении 2,4,4'-трихлорбифенила (ПХБ 28), показал, что бифенил диоксигеназы штаммов *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *Rhodococcus* sp. B7a осуществляют окисление как моно(*para*)-хлорированного кольца ПХБ 28 (таблица 6, рисунок 28, путь в), так и дихлорированного кольца ПХБ 28 (таблица 6, рисунок 28, пути а, б).

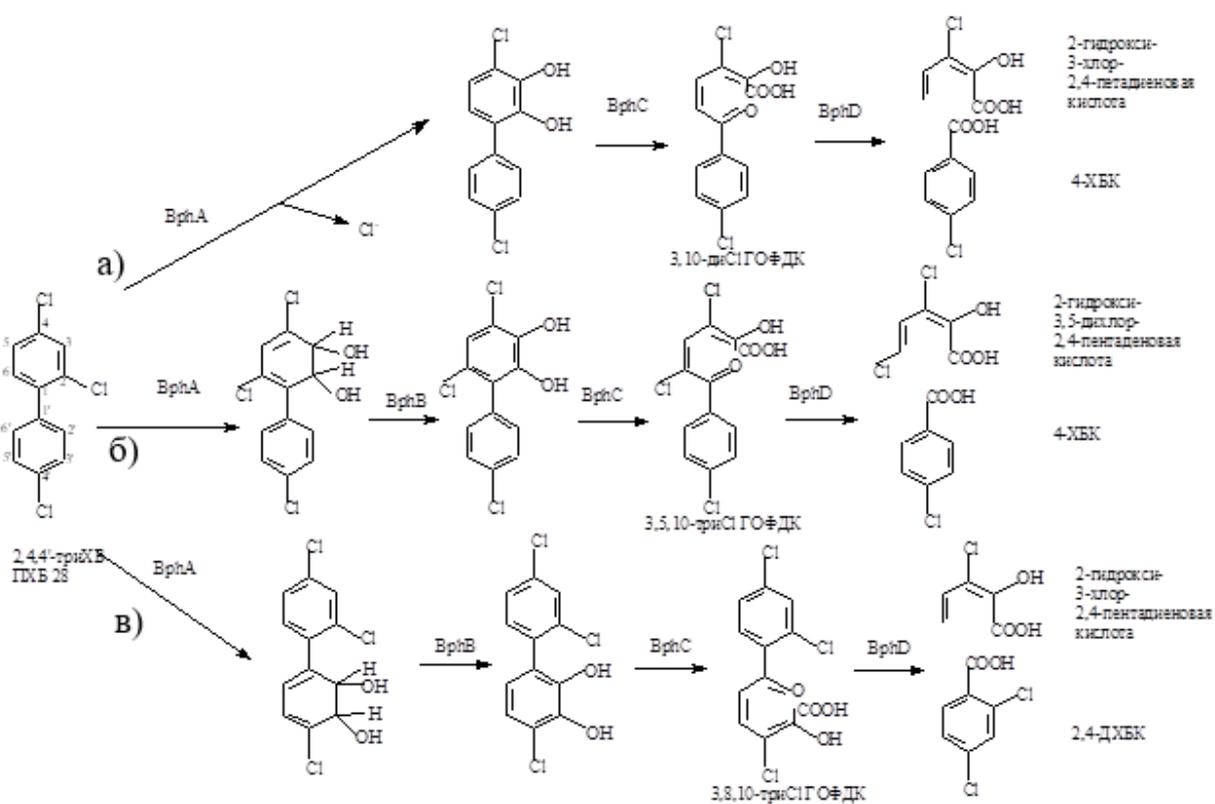


Рисунок 28 – Вероятные пути аэробной бактериальной трансформации ПХБ28 у штаммов *M. oxydans* B51, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *R. ruber* P25. Описание приведено в тексте

Известно, что BphA штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus erythreus* NY5 проявляет активность только к моно-замещенным кольцам, и не окисляет ди-замещенные кольца в молекуле хлорбифенила (Maltseva *et al.*,

1999). Образование 4-ХБК возможно при окислении дихлорированного кольца молекулы ПХБ 28 (рисунок 28, пути а, б). Диоксигеназная атака может протекать как по 2 и 3 углеродным атомам, так и по 5 и 6 углеродным атомам. В первом случае будет образовываться 3,10диС1-ГОФДК (рисунок 27, путь а), а во втором – 3,5,10триС1-ГОФДК (рисунок 28, путь б). Наиболее вероятная длина волны максимального поглощения для данных изомеров будет располагаться в диапазоне 402–438 нм. Однако соединений с $\lambda_{\text{макс}}$, входящей в данный диапазон, в культуральной среде зафиксировано не было. Вероятно, BphD исследуемых штаммов обладает высокой гидроксилирующей активностью к данным изомерам ГОФДК. Обнаружение в среде ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}}$ 392–397 нм, а также 2,4-диХБК, подтверждает способность бифенил диоксигеназы данных штаммов окислять моно(*para*)-хлорированное кольцо ПХБ 28. В этом случае в качестве промежуточного метаболита образуется 3,8,10триС1-ГОФДК, а ее гидролиз приводит к образованию 2,4-диХБК. Аналогичный путь трансформации ПХБ 28 описан для штамма-деструктора *Rhodococcus globerulus* P6 (Furukawa *et al.*, 1979). В работе (Ines *et al.*, 2021) описано несколько вариантов «не классического» ферментативного окисления ПХБ 28 бактериями рода *Rhodococcus*: в результате окисления соединения, образующегося после 2,3-диоксигенирования, наряду с 4-ХБК и 2,4-диХБК формировалась 2,4-дихлорфенилацетатная кислота, а в результате 3,4-диоксигенаирования молекулы ПХБ 28 и последующего окисления формировался 2,4-дихлорацетофенон. В проведенном нами исследовании данных соединений зафиксировано не было, что позволяет сделать вывод, что разложение ПХБ 28 происходило по классическому «бифенильному пути».

Таким образом, исследованные в настоящей работе штаммы *M. oxydans* B51, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* CH625, CH628, KT112-7 и *R. ruber* P25 обладают ферментными системами, окисляющими моно(*ortho*- или *para*)- и ди(*ortho-para*)-хлорированные

кольца в молекуле трихлорированных бифенилов с образованием в качестве основных метаболитов моно- и дихлорированных бензойных кислот.

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

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПХБ

4.1. Внехромосомные элементы

Одной из особенностей строения геномов активных штаммов-деструкторов ароматических соединений является наличие внехромосомных элементов (D-плазмид) высокой молекулярной массы. Такие плазмиды выявлены как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий (Chaundhry, Chapalamadugu, 1991; Shuttleworth et al., 2000; Bhatt *et al.*, 2021). Известно, что на D-плазмидах располагаются гены, обуславливающие деструктивную активность штаммов к таким соединениям как бифенил, нафталин, толуол, бензойная кислота и их хлорированным и гидроксированным производным (Don, Pemberton, 1981; Vandeberg *et al.*, 1981; In-Soon You, 1988; Chaudhry, Chapalamadugu, 1991; Zaitsev *et al.*, 1991; Fetzner, Lingens, 1994; Romine *et al.*, 1999; Tan, 1999; Shimizu *et al.*, 2001; Dennis, 2005; McLeod *et al.*, 2006; Suenaga *et al.*, 2006; Nagata *et al.*, 2010; Takeda *et al.*, 2010; Triscari-Barberi *et al.*, 2012; Shintani *et al.*, 2014; Ghosal, Kimura *et al.*, 2018; Willetts, 2019).

В настоящем исследовании на наличие внехромосомных элементов было проскринировано 82 штамма, осуществляющих разложение бифенила и других ароматических соединений. Анализ геномной ДНК методом пульс-электрофореза позволил установить наличие высокомолекулярных плазмид у 31 штамма (рисунки 29–31).

Штаммы-деструкторы, несущие плазмиды, были выделены из почв с различным уровнем и спектром загрязнения, со всех территорий, рассматриваемых в настоящем исследовании. Интересно отметить, что у штаммов, изолированных из незагрязненных почв, плазмид высокой молекулярной массы обнаружено не было.

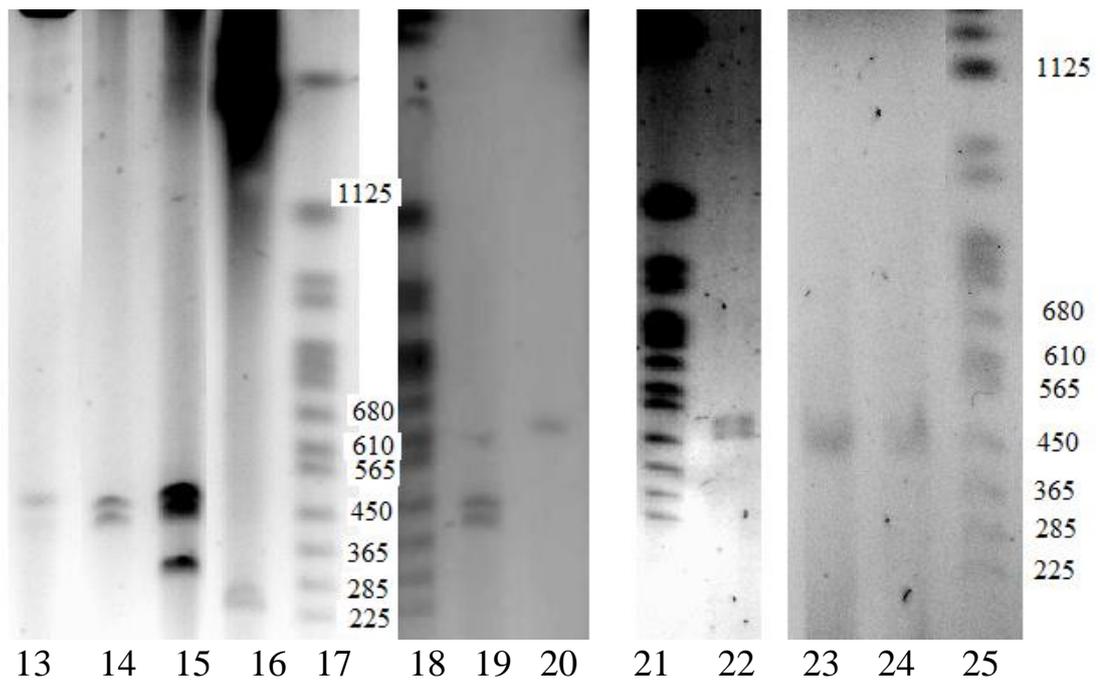
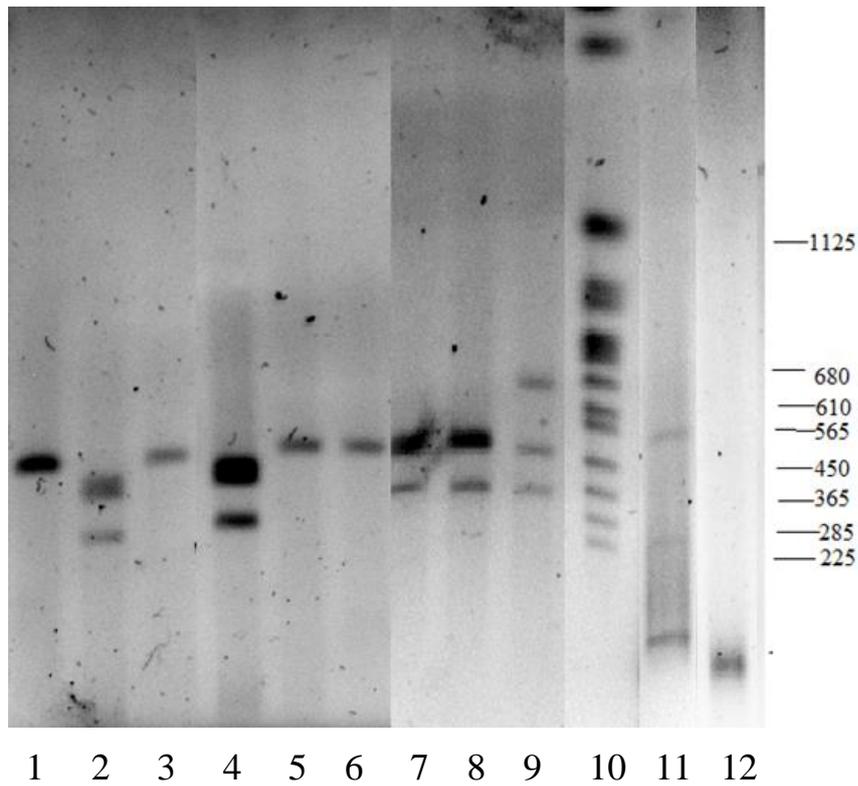


Рисунок 29 – Электрофореграммы нативной ДНК бактерий рода *Rhodococcus*: 10, 17, 18, 21 и 25 – маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США), 1 – G12a, 2 – B7a, 3 – B7b, 4 – P1-1, 5 – P2m(1), 6 – P2kr, 7 – P12, 8 – P13, 9 – P20, 11 – G10, 12 – P25, 13 – Ch625, 14 – Ch628, 15 – MD1, 16 – MD2, 19 – KBB16, 20 – BBL12-2, 22 – KT112-7, 23 – EK7, 24 – EK9

Основную долю среди исследуемых штаммов-деструкторов, геном которых содержит внехромосомные элементы, составляли представители рода *Rhodococcus* – 20 штаммов (рисунок 29). Далее можно выделить группу штаммов рода *Pseudomonas* – 7 штаммов (рисунок 30), и единичные представители родов *Arthrobacter* (штамм Н5), *Microbacterium* (штамм В51), *Achromobacter* (штамм 147) и *Ochrobactrum* (штамм 153) (рисунок 31).

У штаммов *Rhodococcus* sp. G12a, В7b, P2m(1), P2kr, Ch625, BBL12-2, ЕК7 и ЕК9 выявлено по одной плазмиде (рисунок 28). За исключением плазмидной ДНК штамма *Rhodococcus* sp. BBL12-2, внехромосомные элементы характеризовались размером, близким к 500 т.п.н.. Плазида штамма BBL12-2 визуализируется на уровне маркерной ДНК 610 т.п.н.

Для 8 штаммов удалось установить наличие двух внехромосомных элементов, при этом штаммы можно разделить на 4 группы:

1 группа – штаммы *Rhodococcus* sp. В7а и P1-1, обладают плазмидами размером около 450 т.п.н. и 285 т.п.н.

2 группа – штаммы *Rhodococcus* sp. P12 и P13, содержат пул ДНК, расположенный между маркерными ДНК размером 450 т.п.н. и 565 т.п.н., а также плазмидную ДНК размером 365 т.п.н.

3 группа – штаммы *Rhodococcus* sp. Ch628, KBV16, КТ112-7, характеризуются близкими по размеру внехромосомными элементами, визуализирующимися в районе маркерной ДНК размером 450 т.п.н.

4 группа – штамм *Rhodococcus* sp. MD8, плазмиды которого «легче», чем у остальных штаммов рода *Rhodococcus*, их размер составляет примерно 225 т.п.н. и 285 т.п.н.

По три плазмидных ДНК выявлено у штаммов *Rhodococcus* sp. P20 (680 т.п.н., 480 т.п.н., 365 т.п.н.), *Rhodococcus* sp. G10 (550 т.п.н., 260 т.п.н., 150 т.п.н.) и *Rhodococcus* sp. MD1 (500 т.п.н., 450 т.п.н., 350 т.п.н.).

Ранее было указано, что штамм *R. ruber* P25 содержит три плазмиды, размером 110 т.п.н., 90 т.п.н. и 80 т.п.н. (Рыбкина Д.О., 2003). При использованном режиме пульс-электрофореза удалось зафиксировать только

наиболее крупную плазмиду размером около 110 т.п.н. (рисунок 28). Можно предположить, что при использованном методе плазмиды меньшего размера не визуализируются, так как «выходят» за пределы агарозного геля в процессе электрофореза.

У штаммов *Pseudomonas* sp. S210, S212 и VRP2-6 выявлено по одному внехромосомному элементу ДНК молекулярной массой около 150 т.п.н., 110 т.п.н. и 280 т.п.н. соответственно (рисунок 30).

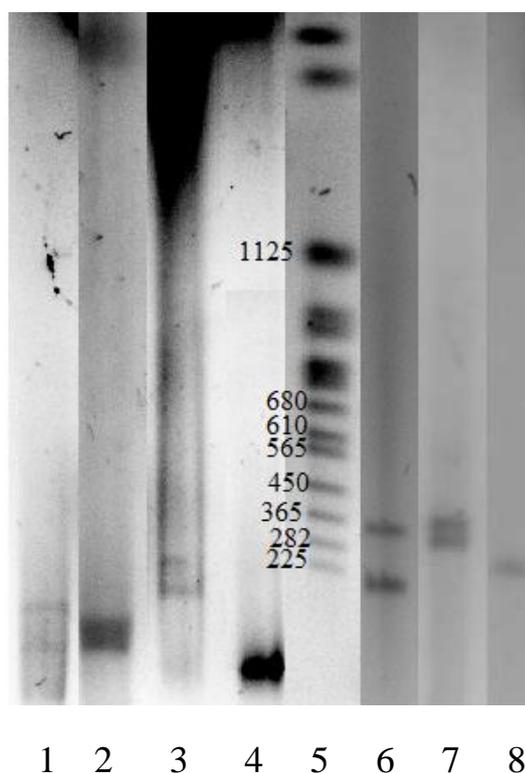


Рисунок 30 – Результаты пульс-электрофореза ДНК бактерий рода *Pseudomonas*: 1 – S211, 2 – S210, 3 – S9, 4 – S212, 6 – MD8, 7 – 134, 8 – VRP2-6, 5 – маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США)

Несмотря на то, что у остальных бактерий рода *Pseudomonas* выявлено по две плазмидных ДНК, профиль на электрофореграмме различается (рисунок 30). У штамма S9 обнаружены плазмиды размером около 180 т.п.н. и 220 т.п.н., у штамма S211 – 150 т.п.н. и 170 т.п.н., у штамма MD8 – 200 т.п.н. и 350 т.п.н., у штамма 134 – 330 т.п.н. и 380 т.п.н.. Таким образом, все

штаммы рода *Pseudomonas* характеризовались уникальным набором внехромосомных элементов.

У штаммов *Achromobacter* sp. 147, *Ohrobactrum* sp. 153 на хроматограмме визуализируется по одной плазмиде размером около 680 т.п.н. и 1100 т.п.н. соответственно (рисунок 31). Примененный метод пульс-электрофореза позволил выявить в геноме штамма *M. oxydans* В51 два внехромосомных элемента размером 610 т.п.н. и 550 т.п.н., и в геноме штамма *Arthrobacter* sp. Н5 – одну плазмиду размером около 150 т.п.н. Использование других методов выделения плазмидной ДНК (см. раздел 2.10) не давало положительного результата при анализе данных штаммов.

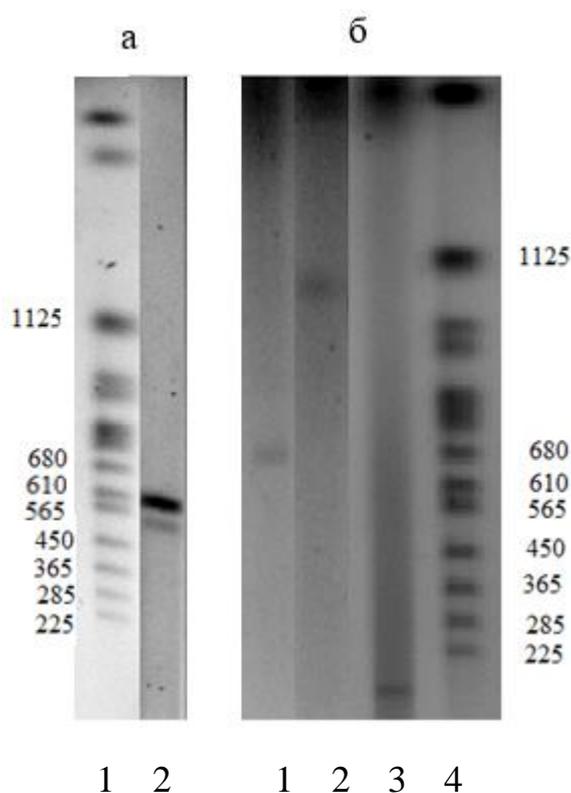


Рисунок 31 – Электрофореграмма плазмидных ДНК: а – маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США) (1), штамма *M. oxydans* В51 (2), б – штаммов *Achromobacter* sp. 147 (1), *Ohrobactrum* sp. 153 (2) и *Arthrobacter* sp. Н5 (3), маркер молекулярных масс Yest chromosomal («Bio-Rad», США) (4)

Присутствие плазмид большого размера в клетках характерно для штаммов-деструкторов ароматических соединений, принадлежащих родам

Arthrobacter, *Pseudomonas* и *Rhodococcus* (Schmitz *et al.*, 1992; McLeod *et al.*, 2006; Triscari-Barberi *et al.*, 2012). Размеры выявленных плазмид у исследуемых штаммов сопоставимы по размерам с плазмидными ДНК штаммов, осуществляющих разложение таких ароматических соединений, как нафталин, бифенил/ПХБ, катехол/хлоркатехол, толуол, хлорбензойные кислоты и ряд других соединений (Ghosal, In-Soon You, 1988; Chaudhry, Chapalamadugu, 1991; Fetzner, Lingens, 1994; McLeod *et al.*, 2006; Suenaga *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2010; Triscari-Barberi *et al.*, 2012; Shintani *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2018). Известно, что гены деструкции ПХБ у штамма *R. jostii* RHA1 локализованы в плаزمидах pRHL1 и pRHL2 (1100 т.п.н. и 450 т.п.н. соответственно), у штамма *Rhodococcus* sp. DK17 на плазмиде 330 т.п.н., а у штамма *Achromobacter* sp. B-218 на плазмиде размером 76 т.п.н. (Shimizu *et al.*, 2001; Pori *et al.*, 2015). Гены, ответственные за разложение хлоркатехолов, штамма *Rhodococcus opacus* 1CP расположены на плазмиде размером 740 т.п.н. (Konig *et al.*, 2004). У штамма *Rhodococcus aetherivorans* I24 гены, кодирующие толуол диоксигеназу, локализованы на плазмиде размером 340 т.п.н. (Priefert *et al.*, 2004). Штамм *Arthrobacter globiformis* КЗТ-1, осуществляющий гидролитическое дегалогенирование 4-ХБК, содержит плазмиду 110 т.п.н. (Zaitsev *et al.*, 1991). Известный деструктор 3-хлорбензойной кислоты штамм *Pseudomonas* sp. B13 содержит плазмиду 111 т.п.н., на которой расположены гены начальной атаки 3-ХБК (Chaudhry, Chapalamadugu, 1991). Плазмида pJP4 (80 т.п.н.) штамма *Alcaligenes eutrophus* JMP134 содержит три гена, ответственных за разложение катехола до соединений основного обмена клетки (Ghosal, In-Soon You, 1988).

Анализ полученных результатов позволяет предположить, что у исследованных нами штаммов гены, контролирующие разложение ПХБ и его основных метаболитов, могут иметь плазмидную локализацию.

4.2. Разнообразие α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, контролирующей первый этап окисления бифенила/ПХБ, у штаммов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*

Бифенил 2,3-диоксигеназа является первым ферментом, осуществляющим окисление бифенила и его производных соединений. Активный центр фермента располагается на α -субъединице. Как было показано в более ранних исследованиях, спектр утилизируемых соединений зависит от особенностей строения α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (Gibson, Parales, 2000; Pieper, 2005).

Проведена амплификация гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, у штаммов-деструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. В результате подбора праймеров и их комбинирования (таблица 3), удалось амплифицировать фрагменты гена *bphA1* у 31 штамма (из 69 активных штаммов-деструкторов бифенила) – 7 штаммов рода *Pseudomonas* (S9, S13, S210, S211, S212, VRP2-2, VRP2-6) и 24 штамма рода *Rhodococcus* (P1, P12, P13, P20, P23a, P25, P2m, P2(51), P2kr, G10, G12a, B106a, B7b, KT112-7, S9a, EK7, EK10, EK11, CH625, BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8).

4.2.1. Анализ α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы у штаммов рода *Pseudomonas*

Секвенирование и последующий анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных участков генов с ДНК штаммов рода *Pseudomonas* выявил высокий уровень сходства с гомологичными генами штаммов-деструкторов ПХБ родов *Achromobacter*, *Burkholderia* и *Pseudomonas* (таблица 7). Наиболее высокие значения (99.1–100%) выявлены при сравнении амплифицированных последовательностей с нуклеотидными последовательностями генов *bphA1* штаммов-деструкторов ПХБ *Pseudomonas* sp. B4 и *Achromobacter* sp. BP3 (Rodarie, Jouanneau, 2001; Hong et al., 2009).

Таблица 7 – Анализ генов *bphA1* исследуемых штаммов рода*Pseudomonas*

Штамм, размер анализируемого фрагмента (п.н.), номер в GenBank	Референсный штамм, гомологичный ген, номер в GenBank	Сходство, %	Ссылка
<i>Pseudomonas</i> sp. S9, 497 п.н.	<i>Achromobacter</i> sp. BP3, <i>bphA1</i> , EU812171.1	100	Hong <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4, <i>bphA1</i> , AJ251217.1	99.6	Rodarie, Jouanneau, 2001
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400, <i>bphA</i> , M86348.1	97.8	Chain <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. S13, 464 п.н., FJ752168	<i>Achromobacter</i> sp. BP3, <i>bphA1</i> , EU812171.1	99.6	Hong <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4, <i>bphA1</i> , AJ251217.1	99.1	Rodarie, Jouanneau, 2001
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400, <i>bphA</i> , M86348.1	97.6	Chain <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. S210, 879 п.н., KP972449	<i>Achromobacter</i> sp. BP3, <i>bphA1</i> , EU812171.1	100	Hong <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4, <i>bphA1</i> , AJ251217.1	99.8	Rodarie, Jouanneau, 2001
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400, <i>bphA</i> , M86348.1	98.7	Chain <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. S211, 828 п.н., KC832468	<i>Achromobacter</i> sp. BP3, <i>bphA1</i> , EU812171.1	100	Hong <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4, <i>bphA1</i> , AJ251217.1	99.8	Rodarie, Jouanneau, 2001
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400, <i>bphA</i> , M86348.1	98.8	Chain <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. S212, 856 п.н., KP972450	<i>Achromobacter</i> sp. BP3, <i>bphA1</i> , EU812171.1	100	Hong <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B4, <i>bphA1</i> , AJ251217.1	99.8	Rodarie, Jouanneau, 2001
	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400, <i>bphA</i> , M86348.1	98.7	Chain <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas</i> sp. VRP2-2, 453 п.н.	<i>Pseudomonas putida</i> B6-2, <i>bphA1</i> ; CP015202.1	97.3	Li <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B3B, <i>bphA1</i> ; AJ544517.1	97.1	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Pseudomonas</i> sp. B6K, <i>bphA1</i> ; AJ544520.2;	93.0	Kahl, Hofer, 2003
<i>Pseudomonas</i> sp. VRP2-6, 453 п.н.	<i>Pseudomonas putida</i> B6-2, <i>bphA1</i> ; CP015202.1	97.3	Li <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. B3B, <i>bphA1</i> ; AJ544517.1	97.1	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Pseudomonas</i> sp. B6K, <i>bphA1</i> ; AJ544520.2;	93.0	Kahl, Hofer, 2003

Исключение составляют амплифицированные участки ДНК штаммов *Pseudomonas* sp. VRP2-2 и *Pseudomonas* sp. VRP2-6 (таблица 7). Уровни сходства *bphA1*-генов штаммов VRP2-2 и VRP2-6 с таковыми генами штаммов *P. putida* В6-2 и *Pseudomonas* sp. ВЗВ составляют 97.3% и 97.1%, соответственно (таблица 7) (Kahl, Hofer, 2003, Li *et al.*, 2009). Известно, что штамм *P. putida* В6-2 - деструктор ароматических соединений, а в его геноме содержится “классический” кластер *bph*-генов (*bphABCKHJID*) и гены, ответственные за разложение бензоата, катехола, *para*-гидроксибензоата и салицилата (Li *et al.*, 2009).

bphA1–Гены штаммов *Pseudomonas* sp. S13 и *Pseudomonas* sp. VRP2-2 локализованы на хромосоме, так как у данных штаммов не выявлено плазмид (см. раздел 4.1). Интересным представляется тот факт, что штаммы *Pseudomonas* sp. S9, *Pseudomonas* sp. S210, *Pseudomonas* sp. S211 и *Pseudomonas* sp. S212, выделены из почв г. Серпухов, содержат плазмиды большой молекулярной массы (см. раздел 4.1) и характеризуются наличием *bphA1*–генов с высоким уровнем гомологии (таблица 7). Полученные данные позволяют предположить, что *bphA1*–гены распространялись среди штаммов рода *Pseudomonas* данного микробиоценоза в результате горизонтального переноса.

Построение филогенетического дерева на основе анализа фрагмента гена *bphA1*, соответствующего активному центру и центральному участку α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы, позволило установить, что *BphA1* штаммов *Pseudomonas* sp. S210, S211 и S212 располагаются в ветви бифенил/толуол диоксигеназ, характерных для грамотрицательных штаммов (рисунок 32).

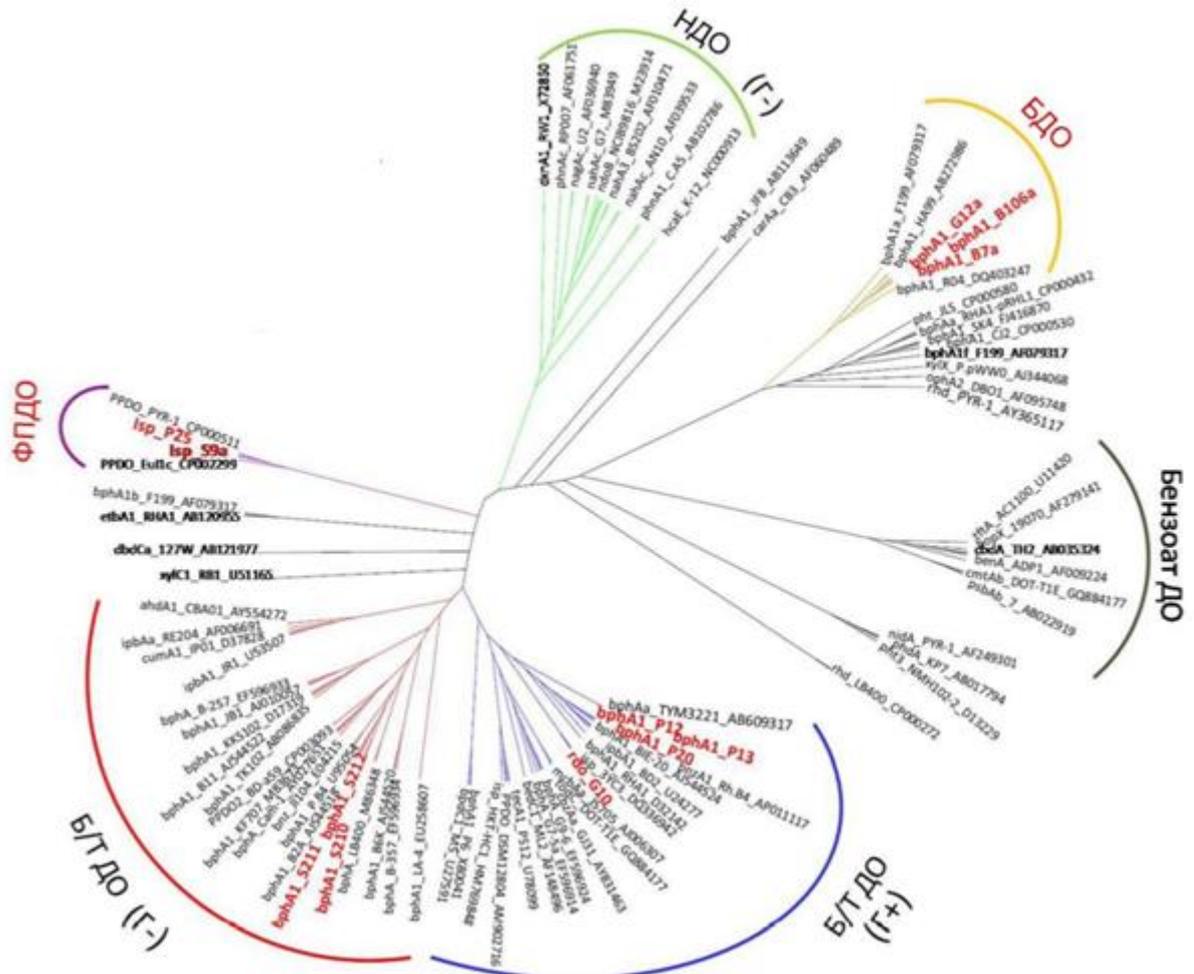
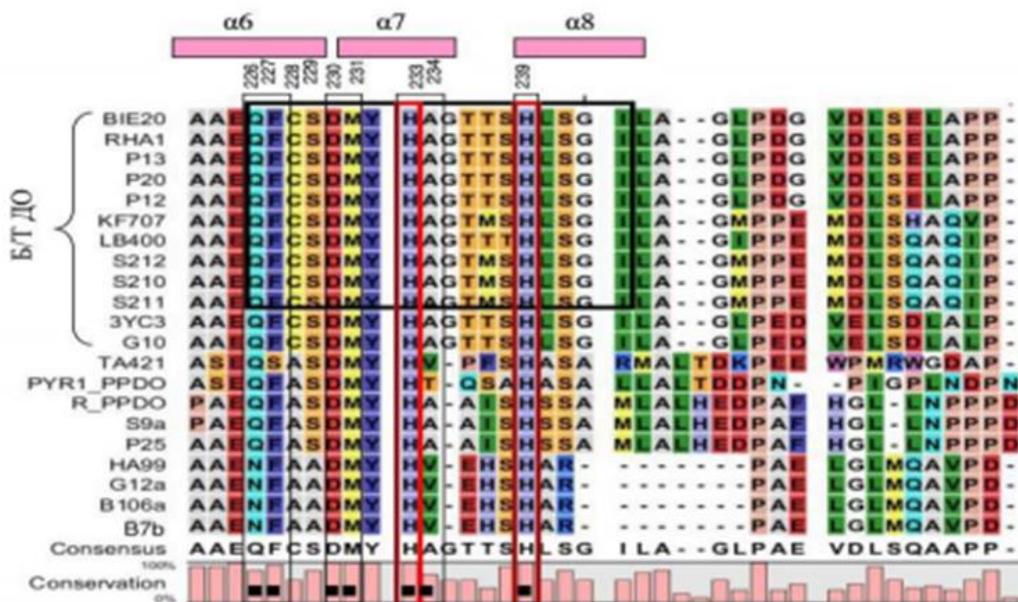
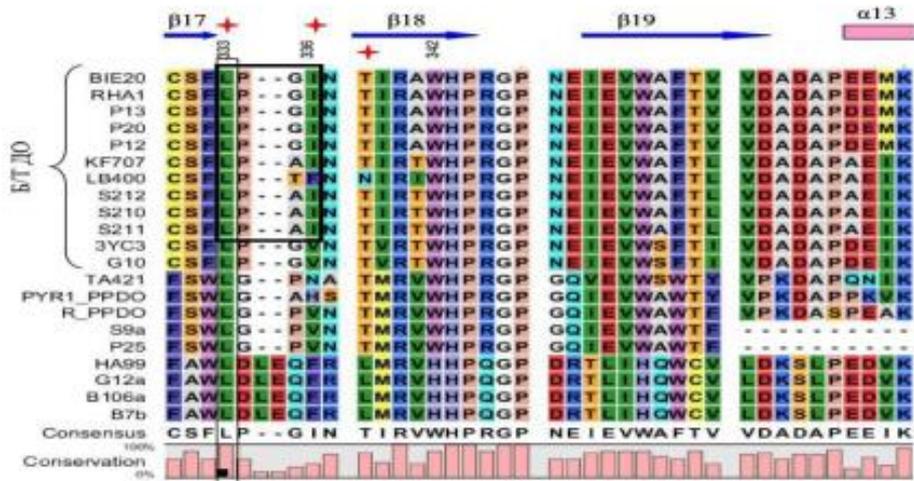
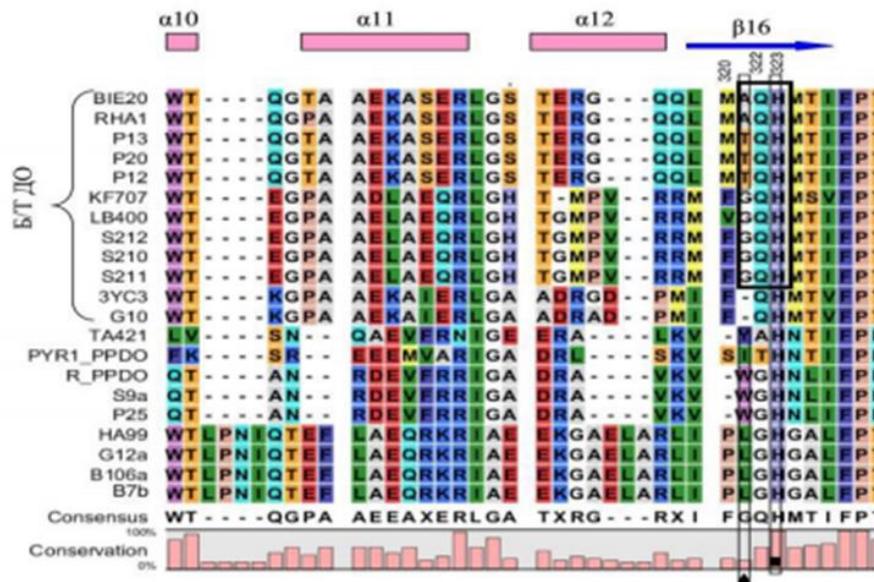
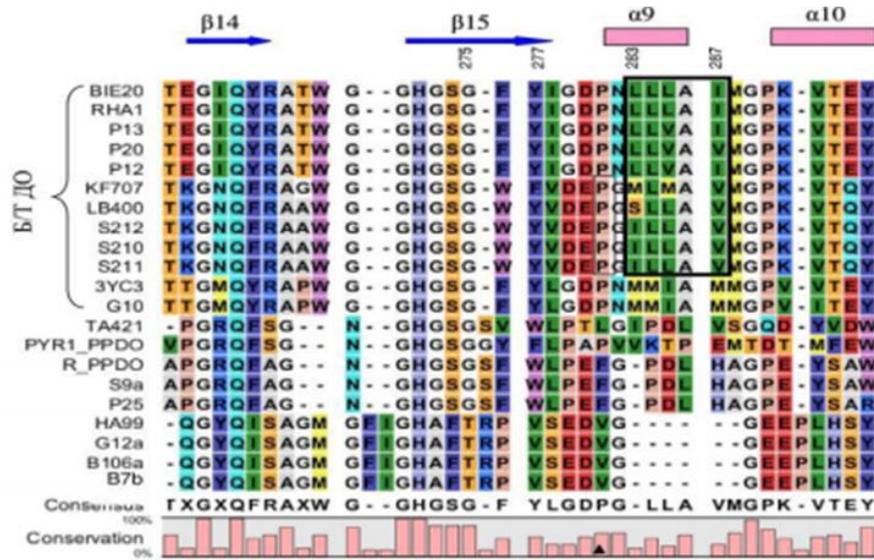


Рисунок 32 – Дерево сходства генов α -субъединиц негемовых гидрокселирующих диоксигеназ ароматических соединений, построенное с использованием метода UPGMA. Достоверность ветвления оценивали на основании «bootstrap»-анализа 1 000 альтернативных деревьев. Дерево построено на основании выравнивания более двухсот гомологичных нуклеотидных последовательностей, включая исследуемые гены и ранее опубликованные нуклеотидные последовательности, депонированные в GenBank. Для удобства восприятия приведены обозначения (гены, названия штаммов, номера нуклеотидных последовательностей в GenBank) наиболее известных бактерий деструкторов ароматических соединений. Сокращения: Б/ТДО – бифенил/толуол диоксигеназы, ФПДО – фенилпропионат диоксигеназы, НДО – нафталин диоксигеназы, БДО – бифенил диоксигеназы, БензоатДО – бензоат диоксигеназы, (Г+) – грамположительные бактерии, (Г-) – грамотрицательные бактерии

На основании данных о нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов *bphA1* генов штаммов *Pseudomonas* sp. S9, S13, S210, S211 и S212 получены дедуктивные аминокислотные последовательности, представляющие собой первичную структуру α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы. Сравнение аминокислотных последовательностей активных центров *bphA1* генов исследуемых штаммов показало высокий уровень сходства с активными центрами α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы семейства бифенил/толуол диоксигеназ штаммов рода *Pseudomonas*, и, в частности, известных деструкторов бифенила/ПХБ *P. pseudoalcaligenes* KF707 и *B. xenovorans* LB400 (рисунок 33).

Известно, что в определении субстратной специфичности бифенил диоксигеназ грамотрицательных штаммов ведущую роль играют аминокислотные остатки в позициях 336 и 377 (использована нумерация аминокислотной последовательности, принятая для α -субъединицы БДО штамма *B. xenovorans* LB400, БДО_{LB400}) (Suenaga *et al.*, 2002). В случае, если штамм способен окислять широкий спектр ПХБ, сходный со спектром штамма *B. xenovorans* LB400, в активном центре фермента в позиции 336 стоит остаток Phe, а в позиции 377 – остаток Asn.





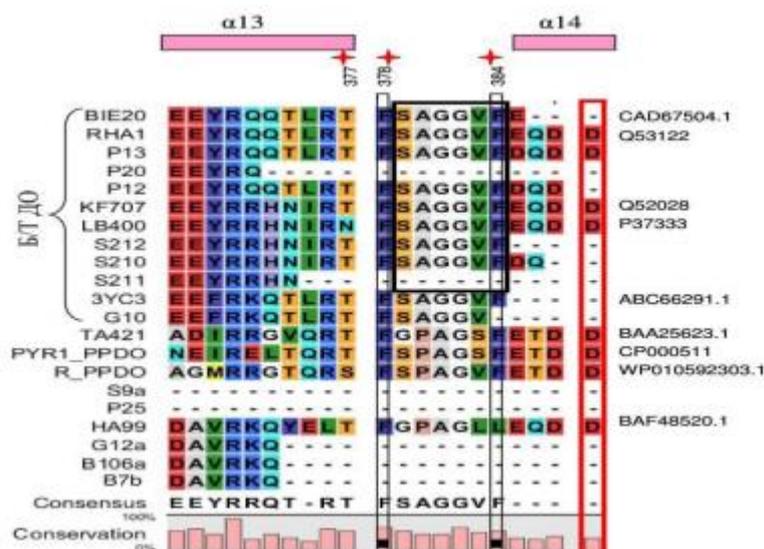


Рисунок 33 – Выравнивание аминокислотных последовательностей α -субъединиц бифенил 2,3- диоксигеназ и α -субъединиц филогенетически близких диоксигеназ. Номера GenBank, UniProtKB/Swiss-Prot ранее опубликованных последовательностей указаны в конце выравнивания. α -Спирали (прямоугольники) и β -тяжи (стрелки) соответствуют элементам вторичной структуры α -субъединиц БДО_{LB400}, БДО_{KF707} и БДО_{RHA1} (Furusava et al., 2004). Толстыми черными линиями обведены аминокислотные остатки, по данным Y. Furusava с соавт. (Furusava et al., 2004), формирующие каталитический карман БДО_{LB400}, БДО_{KF707} и БДО_{RHA1}, а толстыми красными линиями – остатки, координирующие моноклеарное железо. Аминокислотные остатки, непосредственно взаимодействующие с субстратом, обведены тонкими линиями, а их позиции отмечены следующими символами: квадратом (находятся в данной позиции во всех референсных последовательностях), треугольником (только в VphA_{LB400} и VphA_{KF707}), ромбом (только в VphA_{TA421} и VphA_{HA99}). Звездочками над выравниванием отмечены остатки, замены которых влияют на субстратную специфичность БДО (Furusava et al., 2004). Приведены позиции остатков (согласно нумерации последовательности α -субъединицы БДО_{LB400}), критичных для функционирования фермента

У исследуемых в настоящей работе штаммов рода *Pseudomonas* в позиции 336 активного центра БДО расположен остаток Ile, а в позиции 377 – остаток Thr, что соответствует первичной структуре активного центра α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707. Полученные данные по активности штаммов *Pseudomonas* sp. S9, S13, S210, S211 и S212 к индивидуальным конгенерам хлорбифенилов (см. глава 4) позволяют предположить, что, несмотря на различия по аминокислотным остаткам в позициях 277 и 283 в *bphA1*, спектр разлагаемых ими ПХБ близок к таковому штамма *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Suenaga *et al.*, 2002).

4.2.2. Анализ α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы у штаммов рода *Rhodococcus*

Анализ нуклеотидной последовательности амплифицированных участков генов с тотальной ДНК штаммов рода *Rhodococcus* показал, что амплифицированные гены *bphA1* принадлежат разным семействам диоксигеназ: бифенил диоксигеназы (БДО), бифенил/толуол диоксигеназы (Б/Т ДО) и фенил пропионат диоксигеназы (ФПДО) (рисунок 32).

Установлено, что гены *bphA1* штаммов *Rhodococcus erythropolis* B7b, B106a, G12a и P2kg имеют высокий уровень сходства (99.5–100%) с гомологичными генами *bphA* штаммов-деструкторов бифенила *Rhodococcus erythropolis* TA431, *Rhodococcus rhodochrous* K37, *Rhodococcus* sp. R04 и HA99 и входят в семейство БДО, существенно отличаясь от генов семейства Б/Т ДО (таблица 8, рисунок 32) (Taguchi *et al.* 2007; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Можно предположить, что хромосомальная локализация генов характерна только для штамма *Rhodococcus erythropolis* B106a, так как у остальных штаммов данной группы выявлены плазмиды (рисунок 29).

Классические гены семейства бифенил/толуол диоксигеназ выявлены у штаммов *R. wratislaviensis* P1, P12, P13, P20, KT112-7, EK7, EK10, EK11 и CH625, *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, имеющих высокий уровень сходства с *bphA1* генами известных штаммов-деструкторов

Таблица 8 – Анализ генов *bphA1* исследуемых бактерий рода***Rhodococcus***

Штамм, размер анализируемого фрагмента (п.н.), номер в GenBank	Референсный штамм, гомологичный ген, номер в GenBank	Сходство, %	Ссылка
1	2	3	4
<i>Rhodococcus erythropolis</i> B7b, 826 п.н., KP985700	<i>Rhodococcus</i> sp. HA99, <i>bphA1</i> , AB272986.1	99.9	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA431, <i>bphA1</i> , AB272985.1	99.9	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus</i> sp. R04, <i>bphA1</i> , DQ403247.1	99.6	Yang <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus erythropolis</i> B106a, 840 п.н., KP972444	<i>Rhodococcus</i> sp. HA99, <i>bphA1</i> , AB272986.1	99.9	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA431, <i>bphA1</i> , AB272986.1	99.9	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus</i> sp. R04, <i>bphA1</i> , DQ403247.1)	99.6	Yang <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus erythropolis</i> G12a, 831 п.н., KP972443	<i>Rhodococcus</i> sp. HA99, <i>bphA1</i> , AB272986.1	100	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA431, <i>bphA1</i> , AB272986.1	100	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus</i> sp. R04, <i>bphA1</i> , DQ403247.1)	99.7	Yang <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus erythropolis</i> P2kr, 559 п.н., KP972442	<i>Rhodococcus</i> sp. HA99, <i>bphA1</i> , AB272986.1	100	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA431, <i>bphA1</i> , AB272986.1	100	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus</i> sp. R04, <i>bphA1</i> , DQ403247.1	99.5	Yang <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P1, 481 п.н., FJ752167	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	99.4	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.4	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	96.4	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P12, 753 п.н., KP972445	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	99.2	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.1	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	97.1	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P13, 862 п.н., KP972446	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.5	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	98.7	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	97.7	Masai <i>et al.</i> , 1995

1	2	3	4
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P20, 816 п.н., KC832467	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.4	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	99.1	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	97.4	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> KT112-7, 1383 п.н., CP072194.1	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.6	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	99.2	Kahl, Hofer, 2003
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	98.2	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> G10, 788 п.н., KP972448	<i>Achromobacter</i> sp. 3YC3, ISP α , DQ336942.1	99.6	Witzig <i>et al.</i> , 2006
	Некультивируемая бактерия, клон BEDm-II-12-1, ген бензол ДО, АВ294090	99.5	Iwai <i>et al.</i> , 2008
	Некультивируемая бактерия, клон BEDm-II-12-5, ген бензол диоксигеназы, АВ294094	96.8	Iwai <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodococcus ruber</i> P25, 804 п.н., KP985699	<i>Rhodococcus ruber</i> CD3, ген α -субъединицы ароматической диоксигеназы, CP029146	99.3	Kuang <i>et al.</i> , 2008
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1, фенилпропионат ДО, CP000511	76.9	Stingley <i>et al.</i> , 2004
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA421, <i>bphA1</i> , D88021.1	68.7	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus ruber</i> S9a, 734, KP972447	<i>Rhodococcus ruber</i> CD3, ген α -субъединицы ароматической диоксигеназы, CP029146	99.9	Kuang <i>et al.</i> , 2008
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1, фенилпропионат ДО, CP000511	70.4	Kuang <i>et al.</i> , 2008
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> TA421, <i>bphA1</i> , D88021.1	68.7	Taguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> EK7, 495 п.н.	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	92.0	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	90.1	Masai <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	89.2	Kahl, Hofer, 2003
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> EK10, 498 п.н.	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	87.1	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	84.0	Masai <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	83.1	Kahl, Hofer, 2003

1	2	3	4
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> EK11, 505 п.н.	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	95.2	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	94.1	Masai <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhodococcus opacus</i> BIE-20, <i>bphA1</i> , AJ544524	91.1	Kahl, Hofer, 2003
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> CH625, 497 п.н.	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.2	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus</i> sp. clone HS8 <i>bphA1</i> , JN675902.1	99.0	Sun <i>et al.</i> , 2016
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	96.4	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. BP9-1, 409 п.н.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2, <i>ipbA</i> , U24277.1	99.2	Kessler <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.1	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	99.1	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. BP9-2, 411 п.н.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2, <i>ipbA</i> , U24277.1	99.3	Kessler <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.2	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	99.1	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. BP9-4, 410 п.н.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2, <i>ipbA</i> , U24277.1	99.4	Kessler <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.2	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	99.0	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. BP9-7, 415 п.н.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2, <i>ipbA</i> , U24277.1	99.2	Kessler <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.2	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	99.0	Masai <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhodococcus</i> sp. BP9-8, 425 п.н.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2, <i>ipbA</i> , U24277.1	99.4	Kessler <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus opacus</i> B4, <i>bnzA1</i> , AP011117.1	99.3	Na <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, <i>bphA1</i> , D32142.1	99.0	Masai <i>et al.</i> , 1995

бифенила/ПХБ (*R. jostii* RHA1, *R. opacus* BIE-20, *R. erythropolis* BD2) и моноароматических соединений (*R. opacus* B4) (таблица 8, рисунок 32). Штаммы, вошедшие в данную группу, выделены из трех разных экотопов: почвы г. Перми с территории промышленных предприятий – штаммы

R. wratislaviensis P1, P12, P13, P20, почвы лесопарковых зон г. Перми – штаммы *Rhodococcus* sp. BP9-1, BP9-2, BP9-4, BP9-7, BP9-8, почвы г. Чапаевск – штамм *R. wratislaviensis* CH625. Присутствие генов *bphA1* с высоким уровнем гомологии может быть обусловлено наличием мобильных генетических элементов (плазмид) в геноме рассматриваемых штаммов (см. раздел 4.1, рисунок 29).

У штамма *R. wratislaviensis* G10 амплифицирован ген, показавший наибольший уровень сходства с диоксигеназой штамма-деструктора толуола *Arthrobacter* sp. ЗУСЗ, а также с бензол диоксигеназами некультивируемых бактерий (таблица 8) (Witzig *et al.*, 2006).

Анализ нуклеотидных последовательностей, выявленных у штаммов *R. ruber* P25 и S9a, показал, что данные гены принадлежат семейству фенил пропионат диоксигеназ (рисунок 32, таблица 8). Для выявленных нуклеотидных последовательностей максимальный уровень сходства с α -субъединицами ФПДО штаммов *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 и *Rhodococcus erythropolis* TA421 составил 68.7–76.9%, что свидетельствует о высокой вероятности уникальности выявленных генов.

На основании нуклеотидной последовательности выявленных фрагментов гена *bphA1* штаммов рода *Rhodococcus* с помощью программы MEGA получены дедуктивные аминокислотные последовательности.

Анализ первичной структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов P25 и S9a подтвердил их высокий уровень сходства с α -субъединицами фенил пропионат диоксигеназ бактерий рода *Rhodococcus* (97.7 и 100% соответственно). В активном центре α -субъединиц БДО данных штаммов выявлено различие по аминокислотному остатку в позиции 233 (рисунок 33). Следует отметить, что штамм S9a характеризовался слабым ростом на бифениле, тогда как для штамма P25 бифенил является доступным ростовым субстратом. Можно предположить, что БДО данных штаммов отличаются друг от друга.

Аминокислотные последовательности α -субъединицы БДО_{В7а}, БДО_{В106а}, БДО_{G12а}, БДО_{P2kr} оказались сходны с α -субъединицей *Rhodococcus* sp. R04 (ABD65916.1) соответственно на 99.6, 98.2, 100 и 100%. В то же время выявлены существенные отличия от первичной структуры α -субъединиц БДО семейства Б/Т ДО.

Проведен анализ аминокислот активного центра α -субъединиц семейства Б/Т ДО исследуемых бактерий. Сравнение аминокислотных последовательностей активного центра БДО исследуемых нами штаммов с диоксигеназами известных деструкторов ароматических соединений (Suenaga *et al.*, 2002; Zielinski *et al.*, 2003; Furusava *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2007) подтвердило закономерности, выявленные на основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей. Так, исследуемые бактерии рода *Rhodococcus* не отличались от известных деструкторов бифенила/ПХБ этого рода по аминокислотным остаткам активного центра – за исключением штамма *R. wratislaviensis* P20, у которого в положении 287 вместо Ile находится Val, как у грамтрицательных бактерий (рисунок 33). На этом основании можно было предполагать, что субстратная специфичность БДО исследуемых бактерий рода *Rhodococcus* аналогична таковой для штамма *R. jostii* RHA1 (изоформа BphA1A2A3A4), а именно: высокая активность по отношению к ди- и трихлорбифенилам с заместителями в *орто*-положении в одном или обоих кольцах и низкая активность к тетра- и пентахлорбифенилам (Iwasaki *et al.*, 2006). Однако по некоторым аминокислотным остаткам, не входящим в состав активного центра, отличия выявлены: Val285Ile, Thr300Pro, Thr321Ala, Asp385Glu. Эти различия, в большей или меньшей степени, могут оказывать влияние на структуру каталитического кармана фермента и, следовательно, на его субстратную специфичность (Zielinski *et al.*, 2003; Furusava *et al.*, 2004). И действительно, в отличие от *R. jostii* RHA1, исследуемые штаммы (*R. wratislaviensis* P12, P13, P20, КТ112-7) оказались активны как к *орто*-, так и к *пара*-хлорированному кольцу 2,4'-дихлорбифенила (см. главу 3).

Аминокислотные остатки, формирующие активный центр БДО штамма *Rhodococcus* sp. G10 (БДО_{G10}), оказались идентичны соответствующим остаткам диоксигеназы деструктора толуола *Arthrobacter* sp. ЗУСЗ (Witzig *et al.*, 2006), хотя α -субъединицы БДО_{G10} и *Arthrobacter* sp. ЗУСЗ отличались по позиции 292: соответственно Val и Ile (по нумерации для БДО_{LB400}), которая не входит в активный центр фермента (рисунок 32). Выявлены различия в субстратной специфичности: штамм G10 активно растет на толуоле и бензоле, в то время как *Arthrobacter* sp. ЗУСЗ в качестве ростового субстрата может использовать только толуол (Шумкова и др., 2014; Witzig *et al.*, 2006).

4.2.3. Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25

Для моделирования структуры α -субъединицы БДО штаммов-деструкторов ПХБ *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 были использованы нуклеотидные последовательности генов *bphA1*_{КТ112-7} (GenBank MW070531) и *bphA1*_{P25} (GenBank KP985699.1). В результате дедуктивной трансляции и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что *BphA1*_{КТ112-7} на 99.64% идентична таковой фермента семейства бифенил диоксигеназ (КФ 1.14.12.18) штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus aetherivorans* I24 (GenBank AAL61663.2) и находится в семействе классических Б/Т ДО. *BphA1*_{P25} показывает наибольший уровень сходства с ферментами семейства ФПДО (КФ 1.14.12.19) (см. раздел 4.2.2).

Анализ вторичной структуры показал, что соотношение α -спиралей и β -тяжей в α -субъединицах БДО штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 составило 1:0.89 и 1:1.38, соответственно. Таким образом, у штамма P25 большая часть аминокислотной последовательности *BphA1* формирует β -тяжи.

В результате 3D-моделирования установлены третичные структуры *BphA1*_{КТ112-7} и *BphA1*_{P25} (рисунок 34, таблица 9).

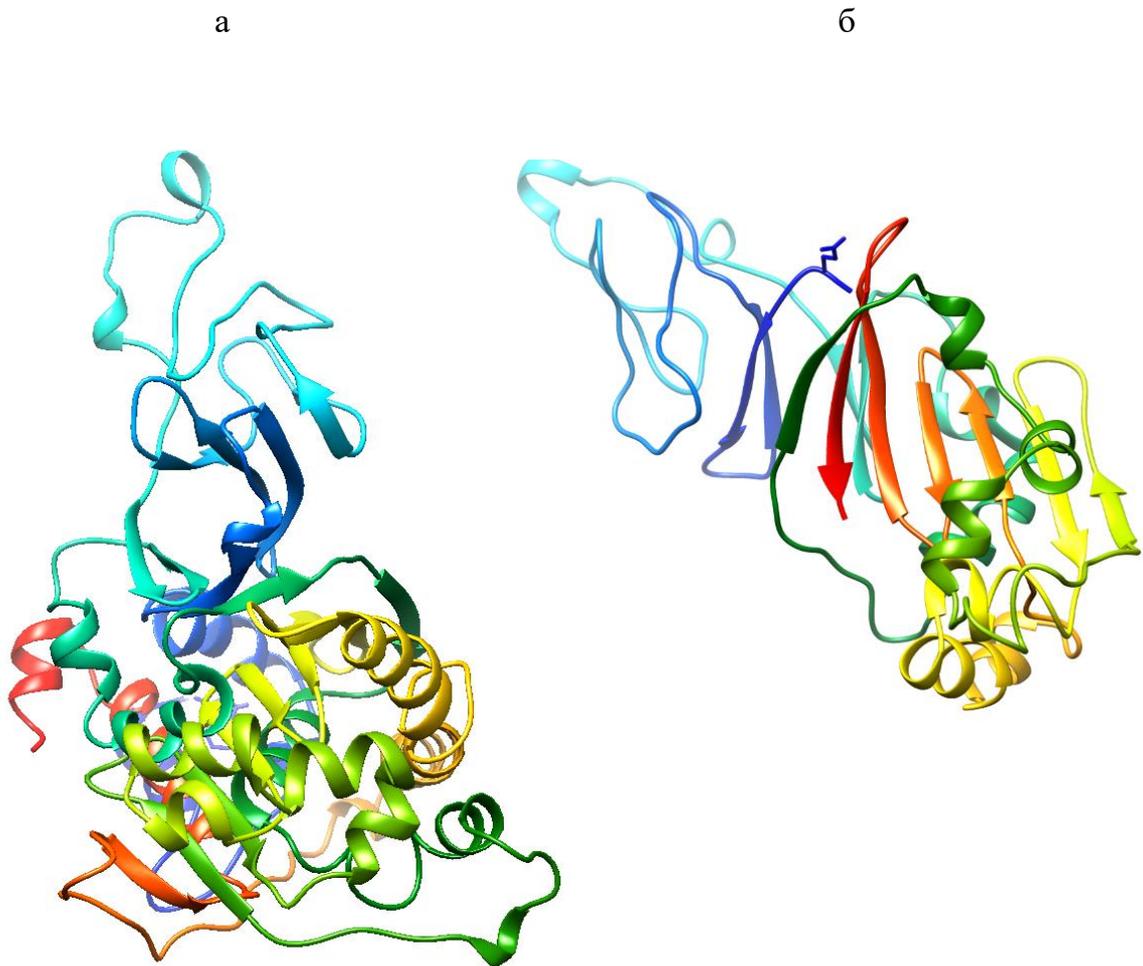


Рисунок 34 – Третичная структура α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 (а) и *R. ruber* P25 (б). Модели построены на основании анализа дедуктивных аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов и имеющихся в базах данных с использованием алгоритма программы UCSF CHIMERA. При окрашивании моделей использован режим “rainbow”, при котором окрашивание модели происходит от N-конца цепи до С-конца от синего через радужный спектр до красного с выделением цветом каждого элемента вторичной структуры

Таблица 9 – Параметры модели третичной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы

Параметр	<i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	<i>R. ruber</i> P25
Площадь поверхности субъединицы, Å ²	17.84 × 10 ³	15.20 × 10 ³
Объем субъединицы, Å ³	55.63 × 10 ³	32.40 × 10 ³
Наиболее близкий по третичной структуре фермент	VphA1, бифенил 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.18)	TDO-F, толуол 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.11)
Бактериальный штамм с близким ферментом	<i>Rhodococcus jostii</i> RNA1	<i>Pseudomonas putida</i> F1
Уровень сходства, %	98.65	44.79
Точность третичной структуры	0.93	0.77
Оценка качества третичной структуры	-0.06	-2.63
Оценка качества четвертичной структуры	0.76	0.75

Анализ параметров показал, что наиболее достоверная модель (93–99%) α -субъединицы БДО получена для VphA1 штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 (таблица 9). При этом наиболее близкой моделью третичной структуры VphA1_{KT112-7} является таковая БДО штамма *Rhodococcus jostii* RNA1 (Furusawa *et al.*, 2004). В то же время, создание модели третичной структуры VphA1_{P25} было сопряжено с проблемой поиска наиболее близкой третичной структуры фермента семейства диоксигеназ. Анализ баз данных показал, что из описанных моделей максимальный уровень сходства выявляется при сравнении VphA1_{P25} с α -субъединицей толуол 2,3-диоксигеназы штамма *Pseudomonas putida* F1 (таблица 9) (Friemann *et al.*, 2009). Уровень достоверности полученной третичной структуры VphA1_{P25} составил 35–77% при анализе различных параметров. Полученные результаты подтверждают уникальность строения α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *R. ruber* P25.

4.3. Анализ генома штамма *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7

4.3.1. Общая характеристика генома *R. wratislaviensis* KT112-7

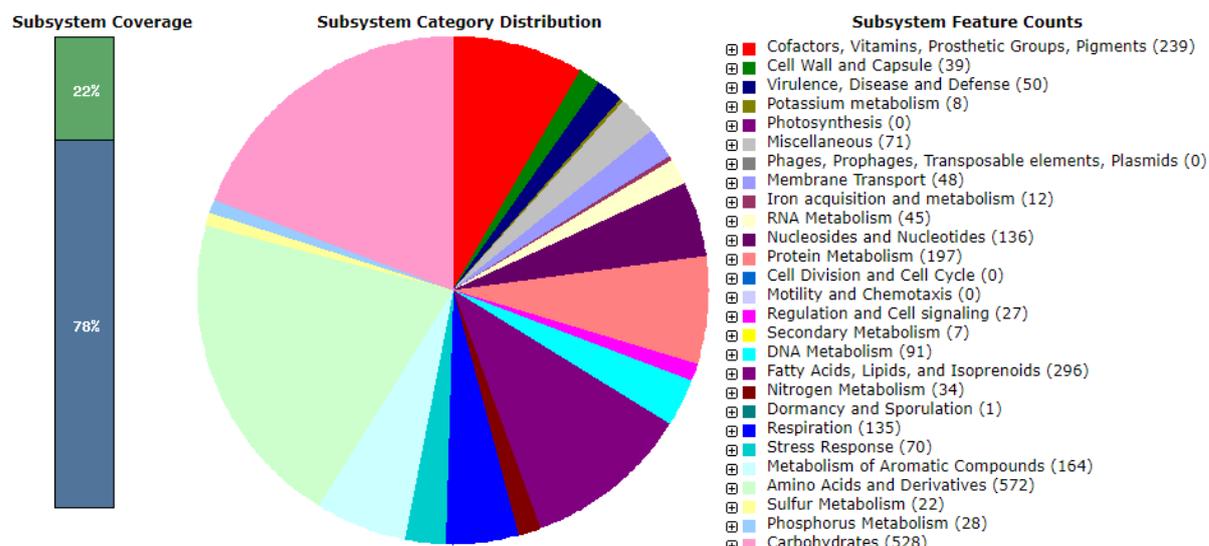
Установлено, что геном штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 представлен хромосомой размером 7587912 п.н. и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 – 281912 п.н. и pRHWK2 – 130937 п.н. (таблица 10). Содержание GC-оснований в хромосоме составило 67.5%, тогда как в плазмидах – 64.3 и 64.1% соответственно. При анализе генома выявлено 7931 белок-кодирующих последовательностей, основная часть которых локализована на хромосоме – 7554. На плазмиде pRHWK1 выявлено 326 кодирующих последовательностей, а на pRHWK2 – 160 белок-кодирующих последовательностей. Распределение выявленных генов по функциональным категориям отображено на рисунке 35. Гены, выявленные на плазмиде pRHWK2, не были сгруппированы по функциональным категориям.

Таблица 10 – Характеристика генома штамма *R. wratislaviensis* KT112-7

Показатели	Хромосома	Мегаплазида pRHWK1	Мегаплазида pRHWK2
Размер генома, п.н.	7587912	281912	130937
Содержание GC, %	67.5	64.3	64.1
РНК	53	0	0
Функциональные группы	334	16	0
Белок-кодирующие последовательности	7445	326	160

Нуклеотидная последовательность генома штамма KT112-7 депонирована в GenBank под номерами: хромосома – CP072193.1, плазида pRHWK1 – CP072194.1, плазида pRHWK2 – CP072195.1. Во время аннотации генома штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 был реклассифицирован как *R. opacus* KT112-7 с использованием средней идентичности нуклеотидов (ANI). Последовательности генома *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 на 99.294% идентичны по ANI типу генома *Rhodococcus opacus*, при этом охват генома составлял 88.9%.

a)



б)

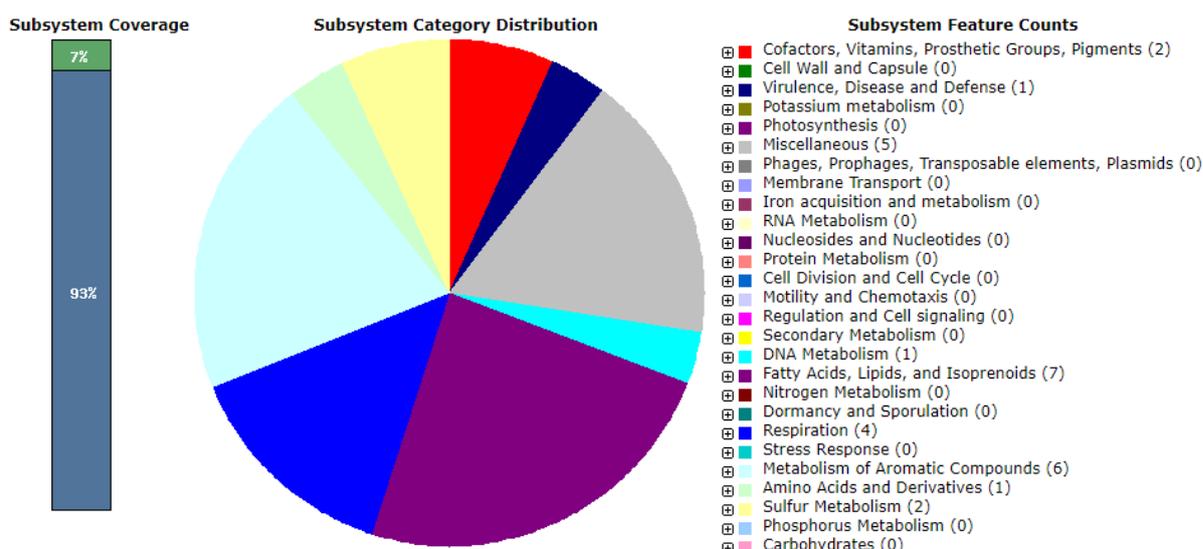


Рисунок 35 – **Функциональные подсистемы генов штамма КТ112-7:**
 а – хромосома, б – мегаплазмида pRHWK1. Функциональные категории перечислены справа от диаграммы, в скобках указано количество генов в каждой категории

4.3.2. Анализ *bph*-генов

В результате анализа генома выявлены гены/ферменты «верхнего» и «нижнего» путей деструкции бифенила (рисунки 36, 37). Установлено, что гены бифенильного пути располагаются в трех оперонах на хромосоме (*bphEGFC*, *bphCDFAD*-монооксигеназа, *bphAB*), оперон *bphA1A2A3A4CBE* располагается на плазмиде pRHWK1, а гены *bphA1A2* располагаются на плазмиде pRHWK2 (рисунки 35, 36, таблица 11). Выявленные гены кодируют следующие ферменты: *bphA1*_{chromosome} (987bp), *bphA1*_{pRHWK1} (1382bp), *bphA1*_{pRHWK2} (987bp) – α-субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA2*_{chromosome} (519bp), *bphA2*_{pRHWK1} (564bp), *bphA2*_{pRHWK2} (520bp) – β- субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA3*_{pRHWK1} (324bp) – ферредоксин, *bphA4*_{pRHWK1} (1239bp) – ферредоксин редуктазу; *bphC*_{chromosome} (912bp, 1134bp), *bphC*_{pRHWK1} (696bp) – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназу; *bphD*_{chromosome} (885bp, 840bp) – НОРДА-гидролазу; *bphH(E)*_{chromosome} (786bp), *bphH(E)*_{pRHWK1} (753bp) – 2-кето-4-пентеноат гидратазу; *bphI(F)*_{chromosome} (1059bp) – 4-гидрокси-2-оксвалерат альдолазу. Проведен BLAST-анализ транслированных нуклеотидных последовательностей *bph*-генов (таблица 11).

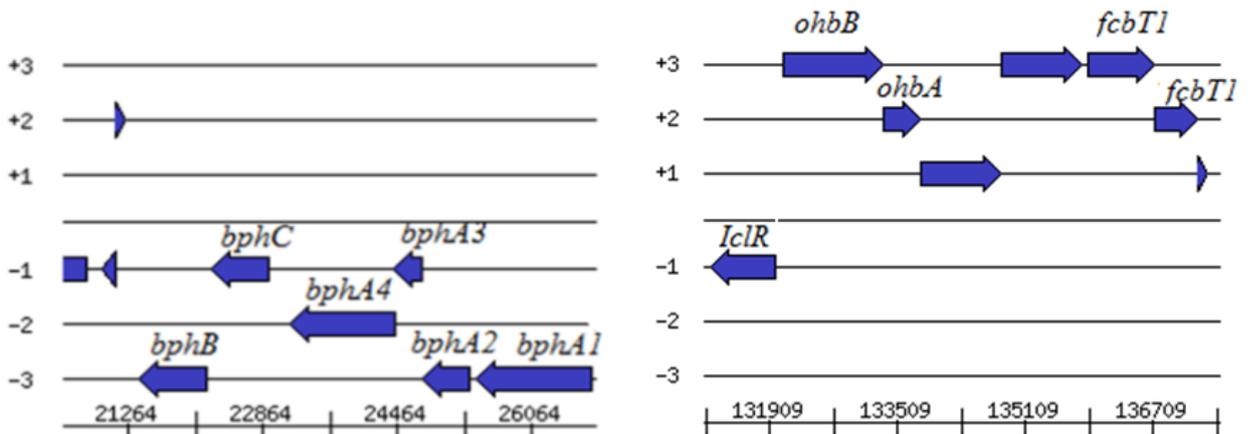


Рисунок 36 – Расположение генов деструкции бифенила и хлорбензойных кислот на плазмиде pRHWK1 штамма КТ112-7

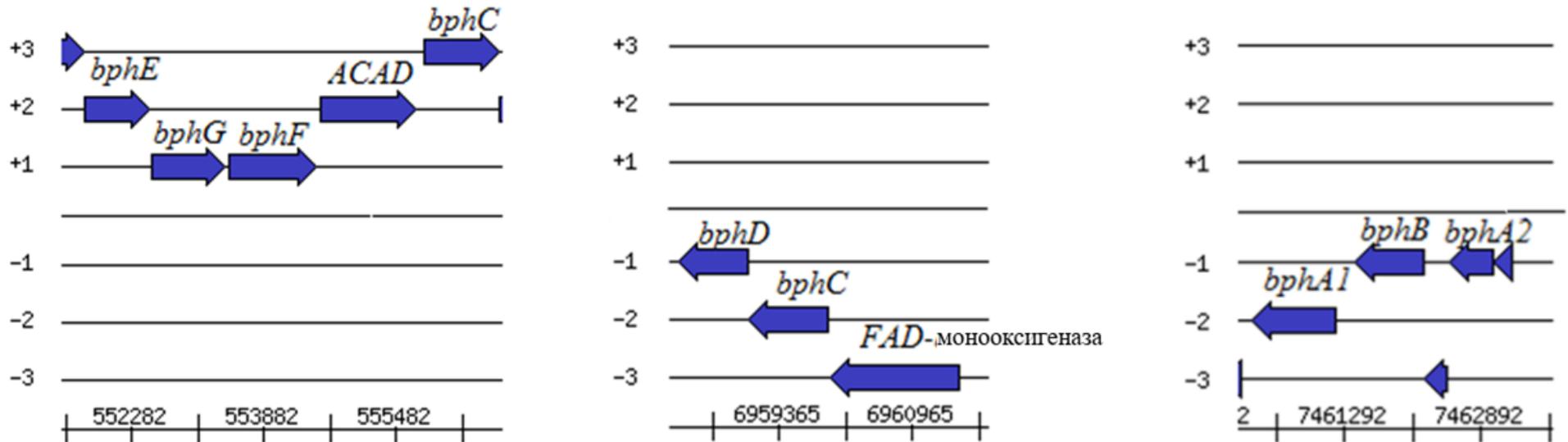


Рисунок 37 – Расположение генов деструкции бифенила/ПХБ на хромосоме штамма КТ112-7. *bphA1* – α -субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA2* – β - субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы; *bphA3* – ферредоксин, *bphA4* – ферредоксин редуктаза; *bphC* – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа; *bphD* – ГОФДК-гидролаза; *bphH(E)* – 2-кетто-4-пентеноат гидратаза; *bphI(F)*– 4-гидрокси-2-оксовалерат альдолаза, *ACAD* – Ацил-КоА-дегидрогеназа

Таблица 11 – Сравнение транслированных последовательностей генов деструкции бифенила и его производных, полученных при анализе генома штамма КТ112-7, с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Фермент, номер в классификации ЕС, локализация кодирующего его гена	Наиболее близкие гомологичные последовательности из GenBank, номер в GenBank, штамм-деструктор	Сходство, %
1	2	3
хромосома		
α -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA1), КФ 1.14.12.18 , хромосома	NDO α , BAE53376.1, <i>R. opacus</i> TKN14 NDO α , WP159929237.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WAY2 NDO α , AAR05106.1, <i>Rhodococcus</i> sp. P400	98 98 97
β -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA2), КФ 1.14.12.18 , хромосома	NarAb, ADM94822.1, <i>Rhodococcus</i> sp. G10 NarAb, BAN47213.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4 NarAb, AAR05107.1, <i>Rhodococcus</i> sp. P400	100 99 99
2,3-дигидрокси-2,3-дигидробифенил дегидрогеназа (BphB), КФ 1.3.1.87 , хромосома	NarB, BAN47215.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4 NarB, AQW45619.1, <i>Rhodococcus ruber</i> OA1 HcaB, QSE72234.1, <i>Rhodococcus</i> sp. PSBB049	99 99 99
2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (BphC), КФ 1.13.11.39 , хромосома	HsaC2, ANS26769.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP Экстрадиол диоксигеназа, тип I, ABG97580.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 Экстрадиол диоксигеназа, BAN54111.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	100 96 92
2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (BphC), КФ 1.13.11.39 , хромосома	BphC, ANS24889.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP BphC, QDQ89556.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9 Метапирокатехаза 2, ANK27384.1, <i>Rhodococcus opacus</i> PD630	99 99 99
2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (BphD), КФ 3.7.1.- , хромосома	гидролаза, ANS28558.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP гидролаза, ABG92156.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 гидролаза, AIP03552.1, <i>Rhodococcus opacus</i> R7	100 97 95
2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат гидролаза (BphD), КФ 3.7.1.- , хромосома	α/β гидролаза, AUS35655.1, <i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6-2 pDJL1 α/β гидролаза, ANQ76140.1, <i>Rhodococcus</i> sp. 008	98 98
2-кето-4-пентеноат гидратаза (BphH(E)), КФ 4.2.1.80 , хромосома	mhpD2, ANS26765.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP 2-кето-4-пентеноат гидратаза, QDQ91340.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9 BphH(E), ABG97576.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	99 97 95
4-гидрокси-2-оксваленрат альдолаза (BphI(F)), КФ 4.1.3.39 , хромосома	4-гидрокси-2-оксваленрат альдолаза 4, ANS26767.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP 4-гидрокси-2-оксваленрат альдолаза, QDQ91342.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9 4-гидрокси-2-оксваленрат альдолаза, ABG97578.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	99 99 97

1	2	3
pRHWK1		
α -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA1), КФ 1.14.12.18 , pRHWK1	BphA1, ABG99107.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	100
	BnzA1, BAD95523.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	100
	Толуол-индуцибельная диоксигеназа, AAL61663.2, <i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24	99
β -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA2), КФ 1.14.12.18 , pRHWK1	BphA2, ABG99106.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	100
	BnzA2, BAD95524.2, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	100
	Малая субъединица железосерного белка, AAL61664.1, <i>Rhodococcus aetherivorans</i> I24	97
Бифенил 2,3-диоксигеназа, ферредоксин (BphA3), pRHWK1	IpbA3, AAP74040.1, <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2	100
	BtfA3, BAQ00538.1, <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	100
	BnzA3, BAD95525.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	99
Бифенил 2,3-диоксигеназа, ферредоксин редуктаза (BphA4), КФ 1.18.1.3 , pRHWK1	BnzA4, BAD95526.2, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	100
	IpbA4, AAP74041.1, <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2	100
	BphAc, ABG99105.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	91
2,3-дигидрокси-2,3- дигидробифенил дегидрогеназа (BphB), КФ 1.3.1.87 , pRHWK1	BtfB, BAQ00541.1, <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	100
	BnzB, BAD95528.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	99
	BphB, ABG99101.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	99
2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа (BphC), КФ 1.13.11.39 , pRHWK1	BphC, BAA06872.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	100
	BnzC, BAD95527.2, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	100
	IpbC, AAP74042.1, <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2	100
2-кето-4-пентеноат гидратаза (BphH(E)), КФ 4.2.1.80 , pRHWK1	BphE3, ABG99132.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	92
	2-кето-4-пентеноат гидратаза, VAN47233.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	95
	MhpD4, ANS28948.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	97
pRHWK2		
α -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA1), КФ 1.14.12.18 , pRHWK2	NDO α , BAE53376.1, <i>R. opacus</i> TKN14	98
	NDO α , WP159929237.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WAY2	98
	NDO α , AAR05106.1, <i>Rhodococcus</i> sp. P400	97
β -субъединица бифенил диоксигеназы (BphA2), КФ 1.14.12.18 , pRHWK2	narAb, ADM94822.1, <i>Rhodococcus</i> sp. G10	100
	narAb, VAN47213.1, <i>Rhodococcus opacus</i> B4	99
	плазмида pROB02 идентична хромосомной nidB, BAE53377.1, <i>Rhodococcus opacus</i> TKN14	99

Установлено, что аминокислотные последовательности *bph*-генов, расположенных на плазмиде pRHWK1, имеют наибольший уровень сходства с аминокислотными последовательностями гомологичных ферментов известного штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1, а также с ферментами деструкции бензола и толуола штаммов-деструкторов ароматических соединений (таблица 11) (Suenaga *et al.*, 2002; Zielinski *et al.*, 2003; Furusava *et*

al., 2004; Ferraro *et al.*, 2007). Известно, что *bph*-гены штамма *R. jostii* RHA1 и *bnz*-гены штамма *R. opacus* B4, гомологичные *bph*-генам штамма KT112-7 располагаются на плаزمидах: pRHL1 и pROB02, соответственно. Плазмида pRHWK1 штамма KT112-7 и плазмида pROB02 штамма B4 сопоставимы по размерам (281912 т.п.н. и 244997 т.п.н., соответственно) (<http://nite.go.jp/nbrc/genom/projekt/annotation/B4.html>). Напротив, размер плазмиды pRHL1 штамма *R. jostii* RHA1 существенно отличается (1100 т.п.н.). Порядок расположения генов в оперонах данных штаммов также совпадает: у штаммов KT112-7 и RHA1 - *bphA1A2A3A4CB*, у штамма B4 – *bnzA1A2A3A4CB* (Na *et al.*, 2005, Pieper, 2005). Интересно отметить, что ген *bphD* выявлен только на хромосоме, но не на плазмиде штамма KT112-7. Ранее подобное расположение *bphD* гена описано для штамма *R. jostii* RHA1 (Masai *et al.*, 1997). Анализ нуклеотидных последовательностей гена *bphA1* штамма KT112-7, полученных в результате амплификации (таблица 8) и в результате полногеномного анализа, свидетельствуют о том, что использованные в настоящем исследовании праймеры позволили выявить ген *bphA1*, локализованный на плазмиде pRHWK1 штамма KT112-7.

Аминокислотные последовательности, кодируемые генами «верхнего» пути деструкции бифенила, расположенными на хромосоме и на плазмиде pRHWK2, имеют наибольший процент сходства с ферментами разложения нафталина и ряда других ароматических соединений штаммов рода *Rhodococcus* (таблица 11). Подобное сочетание генов деструкции бифенила в одном штамме (плазмидная локализация оперона с высоким уровнем сходства с классическими *bph*-генами и хромосомная локализация оперона с высоким уровнем сходства с генами деструкции нафталина) ранее не описана.

Интересно отметить, что аминокислотная последовательность β -субъединицы бифенил диоксигеназы штамма KT112-7 на 100% совпадает с β -субъединицей нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. G10 (таблица 11). Оба штамма выделены из почв Пермского края, но из разных

экотопов. Несмотря на то, что рассматриваемые гены расположены на хромосоме, в обоих штаммах присутствуют плазмиды большой молекулярной массы (рисунок 29). Наличие мобильных генетических элементов (плазмид) может являться основой распространения генов между штаммами различных местообитаний. Известно, что гены деструкции могут располагаться в транспозонах (Pieper, 2005; Bhatt *et al.*, 2021). Можно предположить, что исследуемые гены также имели транспозонную локализацию, что обусловило их встраивание в хромосому штамма. Ранее установлено, что штамм КТ112-7 использует нафталин в качестве ростового субстрата, однако гены нафталин диоксигеназы выявлены не были (Егорова и др., 2013). Полученные при анализе генома результаты позволяют предположить, что функцию окисления нафталина выполняет бифенил диоксигеназа, гены которой локализованы на хромосоме.

Таким образом, разнообразие *bph*-генов, представленных в геноме штамма КТ112-7 обуславливает его уникальную способность разлагать различные конгенеры хлорированных бифенилов и их модифицированных производных (см. главы 3, 5).

4.3.3. Гены деструкции (хлор)-/(гидрокси)- бензойных кислот

Штамм КТ112-7 утилизирует хлорбензойные кислоты – основные метаболиты аэробной бактериальной трансформации ПХБ (см. Глава 3,6). Анализ генома показал, что на хромосоме и на плазмиде pRHWK1 располагается оперон *lclRohbBAfcbT1* (рисунок 36, таблица 12). Вероятно, выявленные гены кодируют следующие ферменты: *lclR* – регуляторный белок, *ohbB* – α -субъединицу *орто*-галобензоат 1,2-диоксигеназы, *ohbA* – β -субъединицу *орто*-галобензоат 1,2-диоксигеназы, *fcbT1* – транспортный белок. В результате BLAST-анализа транслированных аминокислотных последовательностей установлено, что наиболее близкими ферментами являются диоксигеназы, осуществляющие гидроксирование

ароматического кольца штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* (таблица 12). Наличие генов *ohbAB* в геноме штамма КТ112-7 обуславливает способность разлагать 2-хлорбензойную кислоту.

Таблица 12 – Сравнение транслированных последовательностей генов деструкции гидроксилированных и хлорированных бензойных кислот, полученных при анализе генома штамма КТ112-7, с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Фермент, номер в классификации ЕС, локализация кодирующего его гена	Наиболее близкие гомологичные последовательности из GenBank, номер в GenBank, штамм-деструктор	Сходство, %
1	2	3
Салицилат гидроксилаза/ 2-гидроксибензоат гидроксилаза, КФ 1.14.13.1 , хромосома, 1617 п.н.	FAD-зависимая монооксигеназа, QQZ12995.1, <i>Rhodococcus</i> sp. 21391	99
	монооксигеназа, ANS25919.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	98
	монооксигеназа, ABG96696.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	95
4-гидроксибензоат гидроксилаза, КФ 1.14.13.2 , хромосома, 1179 п.н.	PobA, AHF21002.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 557	99
	PobA, ANS30736.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	98
	4-гидроксибензоат 3-монооксигеназа, ABG94344.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	97
FAD-зависимая монооксигеназа/3-гидроксибензоат гидроксилаза, КФ 1.14.13.- , хромосома, 1227 п.н.	Пентахлорфенол монооксигеназа, ANS30121.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	99
	FAD-зависимая оксидоредуктаза, QDQ94206.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	99
	Пентахлорфенол монооксигеназа, ABG93750.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	93
п-гидроксибензоат гидроксилаза/3-гидроксибензоат гидроксилаза, КФ 1.14.13.- , хромосома, 1200 п.н.	FAD-зависимая монооксигеназа, QQZ15601.1, <i>Rhodococcus</i> sp. 21391	99
	3-гидроксибензоат 6-гидроксилаза, QDQ94141.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	99
	3-гидроксибензоат 6-гидроксилаза, ANS30049.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	99
α -субъединица протокатехоат 3,4-диоксигеназа, КФ 1.13.11.3 , хромосома, 714 п.н.	PcaG, ANS29566.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	99
	PcaG, QDQ93627.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	99
	α -субъединица протокатехоат 3,4-диоксигеназа, ANK32654.1, <i>Rhodococcus opacus</i> PD630	97
β -субъединица протокатехоат 3,4-диоксигеназа, КФ 1.13.11.3 , хромосома, 642 п.н.	PcaH, QDQ93627.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	99
	PcaH, ANS29565.1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1CP	99
	pcaH, ABG93159.1, <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	97

1	2	3
<i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа ISP α белок, КФ 1.14.12.13 , хромосома, 1266 п.н.	ароматическая ДО, WP167116034.1, <i>Rhodococcus</i> sp. A14	99.76
	ароматическая ДО, WP144288569.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	98.81
	ароматическая ДО, WP109335575.1, <i>Rhodococcus</i> sp. S2-17	97.62
<i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа ISP β белок, КФ 1.14.12.13 , хромосома, 471 п.н.	ароматическая ДО, NDV05983.1, <i>Rhodococcus</i> sp. IEGM248	99.36
	ароматическая ДО, WP109335576.1, <i>Rhodococcus</i> sp. S2-17	99.36
	ароматическая ДО, WP197251146.1, <i>Rhodococcus</i> sp. CX	94.23
<i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа ISP α белок, КФ 1.14.12.13 , рRHWK1, 1266 п.н.	ароматическая ДО, WP167116034.1, <i>Rhodococcus</i> sp. A14	99.76
	ароматическая ДО, WP144288569.1, <i>Rhodococcus</i> sp. WB9	98.81
	ароматическая ДО, WP109335575.1, <i>Rhodococcus</i> sp. S2-17	97.62
<i>орто</i> -галобензоат 1,2-диоксигеназа ISP β белок, КФ 1.14.12.13 , рRHWK1, 471 п.н.	ароматическая ДО, NDV05983.1, <i>Rhodococcus</i> sp. IEGM248	99.36
	ароматическая ДО, WP109335576.1, <i>Rhodococcus</i> sp. S2-17	99.36
	ароматическая ДО, WP197251146.1, <i>Rhodococcus</i> sp. CX	94.23

Напротив, проведенный анализ генома штамма не позволил выявить гены, кодирующие ферменты разложения 4-хлорбензойной кислоты. Можно предположить, что утилизация 4-ХБК происходит под действием ферментов, кодируемых уникальными генами, либо за счет широкой субстратной специфичности других генов, кодирующих ферменты разложения ароматических соединений. Так, в геноме штамма КТ112-7 выявлен ген *robA*, кодирующий фермент 4-гидроксибензоат 3-монооксигеназу/4-гидроксибензоат гидроксилазу (таблица 12). Гомологичные гены с высоким уровнем сходства присутствуют в геномах штаммов *R. opacus* 1CP и *R. jostii* RNA1, известных активных деструкторов хлорароматических соединений. Можно предположить, что данный фермент осуществляет атаку 4-ХБК с последующим ее гидроксилированием. Ферменты штамма *Burkholderia* sp. NK8, кодируемые генами *cbeABCD*, осуществляют окисление 4-ХБК и 3-ХБК до 4-хлоркатехола, дальнейшая трансформация которого происходит по

модифицированному *орто*-пути (рисунок 7) (Francisco Jr *et al.*, 2001). В геноме штамма КТ112-7 выявлены гены, осуществляющие окисление 3-гидрокси-, 4-гидрокси- и 3,4-дигидрокси бензойных кислот (таблица 12). Также установлено, что в геноме штамма КТ112-7 представлены все гены, осуществляющие разложение катехола и хлоркатехолов до соединений цикла Кребса (данные не показаны). Таким образом, можно предположить, что разложение 4-ХБК штаммом КТ112-7 может осуществляться как через стадию гидроксированных бензойных кислот, так и через образование хлоркатехолов.

Таким образом, анализ генома штамма КТ112-7 выявил уникальное сочетание генов деструкции бифенила/ПХБ и соединений, образующихся при аэробной бактериальной трансформации бифенила/ПХБ, что свидетельствует о перспективности данного штамма для дальнейшего изучения и применения в технологиях разложения бифенила и его производных.

4.4. Разнообразие генов/ферментов, обуславливающих разложение (хлор)/(гидрокси)бензойных кислот и (хлор)катехолов, у активных штаммов-деструкторов и бактериальных ассоциаций

Разложение бифенила и его замещенных производных (хлорированных и/или гидроксированных бифенилов) аэробными бактериальными штаммами по классическому пути приводит к образованию в качестве основных метаболитов таких соединений, как бензойная кислота, моно-, ди- и три-хлорбензойные кислоты, моно- и ди-гидроксибензойные кислоты, а также (хлор)катехолы (рисунок 3) (Maltseva *et al.*, 1999; Pieper, 2005). В свою очередь, данные соединения являются токсичными для окружающей среды и их накопление может приводить к негативным последствиям. В микробиоме почв, длительное время загрязнённых ароматическими соединениями, в результате селекции формируется пул аэробных бактерий, способных разлагать данные вещества (Field, Sierra-Alvarez, 2008).

4.4.1. Характеристика генов/ферментов, участвующих в метаболизме (хлор)/(гидрокси)бензойных кислот и (хлор)катехолов, активных бактерий-деструкторов ПХБ

Способность использовать в качестве источника углерода основные метаболиты бифенила/ПХБ, образующиеся в результате аэробной бактериальной деструкции, изучена у штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51, выделенных из почвенных образцов, отобранных с территорий предприятий Перми и Пермского края (таблица 13, Приложение 3).

Таблица 13 – Рост штаммов на бензойной кислоте и ее хлор- и гидрокси-производных

Субстрат	<i>R. ruber</i> P25	<i>R. wratislaviensis</i> P1	<i>R. wratislaviensis</i> G10	<i>M. oxydans</i> B51
Бензойная кислота (БК)	++++*	++++	++++	++
2-НО-БК	++	++++	+++	++
3-НО-БК	++++	++++	++++	+++
4-НО-БК	++++	++++	++++	+++
2,5-диНО-БК	++++	++++	++++	++
3,4-диНО-БК	++++	++	++++	++++
2-ХБК	+++	++	++	+++
3-ХБК	+++	+++	+++	+++
4-ХБК	+++	++	++	++++
2,3-диХБК	++	+	++	++
2,4-диХБК	++	+	++	++
2,5-диХБК	+	+	++	+++
2,6-диХБК	++	+++	++	+++
3,5-диХБК	+	+	+++	++
3,4-диХБК	++	+	+++	+

*от + до ++++ - качественная оценка интенсивности роста штаммов на данных субстратах. Расшифровка субстратов приводится в Списке сокращений, а также в разделе 2.3

Установлено, что штаммы эффективно использовали в качестве ростового субстрата незамещенную бензойную кислоту, основной метаболит аэробной деструкции бифенила (таблица 13, рисунок 38). Анализ ростовых характеристик показал, что при культивировании штаммов *R. ruber* P25 и

M. oxydans В51 на БК удельная скорость роста составляла 0.033 ч^{-1} и 0.028 ч^{-1} соответственно, однако у штамма *M. oxydans* В51 наблюдалась длительная подготовительная фаза роста.

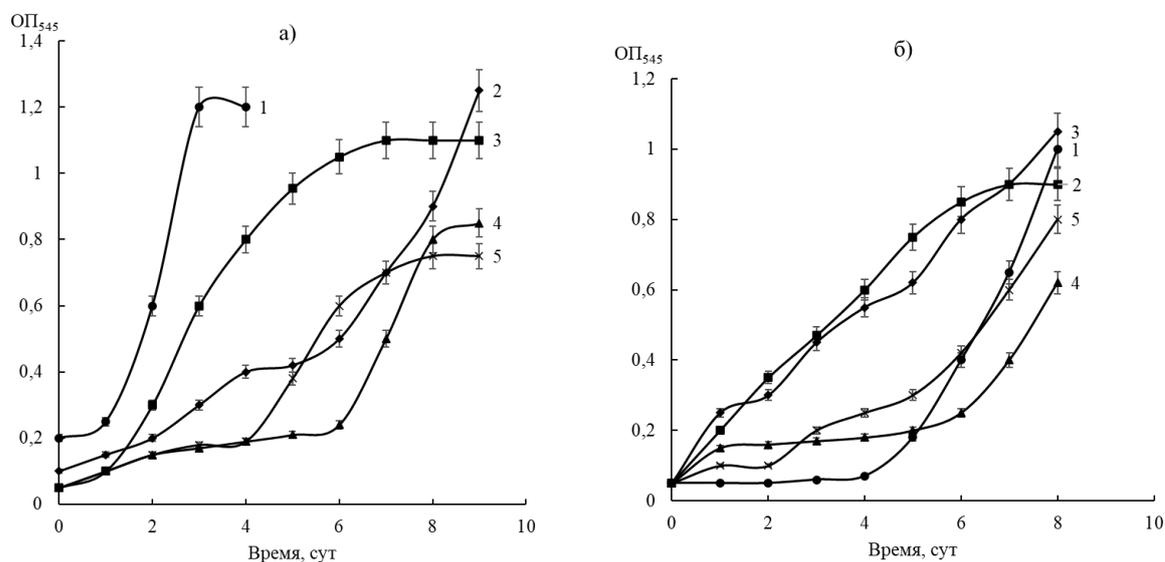


Рисунок 38 – Рост штаммов *R. ruber* P25 (а) и *Microbacterium* sp. В51 (б) на бензойной (1), 2-ХБК (2б), 3-ХБК (3), 4-ХБК (2а), 4-НО-БК (4) и 2,5-диНО-БК (5)

Способность осуществлять окисление бензойной кислоты обусловлена наличием бензоат 1,2-диоксигеназы (BenA) у исследуемых штаммов. В результате анализа нуклеотидной последовательности установлено, что *benA* штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* G10, *R. wratislaviensis* P1 имеет наибольшее сходство с геном бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*, а *benA*_{В51} - с геном α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов рода *Arthrobacter* (таблица 13, рисунок 39).

Таблица 14 – Сходство амплифицированных фрагментов гена *benA* с гомологичными генами штаммов-деструкторов

Штамм, размер фрагмента	Наиболее близкий гомологичный ген, штамм, номер в GenBank	Уровень сходства, %
<i>R. wratislaviensis</i> P1, 467 п.н.	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, AB048706.1	99
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, EU833983.1	99
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> PD630, CP003949.1	97
<i>R. ruber</i> P25, 493 п.н.	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. AF279141.1	93
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, AB048706.1)	88
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, EU833983.1	88
<i>R. wratislaviensis</i> G10, 539 п.н.	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1, AB048706.1	97
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, EU833983.1	97
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus opacus</i> B4, AP011115.1	95
<i>M. oxydans</i> B51, 262 п.н.	<i>benA</i> , <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM20117, CP018863.1	97
	<i>benA</i> , <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> NT16, CP072014.1	96
	<i>benA</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. DK17, EU833983.1	90

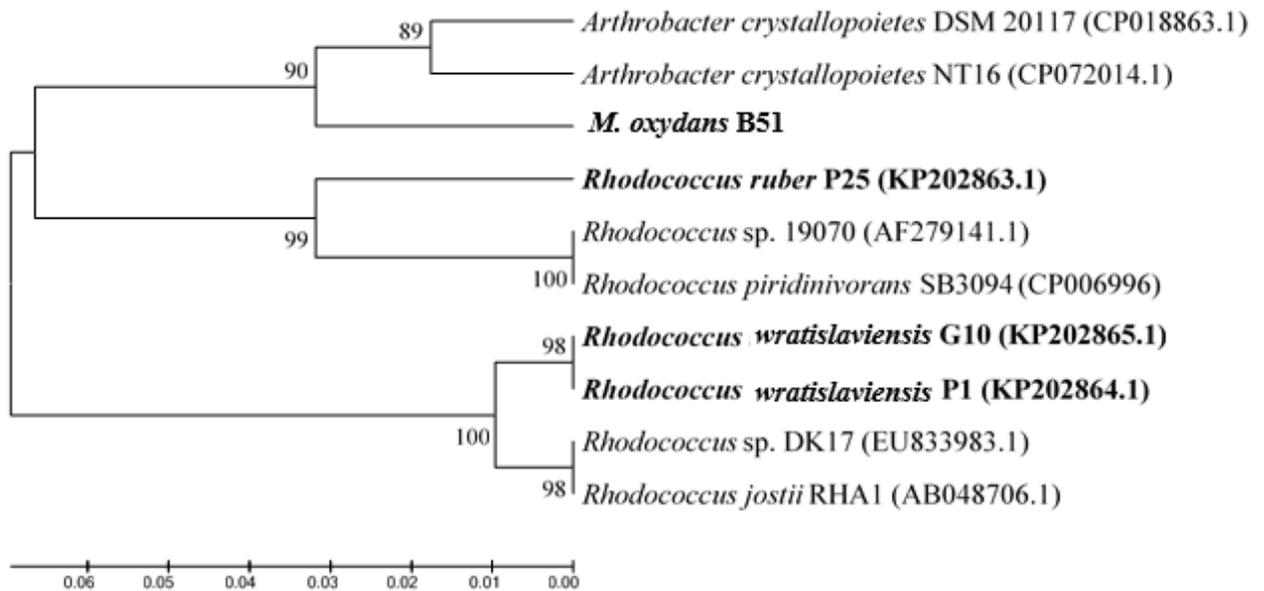


Рисунок 39 – Дерево сходства нуклеотидных последовательностей, гомологичных исследуемым участкам генов α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы, построенное методом UPGMA. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 пар нуклеотидов. “Bootstrap” - анализ проведен на 1000 повторностях. Жирным шрифтом выделены штаммы, нуклеотидные последовательности которых исследованы в настоящей работе

В результате кластерного анализа установлено, что *benA*_{G10} и *benA*_{P1} располагаются в одном кластере, наиболее близкими для них являются бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов *R. jostii* RHA1 и *Rhodococcus* sp. DK17, тогда как α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 находятся в других кластерах, что свидетельствует о различии между *benA*-генами данных штаммов (рисунок 39).

При культивировании штаммов на бензойной кислоте выявлена активность ферментов, обуславливающих трансформацию БК как через стадию образования катехола, так и через стадию образования 3,4-дигидроксибензойной кислоты (таблица 15, рисунок 40).

Таблица 15 – Удельная активность (мкМ/мин·мг) ферментов разложения ароматических соединений у исследуемых штаммов, при культивировании на БК

Фермент	<i>R. wratislaviensis</i> P1	<i>R. wratislaviensis</i> G10	<i>R. ruber</i> P25	<i>M. oxydans</i> B51
Кат 1,2-ДО	0.09	0.07	0.87	2.297
Кат 2,3-ДО	0	0.003	0/0.02**	0/5.15***
МЦИ	0.05	0.007	0.012	0.035
ПКК 2,3-ДО	0	0	0	0
ПКК 3,4-ДО	0.17	0.13	0.04	0
ПКК 4,5-ДО	0	0	0/15.0**	0
Гентизат ДО	0	0	0	0.178
ПГБГ	0	0	0/11.67**	0
Салицилат гидроксилаза	н.о.*	0	0	0/5.46***

* н.о. – не определяли, ** – при культивировании штамма P25 на 4-ХБК, *** – при культивировании штамма B51 на 2-ХБК

При культивировании на бензойной кислоте во всех штаммах выявлена активность катехол 1,2-диоксигеназы и муконат циклоизомеразы, что свидетельствует о разложении бензойной кислоты через стадию формирования катехола с последующей трансформацией по *орто*-пути.

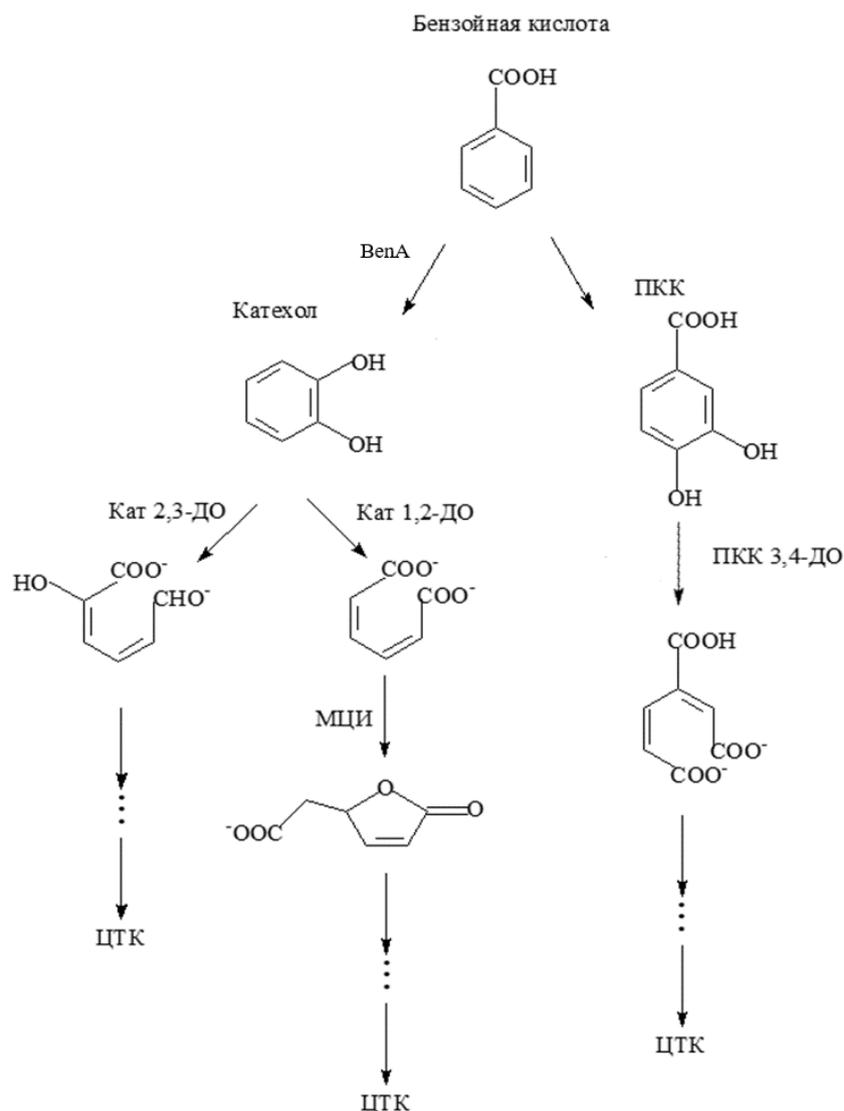


Рисунок 40 – Схема бактериальной деструкции бензойной кислоты, построенная на основании субстратной специфичности и ферментного профиля штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51

Интересным представляется факт, что катехол 2,3-диоксигеназа при культивировании на бензойной кислоте экспрессируется только в штамме *R. wratislaviensis* G10 в следовых количествах. Однако, в случае замены субстрата на хлорбензойную кислоту, активность данного фермента фиксируется у штаммов B51 и P25 (таблица 15). Данный факт указывает на то, что в штаммах *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 представлены оба фермента, но экспрессия зависит от субстрата культивирования.

Кроме ферментов, обуславливающих разложение БК по «катехольному» пути, выявлена активность протокатехоат 3,4-диоксигеназы (таблица 15, рисунок 40). Данный фермент является представителем группы интрадиольных диоксигеназ, в результате действия которого происходит окисление ароматического кольца до 3-карбокситис,тис-муконовой кислоты. Активность ПКК 3,4-ДО у штаммов *R. wratislaviensis* P1 и *R. wratislaviensis* G10, выращенных на бензойной кислоте, в 1.8–1.9 раза выше, чем активность кат 1,2-ДО. Вероятно, данные штаммы способны окислять бензойную кислоту по двум метаболическим путям – через стадию образования катехола и через стадию образования протокатеховой кислоты (рисунок 40). У штамма *M. oxydans* B51 протокатехоат диоксигеназ не выявлено, однако в клеточном экстракте зафиксирована активность гентизат-диоксигеназы. Такое сочетание ферментов существенно отличает штамм *M. oxydans* B51 от известных деструкторов ароматических соединений.

Установлено, что штаммы *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10 и *M. oxydans* B51 росли не только на незамещенной бензойной кислоте, но и на моно-хлорированных или моно-гидроксилированных бензойных кислотах и на дихлорбензойных кислотах. Сравнение ростовых характеристик показало, что моно-замещенные БК являются более доступным субстратом, чем ди-замещенные (таблица 13, рисунок 38).

Штамм *R. ruber* P25 эффективно рос на 3-хлор-, 4-хлор-, 4-гидрокси- и 2,5-дигидрокси-бензойных кислотах (рисунок 38а). Удельная скорость роста варьировала в диапазоне 0.018–0.03 ч⁻¹. Штамм *M. oxydans* B51 эффективно рос на 2-хлор-, 3-хлор-, 4-гидрокси- и 2,5-дигидрокси-бензойных кислотах (рисунок 38б). Удельная скорость роста составила 0.024–0.039 ч⁻¹, при этом длительной подготовительной фазы роста при культивировании на 2- и 3-хлорбензоате не отмечается.

Способность к разложению (хлор)/(гидрокси)-бензойных кислот может быть обусловлена как наличием специфических генов/ферментов первичной атаки, так и присутствием генов/ферментов, способных окислять широкий спектр ароматических соединений. Как было показано ранее, в штамме *R. ruber* P25 выявлены *fcf*-гены, обуславливающие начальное дегалогенирование 4-хлорбензойной кислоты (Плотникова и др., 2012). Проведенные исследования не выявили данных генов у штаммов *R. wratislaviensis* G10, *R. wratislaviensis* P1 и *M. oxydans* B51.

Также не была получена специфическая амплификация на тотальной ДНК исследуемых штаммов с *ohb*-генами, кодирующими ферменты первичной атаки 2-хлорбензойной кислоты. Напротив, у всех штаммов был амплифицирован ген *benA*, кодирующий α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы (таблица 14, рисунок 39). Известно, что бензоат 1,2-диоксигеназа обуславливает деградативную активность штаммов не только к бензойной кислоте, но и к ее хлорпроизводным, при этом образуются хлоркатехолы (рисунок 9, 12, глава 1.3) (Kitagawa *et al.*, 2001; Baggi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2017). Таким образом можно предположить, что у штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* G10, *R. wratislaviensis* P1 и *M. oxydans* B51 первичную атаку на хлорбензойные кислоты осуществляет бензоат 1,2-диоксигеназа с последующим образованием хлоркатехолов. Интересно отметить, что интенсивность роста штаммов *R. wratislaviensis* G10, *R. wratislaviensis* P1 на 3ХБК выше, чем на 2-ХБК и 4-ХБК, при этом *benA*_{P1} и *benA*_{G10} характеризуются высоким уровнем сходства с *benA*_{RHA1} (рисунок 39, таблица 13). Известно, что *BenA*_{RHA1} осуществляет окисление 3-ХБК до хлоркатехола (Kitagawa *et al.*, 2001). Напротив, штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51, бензоат 1,2-ДО которых отличается от *BenA*_{RHA1} (таблица 14, рисунок 38), активнее растут на 2-ХБК и 4-ХБК (таблица 13).

У штаммов *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* G10, *R. wratislaviensis* P1 и *M. oxydans* B51 выявлена катехол 1,2-ДО, проявляющая активность к хлоркатехолам (таблицы 15, 16).

Таблица 16 – **Относительная активность (%*) катехол 1,2-диоксигеназы исследуемых штаммов к хлорированным катехолам**

Хлоркатехол	<i>R. wratislaviensis</i> P1	<i>R. wratislaviensis</i> G10	<i>R. ruber</i> P25	<i>M. oxydans</i> B51
4-хлоркатехол	7	11	1	5
3,5-дихлоркатехол	9	0	0	22
3,6-дихлоркатехол	71	0	0	119
4,5-дихлоркатехол	0	0	0	4

* за 100% принимали активность катехол 1,2-ДО к незамещенному катехолу

Проведенные исследования показали, что катехол 1,2-ДО штаммов P25 и G10 окисляют только моно-замещенный катехол, тогда как катехол 1,2-ДО штаммов P1 и B51 способны окислять и дихлорированные катехолы (таблица 16, рисунок 41). Вероятно, исследуемые штаммы несут катехол 1,2-диоксигеназы, отличные по структуре.

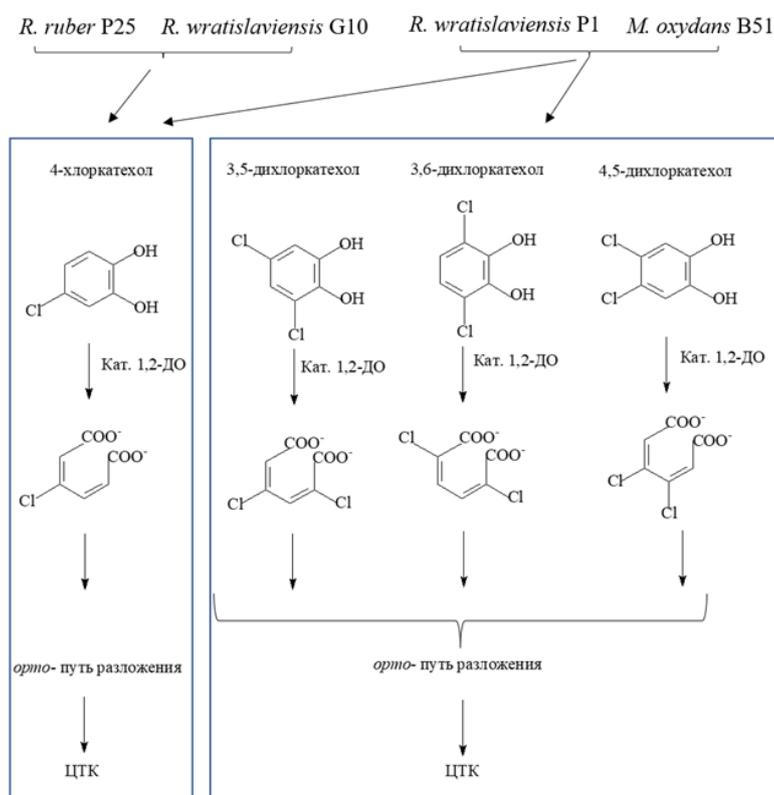


Рисунок 41 – **Схема бактериального разложения хлоркатехолов под действием катехол 1,2-диоксигеназы в штаммах *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* G10 и P1**

Культивирование штамма *M. oxydans* B51 на 2-ХБК приводит к экспрессии НАДФН-зависимой салицилат гидроксилазы (таблица 15, рисунок 42). При этом активность данного фермента сопоставима с активностью катехол 2,3-ДО. Полученные результаты позволяют предположить, что салицилат гидроксилаза штамма B51 осуществляет нетипичную реакцию гидролиза 2-ХБК до катехола, с последующим его *мета*-расщеплением до 2-гидроксимуконат полуальдегида.

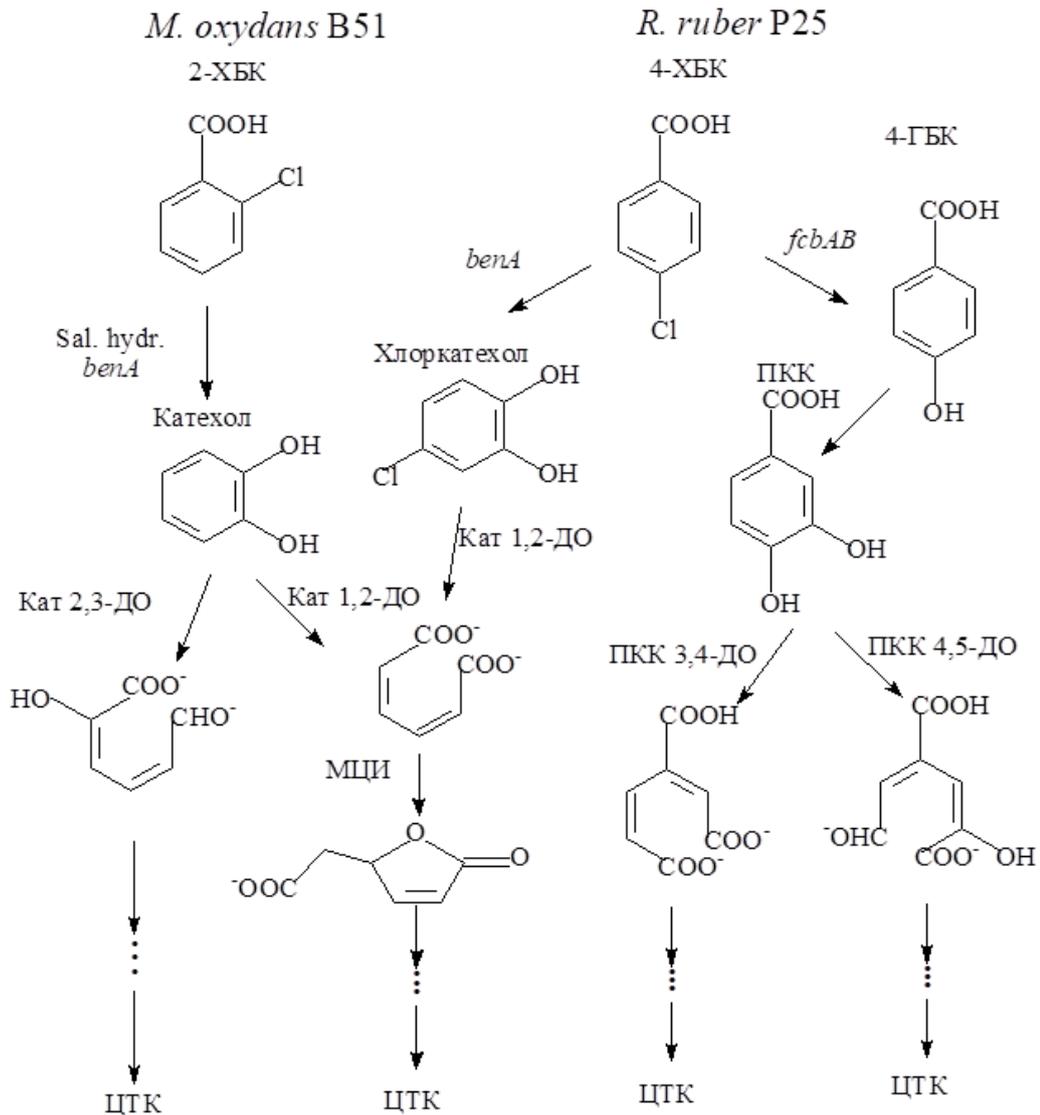


Рисунок 42 – Схема бактериальной деструкции хлорбензойных кислот, построенная на основании субстратной специфичности, генетического и ферментного профиля штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51

При культивировании штамма *R. ruber* P25 на 4-ХБК, наряду с катехол 2,3-ДО экспрессируются *para*-гидроксibenзоат гидроксилаза и протокатехоат 4,5-диоксигеназа (таблица 15, рисунок 42). Установлено, что ПГБГ_{P25} состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 43 кДа и 45 кДа, теряет активность при отсутствии в среде ФАД, а для сохранения стабильности фермента необходимо присутствие ЭДТА и ДТТ. Протокатехоат 4,5-ДО_{P25} была стабильна в течение 7 сут при температуре 4°C, а прогревание при 60°C приводило к потере активности за 5 мин. Каталитические характеристики данных ферментов составили: K_m для ПГБК 9.85 мкМ, K_m ПГБГ для NADH – 14.2 мкМ, K_m для ПКК – 5.26 мкМ. В случае культивирования штамма *R. ruber* P25 на 4-гидроксibenзойной кислоте в качестве ростового субстрата выявлена экспрессия ПКК 3,4-ДО, но не ПКК 4,5-ДО (как и в случае культивирования на незамещенной бензойной кислоте). Однако, ПКК 3,4-ДО была представлена двумя изоформами, характеризующимися разными значениями каталитических показателей: а) K_m для ПКК – 7.7 мкМ, V_{max} – 143 мкМ/ мин · мг белка; б) K_m для ПКК – 83 мкМ, V_{max} – 85 мкМ/ мин · мг белка. Присутствие нескольких изоформ одного фермента может являться адаптивным механизмом, позволяющим приспособиться штамму к химическому загрязнению (Ornston, Parke, 1976). Анализ полученных результатов позволяет предположить, что штамм *R. ruber* P25 обладает уникальным набором ферментов, позволяющих осуществлять трансформацию хлор- и гидроксibenзойных кислот как через стадию образования (хлор)катехола с его последующим *орто*- или *мета*-расщеплением, так и через стадию образования *para*-гидроксibenзойной кислоты, с последующим ее окислением до протокатеховой кислоты. В свою очередь, образующаяся ПКК является субстратом как для интрадиольных, так и для экстрадиольных диоксигеназ, представленных в данном штамме. Известно, что *para*-гидроксibenзоат гидроксилазы штаммов-деструкторов ароматических соединений родов *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Klebsiella* *Pseudomonas* и *Rhodococcus* осуществляют внедрение гидроксильной группы

в молекулу ПГБК по 3-му углеродному атому, что приводит к образованию протокатеховой кислоты (D'Argenio *et al.*, 1999; Jadan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008). Дальнейшее разложение ПКК может идти под действием трех ферментов, осуществляющих интрадиольный или экстрадиольный разрыв ароматического кольца молекулы (Hartnet *et al.*, 1990; Noda *et al.*, 1990; Overhage *et al.*, 1999; Vetting *et al.*, 2000). Наиболее распространенной является ПКК 3,4-ДО, осуществляющая интрадиольное окисление протокатеховой кислоты. ПКК 3,4-ДО описана для бактерий рода *Bacillus*, а ПКК 4,5-ДО – для представителей родов *Comamonas* и *Pseudomonas*.

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

4.4.2. Разнообразие α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы в микробных сообществах почв ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, Россия)

Для изучения разнообразия α -субъединицы бензоат диоксигеназы из образцов почв, отобранных на территории ОАО «СВЗХ» (Чапаевск, Россия), методом накопительного культивирования с различными селективными субстратами были получены бактериальные ассоциации, проявляющие деградтивную активность к субстрату селекции (таблица 17).

На ДНК-матрице 15 бактериальных ассоциаций с помощью праймеров *benA-F* и *benA-R* (таблица 2) были амплифицированы фрагменты гена *benA* (Baggi *et al.*, 2008). Нуклеотидные последовательности данных фрагментов размещены в базе данных GenBank (таблица 17).

Проведен филогенетический и кластерный анализ полученных фрагментов гена *benA* с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank (рисунок 43).

Таблица 17 – Бактериальные ассоциации, номера в GenBank амплифицированных участков гена *benA*

Селективный субстрат	Ассоциация / номер фрагмента гена <i>benA</i> в GenBank					
	CHN1/ MN396893	CHN2/ MN396894	CHN3/ MN396895	CHN4/ MN396896	CHN5/ MN396897	CHN6/ MN396898
бифенил	CHN1/ MN396893	CHN2/ MN396894	CHN3/ MN396895	CHN4/ MN396896	CHN5/ MN396897	CHN6/ MN396898
4-ХБК	A1/ МК403888	A2	A3	A4/ МК403889	A5/ МК403890	A6
хлорбензол	B1/ МК403891	B2/ МК403892	B3/ МК403893	B4/ МК403894	B5/ МК403895	B6/ МК403896

Установлено, что в ДНК исследуемых ассоциаций преимущественно амплифицировались гены бензоат диоксигеназ, характерных для бактерий филума *Proteobacteria*. Наиболее филогенетически близким среди генов бензоат 1,2-ДО активных штаммов-деструкторов ароматических соединений для фрагментов гена *benA* из ассоциаций CHN2, CHN3, CHN5 и CHN6 является соответствующий ген штамма *Ralstonia eutropha* JMP134 (уровень сходства 79.5–88.8%). Известно, что штамм *R. eutropha* JMP134 осуществляет разложение ароматических соединений широкого спектра, в том числе бензойной и хлорбензойных кислот (Field, Sierra-Alvarez, 2008).

Анализ показал, что наиболее близкими по нуклеотидной последовательности для гена *benA*, амплифицированного с ДНК ассоциаций CHN1, A1, A4, A5, B1, B2, B3, B4 и B6 являются гены, кодирующие α -субъединицу бензоат 1,2-ДО штаммов *Pseudomonas putida* KT2440 (GenBank LT799039.1) и *Pseudomonas putida* B6-2 (CP015202.1) – 96–99% сходства при 100%-ном перекрытии (Kahlon, 2016). При этом проанализированные гены формируют отдельный кластер на филогенетическом дереве (рисунок 42).

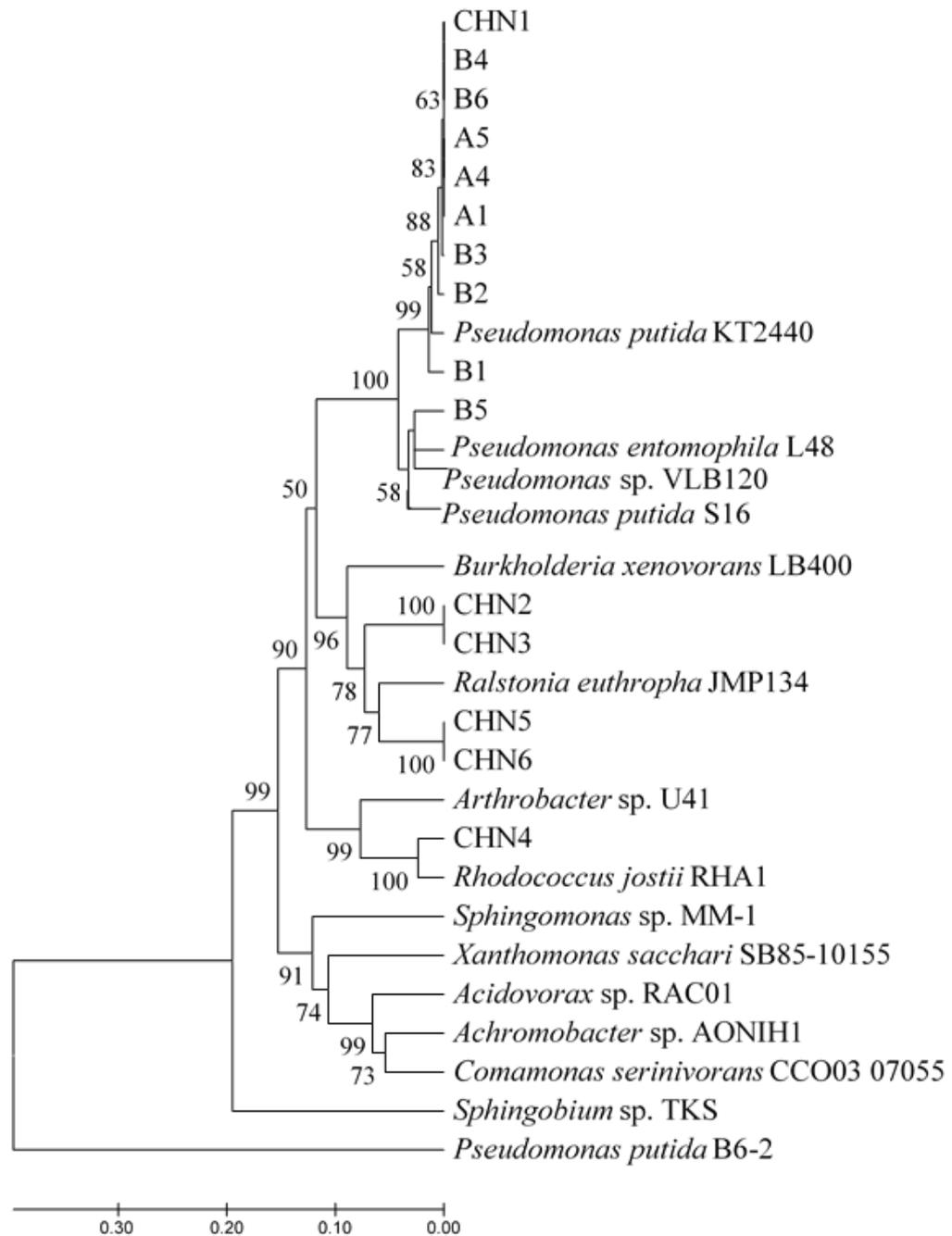


Рисунок 43 – **Дерево сходства выявленных генов с известными генами α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы, построенное методом UPGMA.** Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. «Bootstrap»-анализ проведен на 1000 повторностях. Значения рядом с «ветвями» показывают вероятность расположения последовательностей в данных группах.

Стоит отметить, что *benA*_{B5} располагается в одном кластере с генами бензоат 1,2-ДО штаммов *Pseudomonas* sp. VLB120 и *P. entomophila* L48 (рисунок 43), уровень сходства составил 93% при 100%-ном перекрытии, но в разных кластерах с *benA*-геном штамма *P. putida* S16 несмотря на то, что уровень сходства с данным геном при гомологичном поиске составил 95%. Известно, что в штамме *P. entomophila* L48 (GenBank CT573326) присутствуют ферментные системы, обеспечивающие метаболизм бензойной, 4-гидрокси-, 3-гидрокси- и 3,4-дигидрокси-БК. При этом бензоат 1,2-ДО участвует только в трансформации незамещенной бензойной кислоты (Vodovar *et al.*, 2006). Штамм *Pseudomonas* sp. VLB120 (GenBank CP003961), осуществляющий разложение октанола, толуола и стирола, был выделен из почв Штутгарта в Германии. Гены бензоат 1,2-ДО у обоих штаммов расположены на хромосоме (Köhler *et al.*, 2013). Обнаружение у территориально удаленных бактериальных штаммов высокоидентичных *benA*-генов свидетельствует в пользу теории о передаче генетического материала между бактериями в процессе адаптации к высокому уровню загрязнения химическими соединениями (Coleman, Chisholm, 2010; Li *et al.*, 2010; Dunning Hotopp, 2011; Syvanen, 2012; Polz *et al.*, 2013).

Фрагмент гена *benA* ассоциации CHN4 формирует единый кластер с соответствующим геном штаммов рода *Rhodococcus* класса *Actinobacteria* (рисунок 42). Стоит отметить, что *benA*_{CHN4} имеет высокий уровень сходства (96%) с соответствующим геном известного штамма-деструктора бифенила/ПХБ *Rhodococcus jostii* RHA1 (Kitagawa *et al.*, 2001).

Таким образом, гены α -субъединицы бензоат 1,2-ДО, выявленные в ДНК бактериальных ассоциаций, выделенных из почв, загрязненных хлорароматическими соединениями, обладают уникальными нуклеотидными последовательностями, что подтверждается отсутствием 100 %-го сходства с последовательностями известных генов *benA*, размещенными в международных базах данных. Наиболее гомологически близкими являются *benA*-гены штаммов родов *Pseudomonas*, *Ralstonia* и *Rhodococcus*.

ГЛАВА 5. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ КОММЕРЧЕСКИХ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СМЕСЕЙ ПОЛИХЛОРБИФЕНИЛОВ

5.1. Особенности деструкции экспериментальной и коммерческих смесей ПХБ индивидуальными штаммами

Так как в объектах окружающей среды ПХБ находятся преимущественно в виде смесей, то необходимо исследовать активность бактериальных штаммов-деструкторов не только по отношению к отдельным конгенерам ПХБ, но и к их смесям. Известно, что коммерческие смеси содержат от 40 до 70 конгенов ПХБ. В рамках настоящих исследований для начальной оценки активности штаммов в отношении смесей ПХБ была получена экспериментальная смесь (смесь А), состоящая из 20 конгенов с преимущественным содержанием тетра-замещенных хлорбифенилов (88.3% от всех конгенов) (Приложение 1, таблица 35).

В экспериментах с «отмытыми» клетками (см. глава 2.7.1) установлено, что штаммы родов *Rhodococcus* и *Microbacterium* проявляли высокую деградационную активность к смеси А (рисунок 44).

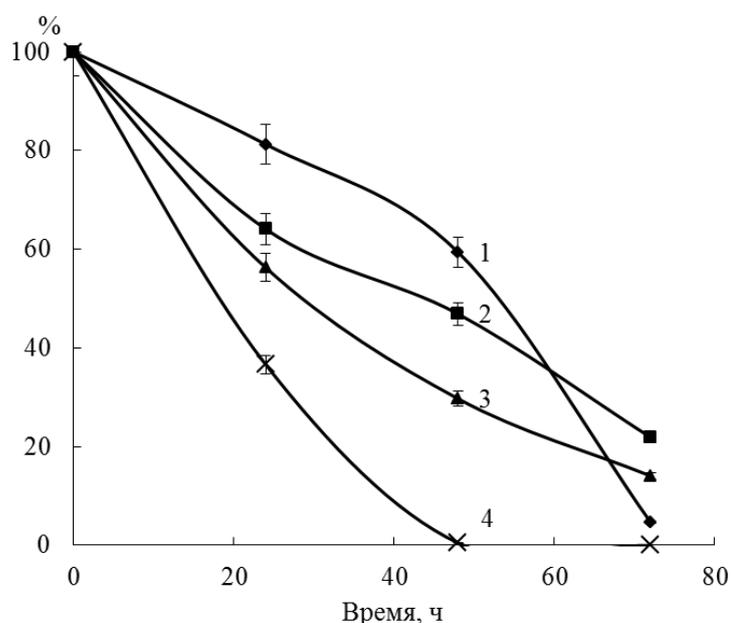


Рисунок 44 – Разложение смеси А (32 мг/л) штаммами *Rhodococcus* sp. B7a (1), *R. ruber* P25 (2), *R. erythropolis* G12a (3) и *M. oxydans* B51 (4)

За трое суток уровень деструкции составил 78–100%, при этом наибольшую активность проявлял штамм *M. oxydans* B51. Динамика деструкции смеси штаммами *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a и *M. oxydans* B51 имела профиль вогнутой кривой, характерной для большинства процессов бактериального разложения ароматических соединений. Напротив, штамм *Rhodococcus* sp. B7a наиболее активно разлагал смесь А на третьи сутки, в результате чего профиль графика деструкции существенно отличается от традиционного.

В литературе описаны бактериальные штаммы, осуществляющие деструкцию коммерческих смесей ПХБ - Aroclor 1242 и 1248, близких к смеси А по изомерному и гомологичному составу ПХБ и содержанию хлора (Приложение 1). Так, штамм *Alcaligenes eutrophus* H850 разлагал около 81% 10 мг/л Aroclor 1242 и 1248 в течение 2 сут, *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 - 57.5-73.3% 200 мг/л Aroclor 1242 – за 4 сут, а штаммы родов *Enterobacter*, *Ralstonia* и *Pseudomonas* осуществляли деструкцию на 37-91% 100 мг/л Aroclor 1242 – за 12 сут (Bedard *et al.*, 1987; Adebusoye *et al.*, 2008; Natamiany-Zarmi *et al.*, 2009). А.В. Kolar с сотр. (2007) были выделены и описаны штаммы рода *Rhodococcus*, способные разлагать 50-61% 50 мг/л Aroclor 1248 в течение 14 сут. *Rhodococcus erythropolis* Z6 трансформировал 56-60% хлорбифенилов в коммерческих смесях Aroclor 1248 (45 мг/л) и ПХБ50 (50 мг/л) за 14 сут (Petrič *et al.*, 2007). Таким образом, уровень деструкции хлорбифенилов смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 сопоставим с уровнем разложения смесей ПХБ грамотрицательными бактериями и значительно превышает аналогичный показатель, выявленный для грамположительных штаммов-деструкторов ПХБ.

Установлено, что в культуральной жидкости штаммов *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 при деструкции смеси А присутствуют соединения, характерные для разложения ПХБ по «верхнему» бифенильному пути (таблица 18).

Таблица 18 – Основные метаболиты разложения смеси А штаммами родов *Rhodococcus* и *Microbacterium*

Штамм	Время, ч	ди(ОН)-ПХБ, % от общего состава смеси	(хлор)ГОФДК		Производные бензойной кислоты, мг/л	
			$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ОП, ед.	ХБК	ГБК
B7a	24	1.51 ± 0.02		0.156	н.д.*	1.883 ± 0.004
	48	2.62 ± 0.03	440	0.181	0.079 ± 0.001	0.646 ± 0.002
	72	2.32 ± 0.02		0.206	0.057 ± 0.003	0.333 ± 0.002
G12a	24	3.88 ± 0.04	440	1.289	4.188 ± 0.002	0.382 ± 0.003
	48	5.45 ± 0.01	398	1.334	3.329 ± 0.001	0.935 ± 0.002
	72	5.16 ± 0.03	397	1.408	5.564 ± 0.004	4.191 ± 0.003
P25	24	6.71 ± 0.07	н.д.	н.д.	0.004 ± 0.001	н.д.
	48	19.42 ± 0.05	н.д.	н.д.	0.103 ± 0.002	н.д.
	72	21.85 ± 0.02	н.д.	н.д.	0.073 ± 0.002	0.031 ± 0.001
B51	24	н.д.	н.д.	н.д.	0.357 ± 0.001	н.д.
	48	н.д.	н.д.	н.д.	0.373 ± 0.002	н.д.
	72	н.д.	н.д.	н.д.	0.296 ± 0.001	н.д.

* н.д. – не детектировали

Установлено, что при деструкции смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a и *R. erythropolis* G12a не происходило накопления в среде в значительном количестве дигидрокси-полихлорбифенилов, но регистрировалось образование различных ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}} = 397, 398, 440$ нм (таблица 18). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназы (BphC) (КФ 1.13.11.39) данных штаммов. Напротив, при разложении смеси А штаммом *R. ruber* P25 не отмечено образование ГОФДК, но зафиксировано накопление ди(ОН)-ПХБ

(таблица 18). Известно, что хлорированные дигидрокси-хлорбифенилы осуществляют обратимое субстратное ингибирование BphC (Vaillancourt *et al.*, 2003). Вероятно, этим обусловлено более высокое содержание ди(ОН)-ПХБ в среде у штамма *R. ruber* P25. Ограничивать утилизацию ПХБ может также неспособность ГОФДК гидролазы (КФ 3.7.1.8) трансформировать ряд изомеров хлорированных ГОФДК. Так, ГОФДК, несущие ионы хлора в диеноатной части, слабо трансформируются гидролазами штаммов *R. globerulus* P6 и *B. xenovorans* LB400, тогда как ГОФДК с заместителями в фенольной части молекулы являются более доступным субстратом для ГОФДК гидролаз данных штаммов (Seach *et al.*, 2001). Анализ состава смеси А и возможных метаболических схем разложения показал, что основная доля образующихся ГОФДК содержит ионы хлора в обеих частях молекулы. ГОФДК гидролазы штаммов *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a и *R. ruber* P25 проявляют активность к хлорированным ГОФДК, о чем свидетельствует накопление невысоких концентраций ГОФДК и хлорбензойных кислот в культуральной среде. Интересно отметить, что у штамма *M. oxydans* B51 не зафиксировано присутствие таких метаболитов как дигидрокси-полихлорбифенилы и ГОФДК, однако есть хлорбензойные кислоты (таблица 18). Полученный результат свидетельствует о высокой активности ферментов «верхнего» пути у данного штамма.

Ранее нами установлено, что штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 используют монохлорированные бензойные кислоты в качестве источника углерода (см. раздел 4.4.1). В таблице 18 видно, что нет зависимости концентрации ХБК от времени деструкции. При этом зафиксировано присутствие гидроксibenзойных кислот, которые являются метаболитами аэробной бактериальной трансформации хлорбензойных кислот. По-видимому, штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 осуществляют разложение хлорбензойных кислот, образующихся при трансформации полихлорбифенилов смеси А. Ранее способность к утилизации моно- и дихлорбензойных кислот,

образующихся при разложении тетра-хлорбифенила, описана для штамма *Alcaligenes* sp. JB1 (Commaundeur *et al.*, 1996).

Установлено, что через трое суток инкубации штамма *Rhodococcus* sp. B7a со смесью А в культуральной среде фиксируется наличие ионов хлора - 83.8% от максимально возможного при полном дехлорировании исходной смеси хлорбифенилов.

Полученные данные свидетельствуют, что при утилизации смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 не происходит накопления значительных количеств токсичных хлорированных метаболитов, что позволяет их использовать в технологиях утилизации смесей полихлорированных бифенилов.

Для изучения активности штаммов в отношении коммерческих смесей ПХБ были использованы смеси Трихлорбифенил (ТХБ), Delor 103, Совол (Приложение 1, таблицы 33, 34). Коммерческие смеси ПХБ торговых марок Delor 103 (производство Чехии) и ТХБ (производство СССР) идентичны по набору конгенов ПХБ, и характеризуются преимущественным содержанием три- и тетра-хлорированных бифенилов. В смеси Совол основную долю составляют пента- и гекса-хлорбифенилы (Приложение 1, таблица 34). Среди всего спектра коммерческих смесей ПХБ наиболее близкими по составу к Delor 103/ТХБ являются Agoclor 1242 (производство США), Kaneclog 300 (производство Япония), а к составу Совола наиболее близкими являются Agoclor 1248 и Aroclog 1254 (производство США) (Приложение 1, таблица 32).

Изучена способность индивидуальных штаммов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, изолированных из образцов почв с разным уровнем загрязнения хлорароматическими соединениями (см. глава 3, Приложение 3), осуществлять разложение коммерческих смесей ПХБ (таблицы 19, 20).

Таблица 19 – Изменение концентрации Delor 103/ТХБ* (%) в процессе аэробной бактериальной деструкции

Время, сут	Штаммы-деструкторы				
	<i>Pseudomonas</i> sp. MD8	<i>Rhodococcus</i> sp. MD1	<i>Rhodococcus</i> sp. MD2	<i>R. wratislaviensis</i> КТ112-7	<i>R. ruber</i> P25
0	100	100	100	100	100
1	4.33	28.33	18.67	67.8	51.8
3				31.6	44.0
5	3.5	26.67	17.83		
7				27.3	24.4
8	1.2	8.33	16.67		
10				5.3	7.5
14	0	0	7.24	0	0
Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	0.556	0.311	0.283	0.293	0.259

*Начальная концентрация смеси Delor 103/ТХБ в экспериментах со штаммами *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и *Rhodococcus* sp. MD2 – 600 мг/л, со штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 – 100 мг/л

Анализ данных (таблица 19) показывает, что штаммы *Rhodococcus* sp. MD1, *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. ruber* P25 и *Pseudomonas* sp. MD8 осуществляют 100%-ное разложение смеси Delor 103/ТХБ за 14 сут. Исключение составляет штамм *Rhodococcus* sp. MD2. Для него была характерна низкая удельная скорость деструкции, а степень утилизации смеси Delor 103/ТХБ к 14 сут составила 92.7%.

Следует отметить, что штамм *Pseudomonas* sp. MD8 наиболее активно осуществлял разложение смеси ПХБ в первые сутки инкубации (уровень деструкции составил 95.67%), тогда как у штаммов рода *Rhodococcus* уровень деструкции Delor 103/ТХБ за первые сутки варьировал в диапазоне 32.2 – 81.33%. Известные граммотрицательные штаммы-деструкторы ПХБ *Pseudomonas aeruginosa* ТМУ56, *Pseudomonas* sp. SA-6, *Burkholderia* sp. TSN101, *Enterobacter* sp. SA-2 и *Ralstonia* sp. SA-5 осуществляют разложение Aroclor 1242 (100 – 200 мг/л) /Kaneclor 300 (50 – 150 мг/л) на 37 – 91%

(Mukerjee-Dhar *et al.*, 1998; Adebusoye *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Эффективность разложения коммерческой смеси ПХБ марки Совол исследуемыми штаммами была ниже, чем при деструкции Delor 103/ТХБ (таблица 20).

Таблица 20 – Изменение концентрации Совола* (%) в процессе деструкции бактериальными штаммами

Время, сут	Штаммы-деструкторы				
	<i>Pseudomonas</i> sp. MD8	<i>Rhodococcus</i> sp. MD1	<i>Rhodococcus</i> sp. MD2	<i>Rhodococcus</i> <i>wratislaviensis</i> KT112-7	<i>Rhodococcus</i> <i>ruber</i> P25
0	100	100	100	100	100
1	15.5	14.5	32.8	93.6	85.3
3				46.0	61.6
5	12.3	12.6	11.6		
7				28.8	59.4
8	9.8	12.5	10.3		
10				14.1	17.5
14	6.4	11.2	6.9	3.9	4.2
Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	0.290	0.259	0.284	0.195	0.174

*Начальная концентрация смеси Совол в экспериментах со штаммами *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и *Rhodococcus* sp. MD2 – 600 мг/л, со штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25 – 100 мг/л

Установлено, что за 14 сут штаммы *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25 и *Pseudomonas* sp. MD8 осуществляют разложение 88.8–96.1% смеси ПХБ марки Совол. Удельная скорость деструкции Совола у штаммов MD1, MD8, KT112-7 и P25 ниже аналогичного показателя при разложении Delor 103/ТХБ в 1.2–2.8 раза, тогда как у штамма *Rhodococcus* sp. MD2 значение удельной скорости деструкции было близким для обоих субстратов. Интересно отметить, что активный штамм-деструктор ПХБ *Paraburkholderia xenovorans* LB400 осуществляет разложение 25 мг/л Aroclor 1248 на 76% за 7 сут (Вако *et al.*, 2021).

При сравнении аналогичного периода деструкции в настоящем исследовании установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 разлагает за 7 сут 71.2% Совола, что близко к деградационной активности штамма LB400. Штамм *R. ruber* P25 разлагает 40.6% Совола, что ниже показателя штамма LB400, но в течение следующих 7 сут деструкция протекает активно, что свидетельствует о высоком биодеградационном потенциале данного штамма. Штаммы *Pseudomonas* sp. MD8, *Rhodococcus* sp. MD1 и MD2 за 8 сут осуществляют разложение 90.2, 87.5 и 89.7% Совола соответственно, что превышает аналогичный показатель штамма LB400.

На рисунке 45 представлены результаты биодеструкции групп конгенов ПХБ из смесей Delor 103/ТХБ и Совол штаммами *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* КТ112-7.

Через 7 суток культивирования убыль всех групп конгенов у штамма КТ112-7 составил 70–80%, а для штамма P25 – 75–80%. К 10 сут концентрация всех групп конгенов смеси Delor 103/ТХБ снизилась на 94–97% и 89–96% соответственно, а их исчерпывающая дегградация установлена по истечении 14 сут.

Для конгенов ПХБ смеси Совол процесс биоутилизации является более сложным. Наблюдается исчерпывающее биоразложение трихлорбифенилов за 10 сут и гептахлорбифенилов за 10 сут для штамма P25 и за 14 сут для штамма КТ112-7. Учитывая, что содержание три- и гептахлорбифенилов в составе смеси Совол находится на уровне 1% (Кириченко и др., 2000), процесс их дегградации не является определяющим. Деградационный потенциал по отношению к тетра- и пентахлорбифенилам является примерно одинаковым для всех штаммов: по истечении 14 сут этих конгенов осталось 2–4%. Для гексахлорированных конгенов (20% в смеси Совол) исчерпывающее биоразложение наблюдается за 14 сут в случае штамма КТ112-7, а для штаммов P25 этот показатель составляет 98%.

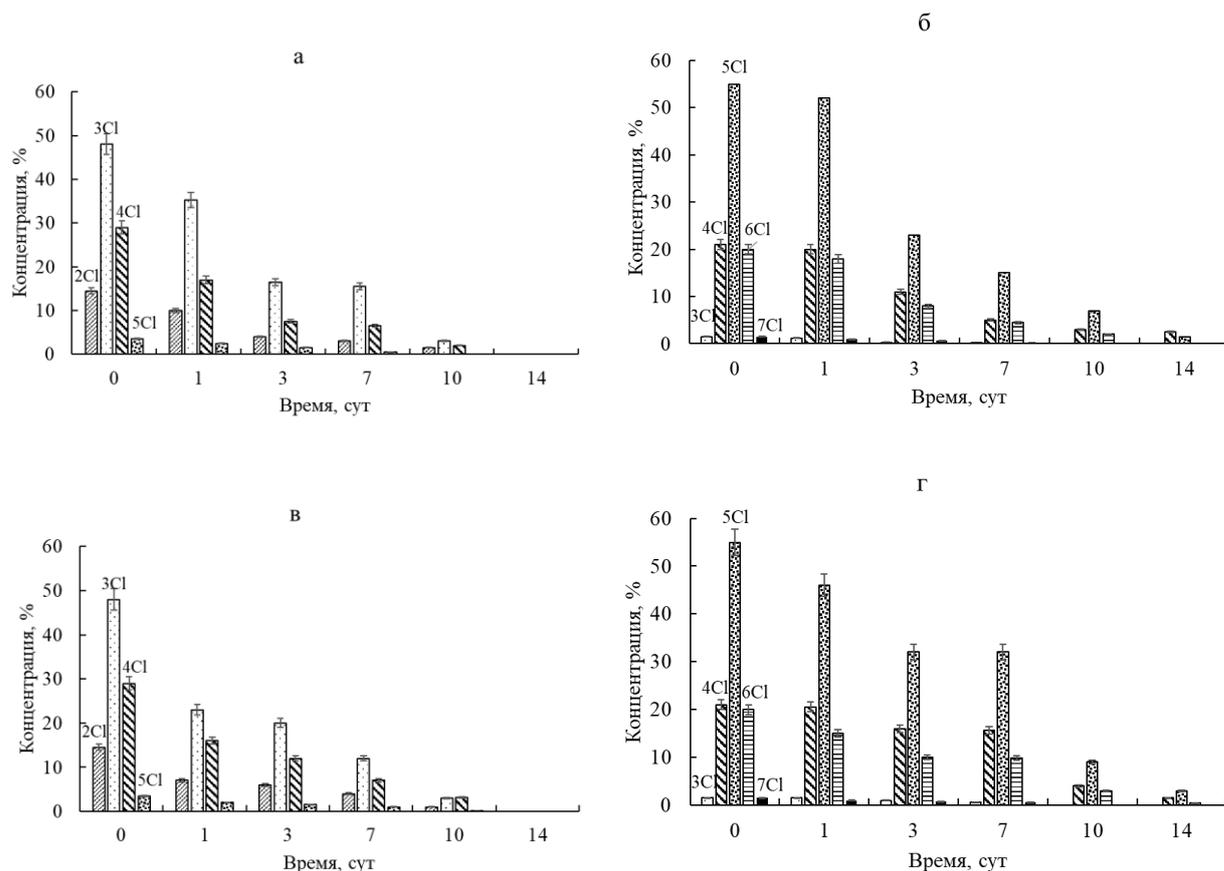


Рисунок 45 – Зависимость суммарных площадей пиков групп конгенов ПХБ от времени биодеструкции под действием бактериальных штаммов КТ112-7 (а, б) и Р25 (в, г) в диапазоне 0 – 14 сут: а, в – для смеси Delor 103/ТХБ; б, г – для смеси Совол: 2С1 – дихлорбифенилы, 3С1 – трихлорбифенилы, 4С1 – тетрахлорбифенилы, 5С1 – пентахлорбифенилы, 6С1 – гексахлорбифенилы, 7С1 – гептахлорбифенилы

Анализ полученных результатов показал, что исследуемые штаммы эффективно разрушают смеси ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол. Однако деградативные показатели в случае разложения смеси ПХБ марки Совол ниже, чем при трансформации смеси ПХБ марки Delor 103/ТХБ. Причина такого результата кроется, очевидно, в конгеномерном составе примененных для биоразложения смесей ПХБ и в особенностях ферментных систем самих штаммов.

Механизм биотрансформации конгенов ПХБ под действием аэробных бактерий изучен довольно подробно (Sylvestre, 1995; Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). В большинстве случаев для разложения конгенов ПХБ по «верхнему» бифенильному пути необходимо наличие в молекуле ПХБ двух вицинальных незамещенных атомов углерода для доступа бифенил диоксигеназы.

Учитывая конгенерный состав смесей ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол можно предположить, что для дихлорбифенилов из смеси Delor 103/ТХБ процесс биодеструкции под действием штаммов *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. ruber* P25 и *Pseudomonas* sp. MD8 будет проходить по классическому пути. При любом месторасположении атомов хлора в двух ароматических циклах (оба атома хлора в одном кольце или по одному в каждом) всегда найдется два вицинальных атома углерода, незамещенных атомами хлора.

Для трихлорированных конгенов из смесей ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол можно сделать точно такое же умозаключение: когда все три атома хлора находятся в одном цикле, а другой ароматический фрагмент свободен от хлорных заместителей, или, когда атомы хлора располагаются в циклах как {2+1}, тогда в последнем случае, по крайней мере в монохлорированном фрагменте, всегда будут существовать два вицинальных атома углерода, незамещенных атомами хлора.

Среди тетрахлорбифенилов, по всей вероятности, имеется только один конгенер – 3,5,3',5'-тетрахлорбифенил (ПХБ 80) (Mills III *et al.*, 2007), у которого отсутствуют два вицинальных атома углерода, незамещенных атомами хлора. Но данный конгенер в смесях ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол отсутствует.

Все пентахлорированные конгенеры из состава изучаемых смесей также могут быть трансформированы под действием бифенил 1,2-диоксигеназы по классическому пути. Схема «верхнего» пути затруднена, когда расположение пяти атомов хлора в двух ароматических циклах будет как {3+2}. При этом в

ароматическом кольце с наибольшим количеством заместителей не должно быть необходимых вицинальных атомов, а в менее хлорированном цикле атомы хлора должны располагаться при С-3 и С-5. Таким требованиям соответствуют два конгенера – 2,3,5,3',5'- (ПХБ 111) и 3,4,5,3',5'- пентахлорбифенил (ПХБ 127) (Mills III *et al.*, 2007), которых нет в смесях ПХБ Delor 103/ТХБ и Совол.

Строение гексахлорбифенилов из смеси Совол, для которых схема «верхнего» пути затруднена, может характеризоваться расположением атомов хлора как {3+3}, так и {4+2}. Для строения {4+2} таким требованиям отвечает только 2,3,4,5,3',5'-гексахлорбифенил (ПХБ 162), которого в смеси Совол нет, а для строения {3+3} – таких конгенов будет десять: 2,4,5,2',4',5'- (ПХБ 153), 2,4,6,2',4',6'- (ПХБ 155), 2,3,5,2',3',5'- (ПХБ 133), 3,4,5,3',4',5'- (ПХБ 169), 2,4,5,2',4',6'- (ПХБ 154), 2,3,5,2',4',5'- (ПХБ 146), 2,4,5,3',4',5'- (ПХБ 167), 2,3,5,2',4',6'- (ПХБ 148), 2,4,6,3',4',5'- (ПХБ 168), 2,3,5,3',4',5'-гексахлорбифенил (ПХБ 162) (Mills III *et al.*, 2007). Из всех перечисленных гексахлорированных конгенов только ПХБ 153 входит в состав смеси Совол, а его количество вместе с соэлюировавшимся ПХБ 132 (2,3,4,2',3',6'-) составляет 6.1% (Кириченко и др., 2000). Кроме того, в составе смеси Совол присутствует гептахлорированный ПХБ 180 (2,3,4,5,2',4',5'-) (0.6%), у которого отсутствуют вицинальные свободные атомы углерода в молекуле.

Очевидно, что схема разложения ПХБ 153 и ПХБ 180 будет отличаться от классического пути аэробной биодеструкции ПХБ. Можно предположить, что в данном случае в процессе трансформации молекулы ПХБ будут участвовать ферменты класса монооксигеназ, а не диоксигеназ. Известно, что в окислении хлорароматических соединений у бактерий могут участвовать флавиновые монооксигеназы (группа D) (КФ 1.14.14.9) и цитохром P450 монооксигеназы (КФ 1.14.14.1) (Luo *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018; Goto *et al.*, 2018; Paul *et al.*, 2021). В результате действия монооксигеназ образуются моногидроксилированные производные ароматических/хлорароматических

соединений. Анализ генома исследуемых штаммов показал, что штамм KT112-7 (GenBank CP072193.1) содержит цитохром P450 монооксигеназу, сходную с гомологичными ферментами штаммов рода *Rhodococcus*, окисляющими ароматические углеводороды, в том числе бифенил (Luo et al., 2016) (см. главу 5.3, рисунок 36, таблица 12). В геноме штамма P25 (GenBank LDUF01000000) выявлен ген уникальной FAD-зависимой монооксигеназы, схожей с гомологичным ферментом штаммов-деструкторов бифенила рода *Rhodococcus* менее чем на 90%. Полученные результаты позволяют предположить, что в окислении ПХБ 153 и ПХБ 180 у штаммов KT112-7 и P25 принимают участие ферменты класса монооксигеназ. Однако остается неясным дальнейший метаболический путь моногидроксипроизводных, которые образуются при монооксигеназной атаке конгенов ПХБ. В работе (Sun et al., 2018) представлено, что под действием метилтрансфераз происходит метилирование гидроксипроизводных ПХБ. Однако в геномах штаммов рода *Rhodococcus*, использованных в настоящей работе, не выявлено генов, гомологичных указанным выше генам метилтрансфераз. Таким образом, вопрос участия монооксигеназ исследуемых штаммов в окислении отдельных конгенов в смесях ПХБ, их биodeградативная активность и дальнейший метаболический путь образовавшихся гидроксипроизводных ПХБ может послужить основой для дальнейшего исследования процессов бактериальной трансформации ПХБ.

Так как в строении тетра- и пентахлорированных конгенов ПХБ, а также большинства гексахлорированных ПХБ, входящих в состав исследуемых смесей Delor 103/ТХБ и Совол, присутствуют необходимые вицинальные атомы углерода для действия бифенил-диоксигеназы, то снижение скорости деструкции, вероятно, обусловлено особенностями взаимодействия фермента с высокохлорированными бифенилами. Известно, что чем выше степень хлорирования молекулы ПХБ, тем больше времени необходимо для адаптации активного центра и преобразования молекулы фермента в оптимальную конформацию для взаимодействия с молекулой

ПХБ и тем ниже скорость биоразложения хлораренов (Cao *et al.*, 2011). Наиболее труднодоступными для диоксигенирования являются конгенеры ПХБ, содержащие заместители в *пара*-положении (4,4'-), так как пространственно их молекулы занимают гораздо больше места, чем хлорарены с *мета*- или *орто*-атомами хлора, что ограничивает доступ активного сайта для быстрого связывания ПХБ с ферментами. В смеси ПХБ Delor 103/ТХБ количество конгенов, не содержащих *пара*-атомов хлора, составляет менее 50% (Приложение 1, таблица 33), в смеси Совол таких конгенов более 80%. Очевидно, что такие характеристики смеси ПХБ Совол, как более высокая степень хлорирования конгенов и большее содержание в ней *пара*-замещенных конгенов по сравнению со смесью Delor 103/ТХБ, синергетически влияют на снижение скорости биодеструкции под действием штаммов рода *Rhodococcus*. Полученные в настоящем исследовании результаты по эффективности разложения групп конгенов штаммами рода *Rhodococcus* согласуются с описанными закономерностями (Cao *et al.*, 2011).

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

5.2. Деструкция коммерческих смесей ПХБ бактериальными ассоциациями

Одну из ведущих позиций в биотехнологиях, связанных с разложением сложных ароматических соединений, занимают бактериальные ассоциации. Описаны как природные, так и созданные искусственно ассоциации аэробных бактериальных штаммов, проявляющие активность

к коммерческим смесям ПХБ (Bokvajová *et al.*, 1994, Kolar *et al.*, 2007, Kwon *et al.*, 2008; Papale *et al.*, 2017; Horváthová *et al.*, 2018).

Изучена деструктивная активность к коммерческим смесям ПХБ марок Delor 103/ТХБ и Совол бактериальных ассоциаций, выделенных из почв ОАО «СВЗХ» (г. Чапаевск, Россия) (таблицы 21, 22). Бактериальные ассоциации были получены методом накопительного культивирования с использованием в качестве селективного фактора бифенила из образцов почв, отобранных в 2012 г (ассоциации Ch2 и Ch6) и в 2018г (ассоциации R24 и R63).

Установлено, что за 8 сут бактериальные ассоциации Ch2 и Ch6 осуществляют разложение смеси ПХБ Delor 103/ТХБ на 99.98%, а бактериальные ассоциации R24 и R63 за аналогичный период времени разлагают 99.38–99.76% Delor 103/ТХБ (таблица 21). Скорость деструкции Delor 103/ТХБ у исследуемых ассоциаций также имела близкие значения. Метаболический профиль (наличие в культуральной среде ГОФДК и ХБК) позволяет считать, что разложение конгенов в составе Delor 103/ТХБ происходит по «верхнему» бифенильному пути. Однако выявлены существенные различия в накоплении метаболитов. Установлено, что концентрация хлорбензойных кислот, образующихся при разложении конгенов Delor 103/ТХБ бактериальными ассоциациями, выделенными из образцов почв 2012 г, на три порядка ниже, чем в случае разложения Delor 103/ТХБ бактериальными ассоциациями, выделенными из образцов почв 2018 г (таблица 21).

Анализ литературы показал, что описано несколько аэробных бактериальных сообществ, проявляющих деградтивную активность к Delor 103/ТХБ или к коммерческим смесям ПХБ с близким конгенерным составом (Приложение 1). Бактериальные сообщества, изолированные из почв Норвегии и Южной Кореи разлагают Aroclor 1242 (аналог Delor 103/ТХБ) на 50% (начальная концентрация 1 мг/л) и 36–71% (начальная концентрация 42 мг/л) соответственно, выделенные из почв Словакии и

Чехии разлагают Delor 103 в концентрации 23 мг/кг на 73–85% и 50–68% соответственно (Bokvajová *et al.*, 1994, Kwon *et al.*, 2008; Papale *et al.*, 2017; Horváthová *et al.*, 2018).

Таблица 21 – Разложение смеси Delor 103/ТХБ* бактериальными ассоциациями

Ассоциация	Время сут	Концентрация смеси ПХБ, %	Метаболиты		
			ГОФДК, о.е.	ХБК, г/л	НО-БК, г/л
Ch2	1	0.11	6.45	$(60 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(150 \pm 21) \times 10^{-6}$
	4	0.09	4.91	$(50 \pm 2) \times 10^{-6}$	$(50 \pm 1) \times 10^{-6}$
	8	0.02	4.12	$(20 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(20 \pm 1) \times 10^{-6}$
Ch6	1	0.22	1.97	$(290 \pm 12) \times 10^{-6}$	$(990 \pm 23) \times 10^{-6}$
	4	0.12	1.29	$(80 \pm 2) \times 10^{-6}$	$(470 \pm 31) \times 10^{-6}$
	8	0.02	0.86	$(40 \pm 1) \times 10^{-6}$	$(70 \pm 2) \times 10^{-6}$
R24	0	100	0	0	н.о.**
	4	0.45	3.387	$(6.4 \pm 1) \times 10^{-3}$	н.о.
	8	0.29	4.129	$(10.9 \pm 3) \times 10^{-3}$	н.о.
R63	0	100	0	0	н.о.
	4	0.91	1.615	$(7.8 \pm 2) \times 10^{-3}$	н.о.
	8	0.62	2.124	$(10.6 \pm 2) \times 10^{-3}$	н.о.

* Концентрация смеси Delor 103/ТХБ – 13.8 мг/л, **н.о. – не определяли

В таблице 22 показана эффективность разложения коммерческой смеси ПХБ марки Совол бактериальными ассоциациями Ch2, Ch6, R24 и R63. Совол по конгенерному составу отличается от Delor 103/ТХБ. В нем основная доля приходится на (тетра-гекса)-замещенные конгенеры (Приложение 1, таблица 34).

Таблица 22 – Разложение коммерческой смеси ПХБ марки Совол*
бактериальными ассоциациями

Ассоциация	Время сут	Концентрация смеси ПХБ, %	Метаболиты		
			ГОФДК, о.е.	ХБК, г/л	НО-БК, г/л
Ch2	4	0.1	0.470	$(3.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
	8	0.04	0.531	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
Ch6	4	0.1	0.322	$(6.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
	8	0.03	0.141	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^{-6}$	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^{-6}$
R24	4	0.39	0.475	$(18 \pm 1) \times 10^{-3}$	н.о.
	8	0.18	0.531	$(28 \pm 2) \times 10^{-3}$	н.о.
R63	4	0.36	0.313	$(28 \pm 1) \times 10^{-3}$	н.о.
	8	0.33	0.534	$(27 \pm 1) \times 10^{-3}$	н.о.

* Концентрация смеси Совол 55 мг/л

Установлено, что все ассоциации осуществляют разложение Совола. Уровень деструкции за 8 сут культивирования составил 99.67–99.97%. Полученный результат свидетельствует о высокой деградативной активности данных бактериальных ассоциаций не только к коммерческим смесям класса Delor 103/ТХБ, но и к смесям с более высокохлорированными конгенерами. Сравнение скорости деструкции показывает, что Совол является более труднодоступным субстратом для исследуемых бактериальных ассоциаций, чем Delor 103/ТХБ. Бактериальные штаммы, выделенные из ПХБ-загрязненных донных отложений на территории Хорватии, разлагают 50–61% Aroclor 1248 (50 мг/л) (Kolar *et al.*, 2007).

Анализ метаболитов позволяет утверждать, что, как и в случае разложения конгенов Delor 103/ТХБ, конгенеры ПХБ, входящие в состав Совола, разлагаются ферментами «верхнего» бифенильного пути. Концентрация ГОФДК в среде ниже, чем при разложении Delor 103/ТХБ. Несмотря на то, что ГОФДК, образующиеся при разложении конгенов Совола, содержат большее число атомов хлора в молекуле, ГОФДК-гидролазы проявляют к ним высокую активность. Концентрация

хлорбензойных кислот ниже, чем можно было предполагать исходя из количества окисленных ПХБ. Кроме того, среди метаболитов, образующихся при разложении конгенов Соведа бактериальными ассоциациями Ch2 и Ch6, зафиксировано присутствие основных метаболитов бактериальной трансформации ХБК – гидроксibenзойных кислот. Можно предположить, что ассоциации Ch2, Ch6, R24 и R63 осуществляют разложение Соведа не только до стадии образования ХБК, но и далее, до соединений основного обмена клетки.

Таким образом, из природных объектов (почв), длительное время загрязнённых ПХБ, выделены бактериальные ассоциации, активно трансформирующие коммерческие смеси ПХБ, что, в сочетании с низким содержанием метаболитов в среде, делает их перспективными для применения в биотехнологиях ремедиации ПХБ-загрязнённых территорий.

5.3. Трансформация смеси гидрокси- и метокси-полихлорированных бифенилов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7

Несмотря на физико-химическую стабильность и токсичность, ПХБ могут трансформироваться в окружающей среде до гидрокси-производных (НО-ПХБ). Известно, что гидроксилирование может происходить как под действием абиотических факторов, так и в результате ферментативных процессов в живых организмах (Bedard, 2003; Kasai *et al.*, 2003; Camara *et al.*, 2004; Buckman *et al.*, 2006; Rezek *et al.*, 2007; Passatore *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Сравнительно недавно в результате анализа осадков сточных вод на территории КНР наряду с НО-ПХБ были обнаружены метоксипроизводные ПХБ (Ме-ПХБ) (Sun *et al.*, 2016). Кроме того, изменение структуры ПХБ в результате внедрения новых заместителей может происходить в результате химического синтеза, направленного на снижение устойчивости молекулы ПХБ к внешним воздействиям. В настоящем исследовании изучены вопросы бактериальной трансформации модифицированных ПХБ.

5.3.1. Эффективность бактериальной деструкции различных концентраций смеси GM

Впервые показана возможность бактериальной трансформации смеси, содержащей в своем составе гидроксированные и метоксилированные производные ПХБ. Смесь гидрокси- и метокси-производных была синтезирована для исследования, так как известно, что образование гидроксированных и метоксилированных ПХБ возможно в естественных условиях окружающей среды, а данные соединения относятся к вторичным поллютантами (Sun *et al.*, 2016, 2018, Bhalla *et al.*, 2016).

Смесь GM получена в результате химической модификации коммерческой смеси ПХБ марки Совол (взаимодействие с MeONa в среде MeOH и ДМСО) (Боярский и др., 2007; Плотникова и др., 2017). В результате 100%-ной конверсии Совола, в составе смеси GM представлены метокси-ПХБ (Me-ПХБ) – 24.8%, гидрокси-ПХБ (НО-ПХБ) – 36.4%, метокси(гидрокси)-ПХБ (Me,НО-ПХБ) – 38.8% (Приложение 4, рисунок 81, таблица 39).

Анализ полученных результатов показывает, что эффективность деструкции смеси GM составила 73–93 % при исходной концентрации 0.25–1.50 г/л (рисунок 46).

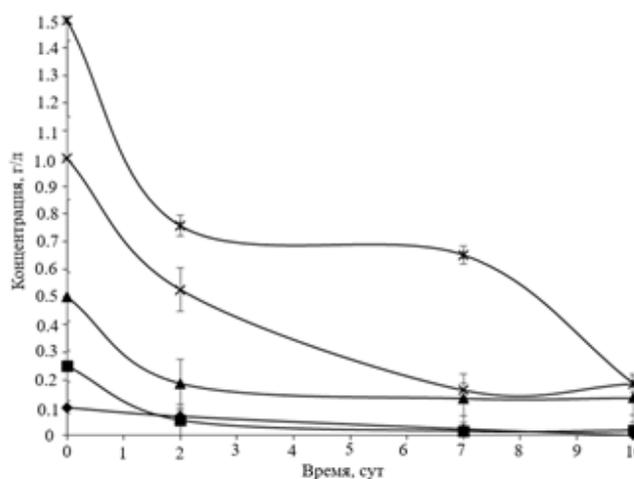


Рисунок 46 – Динамика убывания смеси GM в результате деструкции штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7: 1 – 0.10 г/л, 2 – 0.25 г/л, 3 – 0.50 г/л, 4 – 1.00 г/л, 5 – 1.50 г/л

Наиболее оптимальным и стабильным является процесс бактериальной деструкции смеси GM, исследованной в концентрации 0.10 г/л. Динамика деструкции носила линейный характер, а на 10 сут пиков продуктов на хроматограмме практически не зарегистрировано (рисунок 47).

Повышение концентрации исследуемой смеси GM приводит к тому, что профиль кривой убыли соединений, входящих в состав смеси, становится вогнутым и приближается к классической экспоненциальной кривой (рисунок 46), характерной для процесса бактериальной деструкции труднодоступных субстратов (Saavedra *et al.*, 2010).

Установлено, что скорость деструкции смеси GM штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7 находится в прямой корреляционной зависимости от исходной концентрации смеси (в пределах исследованного диапазона) и составляет 11.4 мг·л·сут⁻¹, 23.3 мг·л·сут⁻¹, 36.5 мг·л·сут⁻¹, 81.4 мг·л·сут⁻¹ и 131.3 мг·л·сут⁻¹ при исходной концентрации 0.10 г/л, 0.25 г/л, 0.50 г/л, 1.00 г/л и 1.50 г/л соответственно. Коэффициент корреляции составил 0.99.

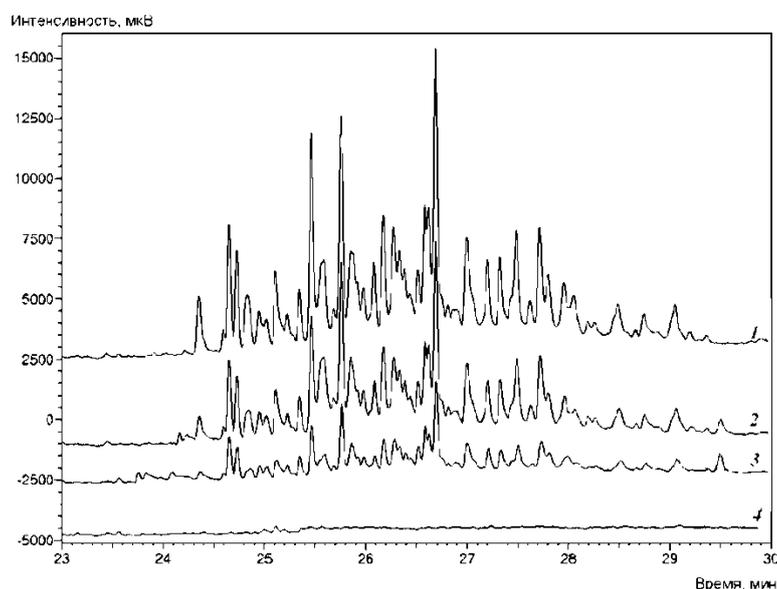


Рисунок 47 – Хроматограммы гексановых экстрактов смеси GM с концентрацией 0.10 г/л после 0 (1), 2 (2), 7 (3) и 10 (4) суток бактериальной деструкции

Методом ВЭЖХ установлено, что профиль хроматограммы культуральной среды, содержащей смесь GM, изменяется в процессе бактериальной деструкции не равномерно (рисунок 48).

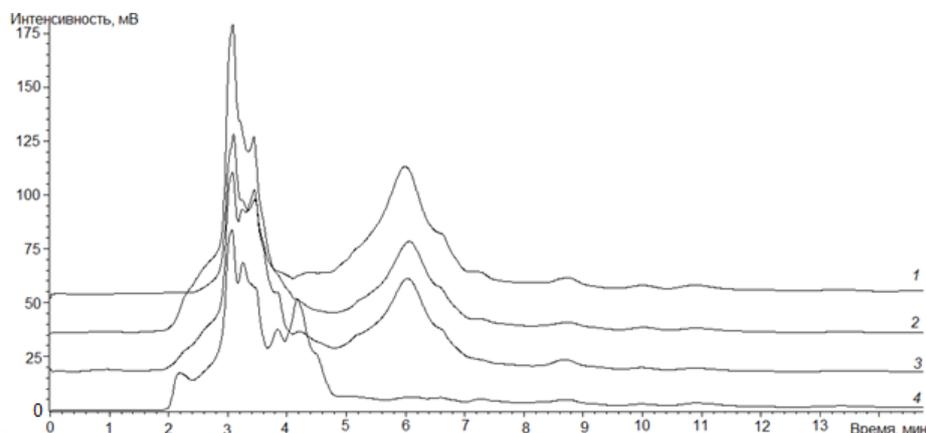


Рисунок 48 – Хроматограммы культуральной среды штамма *R. wratislaviensis* KT112-7, содержащей смесь GM с начальной концентрацией 0.1 г/л после 0 (1), 2 (2), 7 (3) и 10 (4) суток бактериальной деструкции

Вероятно, что в процессе биоразложения происходит образование замещенных катехолов, а также гидроксibenзойных кислот, о чем свидетельствует увеличение или появление на хроматограмме пиков веществ со временем удерживания в диапазоне 2.0–4.8 мин (рисунок 49). Данные соединения являются промежуточными при бактериальной трансформации замещенных ароматических веществ (Егорова и др., 2013; Tehrani, Van Aken, 2014), а их наличие подтверждает глубокую трансформацию смеси GM с последующей полной минерализацией. Анализ хроматограмм показывает, что на 10 сут концентрация замещенных катехолов снижается, а пики соединений, элюирующихся с колонки после 5 мин и относящихся к исходной смеси GM, отсутствуют. Установлено, что при более высоких исходных концентрациях смеси GM в культуральной среде также фиксируется появление и накопление замещенных катехолов и гидроксизамещенных бензойных кислот в начальный период биотрансформации смеси с последующим их разложением. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что биодеструкция смеси ГМ, содержащей гидрокси- и метокси-замещенные ПХБ, с участием штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 не приводит к накоплению токсичных для окружающей среды соединений.

5.3.2. Деструкция смеси ГМ иммобилизованными и планктонными клетками штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7

Известно, что повышение эффективности бактериальной трансформации химических соединений может быть достигнуто путем иммобилизации клеток бактериальных штаммов на инертном носителе (Alvares *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018).

Установлено, что сорбционная емкость активированного угля БАУ-А в отношении клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 составляет 6.04 ± 0.01 мг клеток/г БАУ-А, а сорбционная емкость активированного вискозного углеродного волокна Карбопон-В-актив – 6.26 ± 0.02 мг клеток/г Карбопон-В-актив.

Анализ адсорбционной стабильности комплексов «клетки штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 – БАУ-А» и «клетки штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 – Карбопон-В-актив» показал, что в течение 96 ч не происходит вымывания клеток в минеральную среду. Величина оптической плотности минеральной среды не изменялась и составила $ОП_{600}=0.0053 \pm 0.0003$ ед. Вероятно, в результате взаимодействия гидрофобных поверхностей углеродных носителей и клеток штамма КТ112-7 происходит адгезия, что способствует эффективному удержанию бактериальных клеток на использованных в данном исследовании сорбентах. Явление прочного удержания клеток бактерий на углеродных носителях описано для штаммов *R. ruber* gt1 и *Pseudomonas fluorescens* C2 (Максимова и др., 2010).

Таким образом, оба углеродных сорбента (БАУ-А и Карбопон-В-актив) могут быть эффективно использованы для иммобилизации клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7.

Изучена способность иммобилизованных и планктонных клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 разлагать смесь ГМ в концентрации 0.5 г/л (рисунок 49).

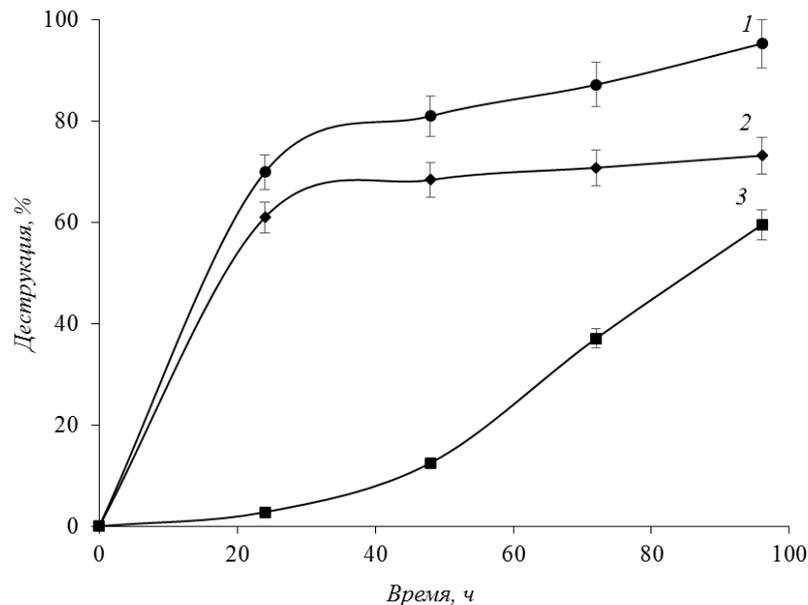


Рисунок 49 – Деструкция смеси модифицированных ПХБ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7: 1 – клетки, иммобилизованные на Карбопон-В-актив, 2 – планктонная культура, 3 – клетки, иммобилизованные на БАУ-А

Анализ динамики разложения смеси модифицированных ПХБ показал, что при трансформации субстрата планктонной культурой клеток наиболее активно процесс протекает в первые сутки (61% деструкции через 24 ч) с последующим выходом на «плато» (73.2% к 96 ч) (рисунок 49). Аналогичная динамика прослеживается в случае иммобилизации клеток штамма КТ112-7 на Карбопон-В-актив. Однако эффективность трансформации смеси модифицированных ПХБ выше, и достигает 95.3% (рисунок 49).

При иммобилизации клеток штамма КТ112-7 на активированном угле БАУ-А общая деструкция через 96 ч составила 59.5%, что существенно ниже, чем при применении в качестве сорбента углеродного волокна Карбопон-В-актив. Достоверность линейной аппроксимации процесса деструкции смеси модифицированных ПХБ клетками штамма КТ112-7, иммобилизованными

на БАУ-А, составила 0.912, что позволяет предположить линейный характер данного процесса.

Контрольные варианты, в которых использовали носитель без иммобилизованных клеток, не отличались по количественным показателям изменения концентрации смеси модифицированных ПХБ в среде от экспериментов по определению сорбционной емкости БАУ-А и Карбопон-В-актив к исследуемой смеси модифицированных ПХБ. При этом, сорбционная емкость у активированного угля к модифицированным ПХБ была выше, чем у углеродного волокна. Данный факт, вероятно, оказал влияние на эффективность деструкции исследуемой смеси штаммом КТ112-7, несмотря на то, что количество сорбированной на носителях смеси модифицированных ПХБ было незначительным (не превышало 0.08% от начальной концентрации для БАУ-А и 0.02% от начальной концентрации для Карбопон-В-актив).

Известно, что внесение в среду активированного угля приводит к уменьшению уровня токсичности и биоаккумуляции ПХБ для ряда организмов (Weber, Mrozek, 1979; Wang *et al.*, 2016). Снижение токсичности субстрата может приводить к повышению деградационной активности биодеструкторов в отношении ПХБ. Вероятно, данный эффект наблюдается в случае применения иммобилизации клеток штамма КТ112-7 на углеродном волокне.

Внесение в ПХБ-содержащую среду гранулированного активированного угля с адгезированными бактериями оказывает влияние на процесс адсорбции отдельных конгенов ПХБ, снижая сорбционную емкость носителя в отношении высокохлорированных ПХБ (Mercier *et al.*, 2013). Можно предположить, что подобный эффект наблюдается и в случае применения БАУ-А с иммобилизованными клетками штамма КТ112-7 в отношении модифицированных ПХБ. Тогда соотношение отдельных компонентов в смеси в свободном состоянии изменяется так, что в среде остаются наиболее замещенные соединения. Известно, что деградационная

активность бактериальных штаммов снижается с увеличением степени хлорирования бифенила (Pieper, 2005; Gioia *et al.*, 2014). Сочетание данных явлений приводит к снижению уровня деструкции смеси модифицированных ПХБ клетками штамма КТ112-7, иммобилизованными на БАУ-А.

Анализ деградационной активности планктонных и иммобилизованных клеток штамма КТ112-7 в отношении отдельных компонентов смеси GM был проведен только для значений, полученных в конце эксперимента (96 ч инкубации) (таблица 23). Используемая смесь является сложной по своему составу. В ней представлено 16 типов производных бифенила, отличающихся заместителями в молекуле (Приложение 4, таблица 39), однако некоторые компоненты смеси GM при газохроматографическом анализе могут элюироваться с колонки с одинаковым временем удерживания.

Проведенный анализ показал, что иммобилизованные и планктонные клетки штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляли деструктивную активность практически ко всем соединениям, представленным в смеси GM (таблица 23). Для планктонной культуры не отмечено стопроцентное разложение представленных в качестве субстрата соединений за 96 ч эксперимента. Напротив, при использовании клеток штамма КТ112-7, иммобилизованных на активированном угле БАУ-А, к концу эксперимента процент деструкции модифицированных ПХБ составлял от 12 до 100%, причем полному разложению подверглись гидрокси- и метоксипроизводные ПХБ, содержащие 4-5 атомов хлора (таблица 23, Приложение 4, таблица 39). Также в 1.5 раза, по сравнению с содержанием в исходной смеси, сократилось количество определяемых производных ПХБ.

Анализ состава смеси GM после деструкции с применением клеток штамма КТ112-7, иммобилизованных на углеродном волокне Карбопон-В-актив, показал, что количество производных сократилось в 3 раза и большинство модифицированных ПХБ подверглись полному разложению (таблица 23, Приложение 4, таблица 39).

Таблица 23 – Деструкция модифицированных ПХБ из смеси ГМ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7

Номер соединения*	Деструкция, %		
	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки на БАУ-А	Иммобилизованные клетки на Карбопон-В-актив
1	81.4 ± 0.1	58.9 ± 0.1	100
4	54.5 ± 0.2	58.0 ± 0.2	79.7 ± 0.3
3	58.5 ± 0.1	60.7 ± 0.2	100
3	60.5 ± 0.2	51.3 ± 0.1	92.1 ± 0.2
3	53.8 ± 0.1	55.7 ± 0.1	92.2 ± 0.2
4	73.1 ± 0.3	68.8 ± 0.2	100
4	88.8 ± 0.2	18.0 ± 0.1	88.1 ± 0.2
3	61.2 ± 0.1	12.4 ± 0.2	76.9 ± 0.1
10, 4, 3	92.5 ± 0.5	84.2 ± 0.3	100
4	87.7 ± 0.4	0	67.0 ± 0.3
2	91.4 ± 0.1	92.2 ± 0.1	92.4 ± 0.1
10,2	56.9 ± 0.3	86.7 ± 0.1	100
10,5,2	11.1 ± 0.5	79.9 ± 0.3	100
12,10,9,5,4,2	61.6 ± 0.1	52.5 ± 0.2	93.0 ± 0.1
10,2	82.5 ± 0.2	64.8 ± 0.2	93.4 ± 0.2
10,9,2	81.0 ± 0.1	100	100
12,10,3	71.9 ± 0.2	84.8 ± 0.1	100
12,10,8	66.4 ± 0.1	75.0 ± 0.3	100
12,10,9	75.1 ± 0.1	46.1 ± 0.3	100
12,10,2	78.7 ± 0.3	73.0 ± 0.1	100
12,9	77.4 ± 0.2	52.8 ± 0.2	100
12,9,2	88.2 ± 0.1	100	100
12,7,2	69.9 ± 0.2	100	100
12,10,2	56.3 ± 0.2	83.7 ± 0.2	92.1 ± 0.3
13,12,9,7,2	78.3 ± 0.2	62.6 ± 0.2	100
16,13,12,11,10,7	71.5 ± 0.4	87.7 ± 0.3	100
14,13,12,10,7,6	74.2 ± 0.3	18.8 ± 0.4	100
13,12	81.2 ± 0.2	56.2 ± 0.2	100
16,13,12	19.5 ± 0.2	100	100
16,13,12	81.5 ± 0.4	100	100
13,12,10	95.5 ± 0.4	100	100
16,13,12,6	90.9 ± 0.3	100	85.8 ± 0.1
16,14,13,11	82.7 ± 0.2	100	100

* структуры соединений, соответствующие указанным номерам, представлены в Приложении 4 рисунок 80, таблица 39

Анализ состава смеси GM в абиотическом контроле не выявил изменений в составе представленных в начальной смеси гидрокси-, метокси- и гидроксиметоксипроизводных хлорированных бифенилов. Таким образом, отличие в составе смеси модифицированных ПХБ после деструкции штаммом КТ112-7, иммобилизованном на разных носителях, может быть обусловлено более высокой разлагающей активностью системы «клетки КТ112-7 – Карбопон-В-актив».

В работе (Kim *et al.*, 2004) показано, что при культивировании инактивированных клеток штаммов рода *Bacillus* в синтетической пептонной среде, содержащей коммерческую смесь ПХБ марки Совол, в течение 10 дней, адсорбционная емкость клеток составила 2.0–13.6 мкг ПХБ/мг клеток. В настоящем исследовании установлено, что инактивированные клетки штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 не сорбируют на своей поверхности смесь модифицированных ПХБ в достоверно значимых количествах. Сорбционная емкость клеток к используемой смеси колебалась в пределах 0.008–0.011 мкг смеси GM/мг клеток и не зависела от продолжительности эксперимента. Так как количество сорбированных на клетках модифицированных ПХБ не превышает 0.001% от исходной концентрации, то данная величина в расчетах эффективности деструкции не учитывалась.

Так как наилучший результат по разложению смеси GM был получен при использовании в качестве носителя углеродного волокна Карбопон-В-актив, то мы рассмотрели два варианта культивирования штамма КТ112-7 на данном волокне для эффективного разложения смеси GM: кратковременный (24 ч) и длительный (96 ч). Процесс биодеструкции наиболее активно осуществляется в первые 24 ч инкубации. Убыль субстрата описывается уравнением:

$$y = 0.725 * x / 43, R^2 = 1$$

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

Исходя из полученных данных, 1 г иммобилизованных клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 за 24 ч осуществляет биодеструкцию 0.4 г смеси GM.

Увеличение времени деструкции без дополнительного внесения смеси GM приводит к снижению скорости биодеградаци. Убыль субстрата при культивировании в течение 96 ч описывается уравнением:

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

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

Исходя из полученных данных, 1 г клеток штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, иммобилизованных на Карбопон-В-актив, за 96 ч осуществляет разложение 0.84 г смеси модифицированных ПХБ. Однако, сопоставление эффективности обоих режимов культивирования в пересчете на убыль субстрата за 1 ч показывает, что первый вариант является более перспективным для уничтожения данного субстрата: в первом случае за 1 ч 1 г клеток разлагает 17 мг смеси GM, во втором случае – 8 мг смеси GM.

Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагает смесь гидрокси- и метокси-производных полихлорированных бифенилов как в состоянии планктонной культуры, так и в виде иммобилизованных на инертном носителе клеток.

5.4. Деструкция смесей С1 и С2, полученных при химической модификации коммерческой смеси ПХБ Совол полиэтиленгликолями

Впервые изучена возможность бактериального разложения смесей соединений, в составе которых представлены ПХБ, и их гидрокси- и полиэтиленгликолюкси-производные.

Смеси С1 и С2 были получены в результате химического взаимодействия коммерческой смеси ПХБ марки Совол с полиэтиленгликолями (Приложение 4, таблица 38, рисунок 80).

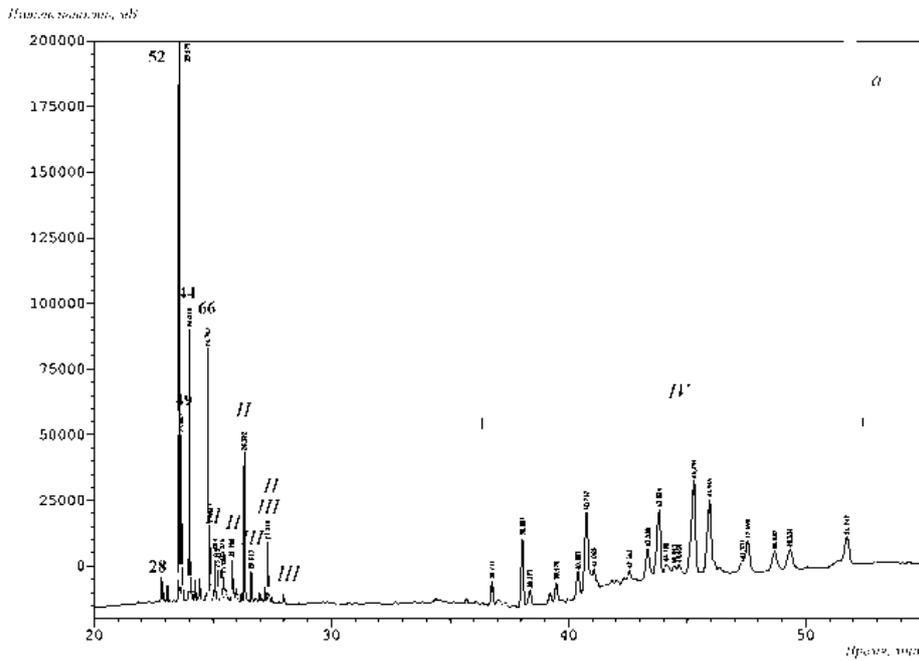
Смесь С1 содержит в своем составе непрореагировавшие конгенеры ПХБ (ПХБ 52, ПХБ 49, ПХБ 47, ПХБ 44, ПХБ 66), моногидрокси-(тетрапента)-хлорбифенилы (НО-тетраХБ, НО-пентаХБ) и монозамещенные производные ПХБ с ПЭГ-4 – монополиэтиленгликолокси-полихлорбифенилы (ПХБ-ПЭГ-4) (Приложение 4, таблица 38, рисунок 80). Смесь С2 представлена непрореагировавшими конгенерами ПХБ (ПХБ 52, ПХБ 49, ПХБ 47, ПХБ 44, ПХБ 66), НО-тетраХБ, НО-пентаХБ и монозамещенными производными ПХБ с ПЭГ-22 (ПХБ-ПЭГ-22) (Приложение 4, таблица 38, рисунок 80).

Способность разлагать данные смеси изучена у одного из наиболее активных штаммов-деструкторов ПХБ, исследуемых в настоящей работе – *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7.

Анализ методом ГХ-МС культуральной жидкости показал, что штамм КТ112-7 осуществляет деструкцию всех компонентов смеси С1 (рисунок 50). Через 24 ч инкубации отмечалась 100%-ая деструкция ПХБ-ПЭГ-4, НО-пентаХБ, но зафиксировано присутствие следовых количеств ПХБ 49, ПХБ 52 и НО-тетраХБ. К концу пятых суток культивирования в смеси С1 моногидрокси-полихлорбифенилы не регистрировались, а деструкция конгенов ПХБ составляла 90% (остаточное количество ПХБ в культуральной среде составляло 8.8 ± 0.4 мкг/мл) (рисунок 50б).

Отметим, что ПХБ 49 и ПХБ 52 являются наиболее устойчивыми к микробной атаке, так как содержат заместители в *орто*- и *мета*-положениях. Однако динамика их убыли свидетельствует о способности штамма КТ112-7 осуществлять трансформацию данных конгенов. По уровню деструкции ПХБ 49 и ПХБ 52 штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 не уступает штаммам рода *Rhodococcus*, исследованным нами ранее, и превосходит известные штаммы-деструкторы (Егорова и др., 2011; Seto *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1999; Bedard, 2003; Pieper, 2005).

а)



б)

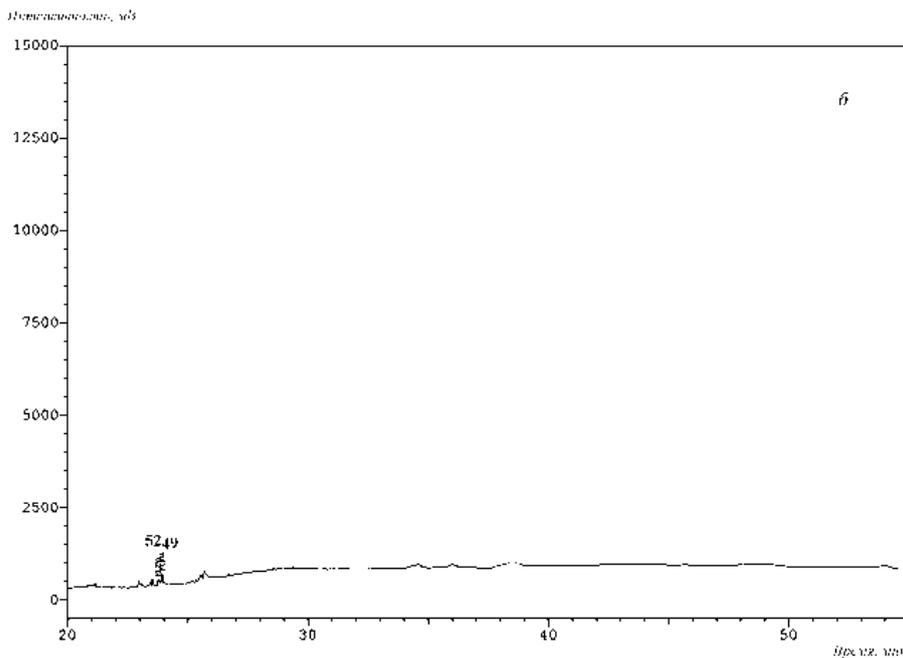


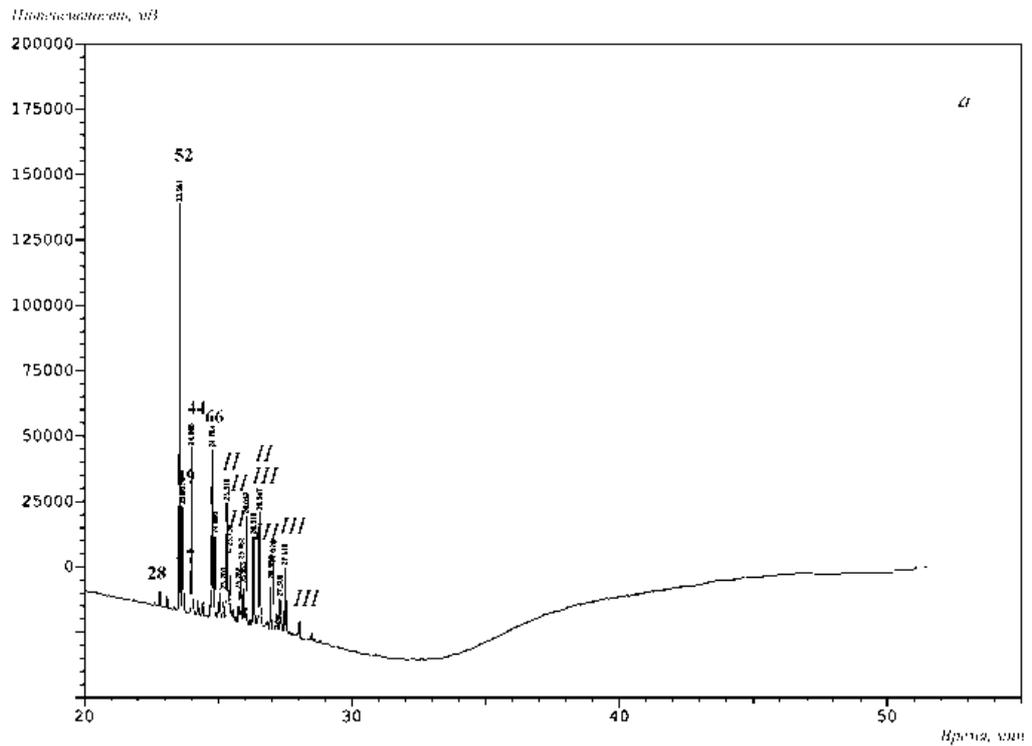
Рисунок 50 – Хроматограмма смеси С1 (300 мг/л) до (а) и через 5 суток (б) бактериальной деструкции: II – моногидрокси-тетрахлорбифенилы, III – моногидрокси-пентахлорбифенилы, IV – монозамещенные производные с ПЭГ-4 из пента- и гексахлорбифенилов. Арабскими цифрами указаны номера конгенов ПХБ, не вступивших в реакцию

Количественное содержание ПХБ и НО-тетраХБ, НО-пентаХБ в смеси С1 (Приложение 4, таблица 38) позволяло предположить, что при бактериальной деструкции в среде будут накапливаться промежуточные соединения, характерные для классического пути аэробной бактериальной трансформации данных групп веществ (Егорова и др., 2010, 2011; Francova *et al.*, 2004; Pieper, 2005). Однако в результате спектрофотометрического анализа культуральной жидкости наличие ГОФДК и ХБК установлено не было, но отмечено накопление ионов хлора (0.39 ± 0.02 мМ на 3 сутки эксперимента, 0.83 ± 0.03 мМ – на 5 сутки). Согласно результатам элементного анализа, смесь С1 содержит 13.58% ионов хлора. С учетом количества смеси С1, использованным для деструкции, максимальное количество ионов хлора в среде при полном разложении и дехлорировании смеси может составить 1.15 мМ. Несмотря на то, что к концу эксперимента количество ионов хлора в среде ниже, чем максимально возможное, полученный результат позволяет предположить, что при разложении компонентов смеси С1 не происходит накопления хлорированных продуктов. Разница между выделенным количеством ионов хлора и содержащимся в смеси С1 обусловлена тем, что часть ионов хлора еще связана в молекулах ПХБ 49 и ПХБ 52.

Таким образом, в результате использования деградационного потенциала штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 удалось практически полностью утилизировать смесь, полученную в результате взаимодействия технической смеси ПХБ Совол с ПЭГ-4 в присутствии гидроксида калия.

Штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагал смесь С2 (рисунок 51). Через 1 сутки культивирования профиль хроматограммы изменялся, а через 5 суток фиксируются следовые количества гидрокси-(тетра/пента)-хлорбифенилов и непрореагировавшие на химической стадии конгенеры ПХБ (рисунок 51). Следует отметить, что, как и при деструкции смеси С1, в культуральной среде не были зафиксированы промежуточные продукты бактериального разложения монопроизводных ПХБ-ПЭГ-22, конгенов ПХБ и гидроксильированных тетра- и пентахлорбифенилов.

а)



б)

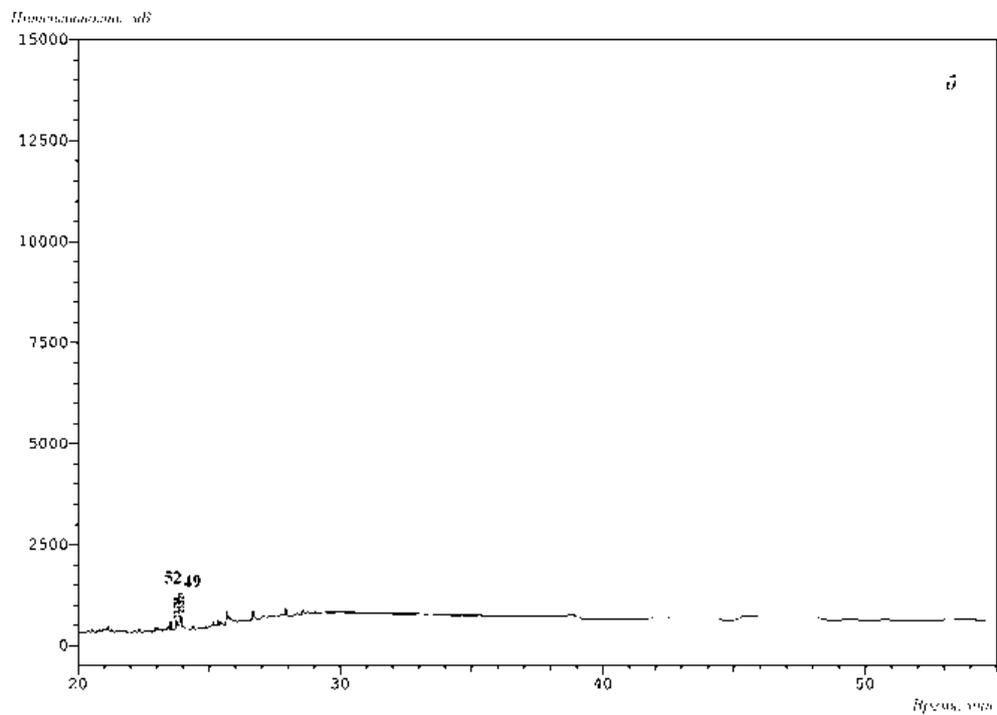


Рисунок 51 – Хроматограмма смеси С2 (600 мг/л) до (а) и через 5 суток (б) бактериальной деструкции: II – моногидрокси-тетрахлорбифенилы, III – моногидрокси-пентахлорбифенилы. Арабскими цифрами указаны конгенеры ПХБ, не вступившие в химическую реакцию.

Однако было выявлено накопление ионов хлора (1.38 ± 0.02 мМ на 3 сутки культивирования, 1.65 ± 0.02 мМ – на 5 сутки). Количество свободных ионов хлора, таким образом, приближается к максимально возможному при полном дехлорировании смеси С2 (доля ионов хлора в смеси – 10.41%, в использованном количестве смеси С2 – 1.76мМ). Так как незначительная часть ионов хлора к концу эксперимента еще находится в составе молекул ПХБ 49 и ПХБ 52, можно предположить, что разложение смеси С2 происходит до соединений, не содержащих атомы хлора.

Установлено, что уровень бактериальной деструкции остаточных ПХБ в смеси С2 выше, чем при разложении аналогичных конгенов ПХБ смеси С1. Наиболее активно разлагаются конгены ПХБ, содержащие в одном из колец молекулы заместители в *орто*- и *пара*-положениях (ПХБ 47, ПХБ 66) – 100%-ая деструкция за 5 суток, конверсия наиболее устойчивых к бактериальному разложению ПХБ 49 и ПХБ 52 к концу эксперимента составила 95%. Полученный результат обусловлен, вероятно, тем, что концентрация ПХБ в смеси С2 ниже (2/3 от количества ПХБ смеси С1) (Приложение 4, таблица 38) и, соответственно, уровень токсичности смеси для бактериальной культуры также ниже. Анализ литературных данных показал, что штамм КТ112-7 осуществляет разложение всех тетраХБ, представленных в смесях С1 и С2, эффективнее, чем известные штаммы-деструкторы ПХБ рода *Rhodococcus* (Егорова и др., 2011; Seto *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1999; Bedard, 2003; Pieper, 2005).

В литературе представлены единичные данные по аэробному бактериальному разложению индивидуальных конгенов гидрокси-ПХБ, а по разложению данных соединений в составе смесей данные отсутствуют (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016).

Таким образом, полученные нами результаты о высокой деградационной активности штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 к смесям, содержащим в своем составе ПХБ, НО-ПХБ и ПХБ-ПЭГ представляют значительный интерес

и позволяют предположить, что штамм КТ112-7 может быть использован для разложения/удаления из почвы соединений данных групп.

5.5. Деструкция модифицированной смеси ПХБ, полученной при взаимодействии Совола с 2-аминоэтанолом (смесь GA), штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 в различных условиях

Впервые изучена деструкция смеси, полученной в результате химического взаимодействия коммерческой смеси ПХБ марки Совол с 2-аминоэтанолом, в состав которой входят тетра- и пентахлорбифенилы, гидроксихлорбифенилы, аминоксокси-хлорбифенилы и гидрокси-аминоксокси-хлорбифенилы (смесь GA) (Приложение 4, рисунок 82, таблица 40). Смесь GA была получена в рамках поисковых исследований, направленных на создание производных ПХБ, более доступных для разложения бактериальными штаммами. Синтезированная смесь GA представляет собой аморфную вязкую массу коричневого цвета, нерастворимую в воде, несмотря на обилие продуктов с гидрофильными НО-группами. Для растворения смеси GA и последующего изучения ее деструкции штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 было применено два подхода: 1) растворение смеси GA в ацетоне, с последующим внесением ацетонового раствора в минеральную среду с культурой штамма КТ112-7, 2) подобраны ПАВы для образования устойчивой эмульсии смеси GA в воде.

5.5.1. Бактериальное разложение смеси GA в стандартных условиях (растворение в ацетоне)

В результате применения первого подхода (растворение смеси GA в ацетоне с последующим переносом в минеральную среду) установлено, что штамм КТ112-7 осуществляет 100 %-ную деструкцию 480 мг/л смеси GA за 14 сут. Методом ГХ-ПВД установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 в первую очередь разрушает производные с аминоксоксигруппой,

так как характерные для них пики не регистрируются на хроматограмме уже на 4 сут эксперимента. В последующие сутки происходит разложение тетра- и пентаХБ, и НО-ПХБ (рисунок 52).

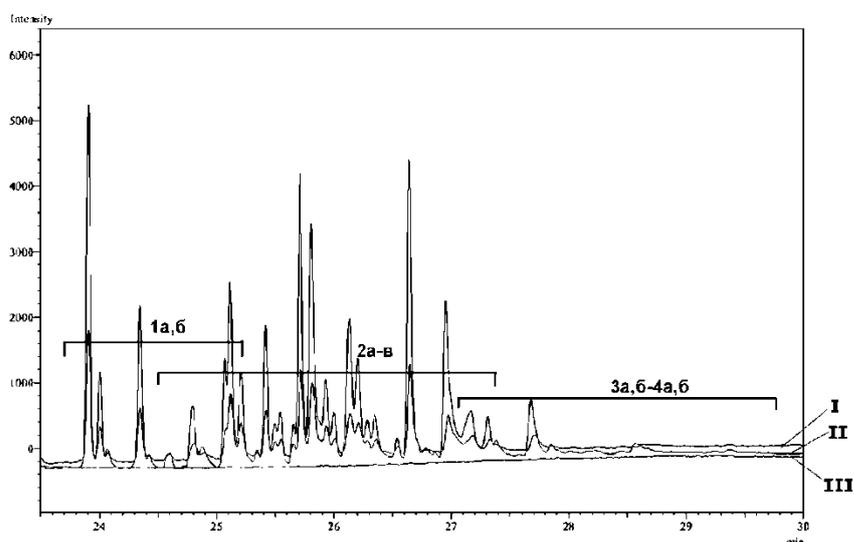


Рисунок 52 – Хроматограмма (ГХ-ПИД) анализа экстрактов соединений смеси GA до бактериальной деструкции (I), и через 7 (II) и 14 сут (III) разложения штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7

Динамика убыли используемой смеси GA имела вид вогнутой кривой с величиной достоверности аппроксимации 0.99, а скорость деструкции составляла $0.033 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ (рисунок 53).

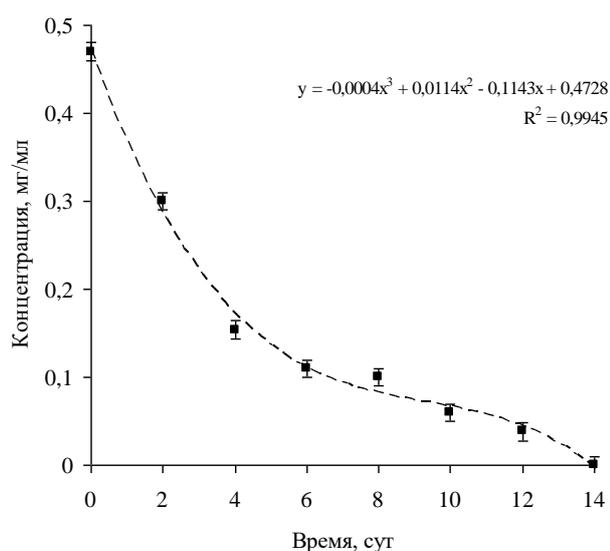


Рисунок 53 – Динамика разложения смеси GA штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7

В большинстве случаев, динамика убыли труднодоступных субстратов при бактериальной деструкции описывается экспоненциальной кривой, а в среде обнаруживаются остаточные количества разлагаемых соединений (Zhang *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2010). Примеры микробиологической деструкции соединений, подобных смеси ГА, в литературе не найдены.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофотометрии установлено, что в продуктах бактериальной деструкции смеси ГА присутствуют хлор- и гидроксизамещенные бензойные кислоты, а также катехол. Известно, что гидроксibenзойные кислоты и катехол являются промежуточными соединениями при микробном разложении хлорбензойных кислот (Loffler *et al.*, 2003).

Полученные результаты позволяют предположить, что при разложении смеси гидрокси-, метокси- и аминоэтокси-ПХБ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 соединения, токсичные для окружающей среды, не накапливаются.

5.5.2. Бактериальное разложение смеси ГА с применением ПАВ

В литературе отсутствуют сведения о применении ПАВ для эмульгирования (суспендирования) производных ПХБ в воде, а данные, касающиеся перевода самих ПХБ в водные среды, достаточно обширны. Особое внимание уделяется использованию коммерчески доступных ПАВ. При этом приоритетное место среди ионогенных и неионогенных ПАВ не установлено, а используемые количества ПАВ (по массе) всегда более высокие (на 1-2 порядка), чем количества ПХБ, подвергшихся последующей биodeградации.

В исследовании (Billingsley *et al.*, 2002) показано, что ионогенные ПАВ (алкил(алкилен)сульфонаты натрия: Hostapur SAS 60, Nansa LSS 38/AS) по сравнению с неионогенными ((алкилфенокси)полиэтоксиэтанолаы: Igepal CO-630, Igepal CO-080; сложные эфиры карбоновых кислот: Sorbax PMO-20 и др.), хуже вымывают конгенеры ПХБ из почвы, но способствуют их большей биodeградации. В работе (Rojas-Avelizara *et al.*, 2000) установлено,

что из трех неионогенных ПАВ наибольшим эффектом для целей биодеструкции ПХБ обладает Tween 80 (моноолеат(полиэтоксиэтанол)сорбитола) по сравнению с Tergitol NP и Triton X-100 (аналоги Igeral).

Для создания стабильной эмульсии производных ПХБ, входящих в состав смеси GA, в воде использованы коммерческие ПАВ: сульфолон и Berol LFG 61 (соотношение 1:2.5 по массе). При этом смесь ПАВ по массе превосходит смесь GA в 8.2 раза, а полученная стабильная эмульсия представляет собой слегка мутную жидкость.

В результате разложения полученной эмульсии штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 концентрация смеси GA в культуральной среде понизилась на 85% за 14 сут (рисунок 54).

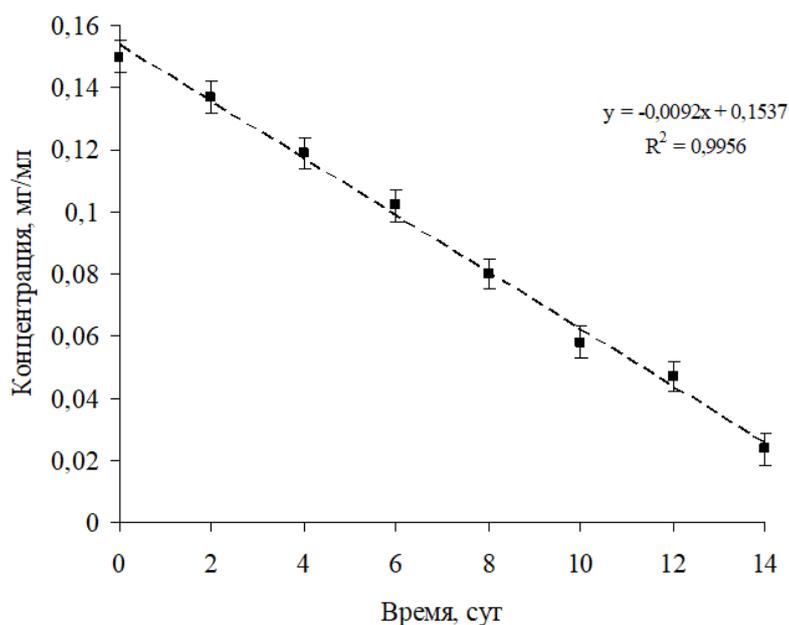


Рисунок 53 – Динамика разложения смеси GA в случае применения ПАВ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7

Установлено, что происходит разложение не только смеси модифицированных ПХБ, но также и присутствующих ПАВ. Динамика убыли смешанного ПАВ описывается экспоненциальной кривой (величина достоверности аппроксимации 0.94), тогда как динамика убыли смеси GA носит линейный характер (величина достоверности аппроксимации 0.99).

Вероятно, изменение тенденции убыли исследуемых соединений связано с появлением дополнительного источника углерода для бактериальных клеток в виде представленных в эмульсии ПАВ. При этом скорость деструкции ПАВ штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 составляла $0.09 \text{ мг}\cdot\text{мл}\cdot\text{сут}^{-1}$, что на порядок выше скорости деструкции смеси ГА в составе эмульсии ($0.009 \text{ мг}\cdot\text{мл}\cdot\text{сут}^{-1}$). Полученный результат свидетельствует о том, что использованная в качестве ПАВ смесь сульфонола и Verol LFG 61 для штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 является более доступным субстратом, чем смесь гидрокси-, аминоэтокси- и гидрокси-аминоэтокси-ПХБ.

Известно, что присутствие в среде ПАВ марки Triton X-100 оказывает негативное воздействие как на деструктивную активность к ПХБ штаммов *B. xenovorans* LB400, *R. eutropha* H850 и *Rhodococcus globerulus* MB1, так и на скорость их роста (Viney *et al.*, 1990). В нашем случае, торможение процессов биодеструкции модифицированных ПХБ обусловлено, вероятно, низкой активацией ферментативных систем, ответственных за разложение ПХБ и их производных, в связи с мощной активацией ферментативного потенциала штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 по отношению к смеси ПАВ.

Таким образом, применение двух подходов показало, что применение ПАВ возможно в процессах бактериальной трансформации модифицированных ПХБ, однако наиболее высокие показатели деструкции отмечены без использования ПАВ.

5.5.3. Биодеструкция смеси ГА в условиях засоления

Установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет трансформацию смеси ГА в присутствии в среде 60 г/л NaCl (рисунок 55). Деструкция смеси за 6 суток составила 73.8% (рисунок 55), что на 5% ниже, чем аналогичный показатель в условиях отсутствия засоления среды. Рядом работ показано, что повышение уровня засоленности среды негативно сказывается на деградтивной активности аэробных штаммов (Плотникова и

др., 2006; Егорова и др., 2018; Margesin, 2001). Таким образом, полученный результат согласуется с известной закономерностью.

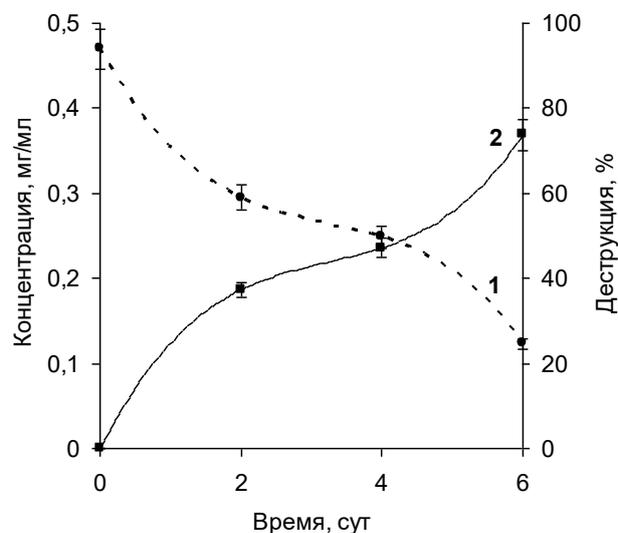


Рисунок 55 – Динамика разложения смеси ГА штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7 в присутствии 60 г/л NaCl: 1 – изменение концентрации смеси в культуральной среде, 2 – уровень деструкции

Динамика убыли смеси GA под действием культуры штамма KT112-7 имеет вид вогнутой кривой и описывается степенным уравнением

$$y = -0.0043x^3 + 0.042x^2 - 0.1542x + 0.47,$$

с величиной достоверности аппроксимации $R^2=1.0$

При отсутствии солевого стресса, характер кривой, описывающей убыль данной смеси штаммом KT112-7, имеет аналогичный вид и описывается также уравнением третьей степени (см. раздел 5.5.1.). Анализ кинетических параметров деструкции смеси GA показал, что при культивировании в присутствии 6% хлорида натрия скорость деструкции составила $0.056 \text{ мг}\cdot\text{л}\cdot\text{сут}^{-1}$, тогда как при разложении в изотонических условиях данный показатель в пересчете за первые 6 суток культивирования составлял $0.067 \text{ мг}\cdot\text{л}\cdot\text{сут}^{-1}$. По-видимому, гипертоническая среда оказывает влияние на активность ферментов деструкции.

Методами ГХ-ПИД и ГХ-МС установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 разлагает все соединения, представленные в смеси ГА, а именно тетра- и пентахлорбифенилы, гидроксиполихлор-бифенилы, аминоэтоксиполихлорбифенилы и гидроксиаминоэтоксиполихлорбифенилы. Ранее было показано, что при разложении данной смеси в изотонических условиях штамм КТ112-7 в первую очередь трансформирует производные ПХБ с аминоэтоксигруппой (см. раздел 5.5.1.). Однако при культивировании в гипертонических условиях подобной закономерности не выявлено.

Основную долю смеси ГА составляют гидроксильированные полихлорированные бифенилы (Приложение 4, таблица 40). Анализ профиля хроматограмм показывает, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 проявляет разную активность к гидроксильированным три-, тетра- и пентахлорбифенилам. При этом на доступность субстрата влияет, по-видимому, не только количество атомов хлора в молекуле гидрокси-ПХБ, но и их расположение. Известно, что штаммы *B. xenovorans* LB400 и *Comamonas testosteroni* В-356 предпочитают окислять гидроксихлорбифенилы, содержащие заместителей в одном кольце молекулы (Francova *et al.*, 2004; Mackova *et al.*, 2007). Штамм *B. xenovorans* LB400 эффективно разлагает моно-хлорированные гидроксифенилы, проявляет меньшую активность в отношении дихлорированных моногидроксифенилов, и не трансформирует трихлорированные моногидроксифенилы (Tehrani *et al.*, 2012, 2014). Аналогичная закономерность отмечена для штамма *Sphingomonas* sp. N-9, однако данный штамм проявлял высокую ферментативную активность к (моно-тетра)хлорированным моногидроксифенилам, и в меньшей степени трансформировал пента- и гекса-хлорированные моногидроксифенилы (Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Расположение гидрокси-группы также влияет на эффективность бактериальной трансформации гидрокси-ПХБ. В работе Bhalla с коллегами (2016) показано, что наиболее токсичными являются ди- и три-

хлорированные гидроксифенилы, содержащие гидрокси-группу во втором или четвертом положении на кольце молекулы бифенила.

Установлено, что штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет разложение компонентов смеси ГА с образованием классических метаболитов бактериальной трансформации ПХБ как в условиях засоления, так и в изотонической среде (рисунок 56).

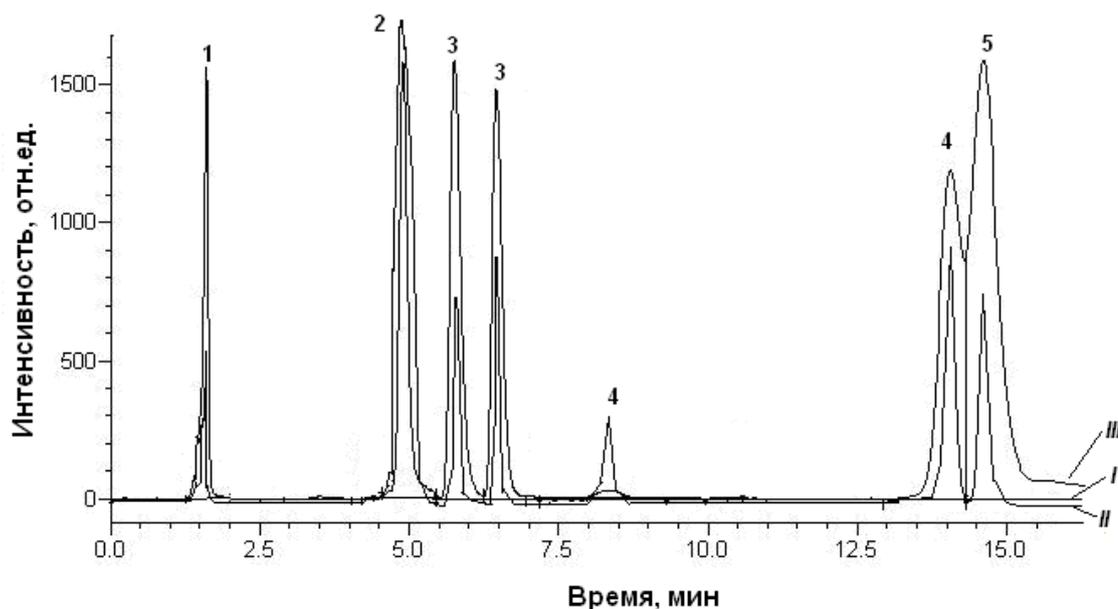


Рисунок 56 – Хроматограмма (условия ВЭЖХ) смеси промежуточных продуктов, образовавшихся в результате бактериальной деструкции смеси ГА штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления и в изотонической среде: 0 сут (I), 2 сут (II), 6 сут (III): 1 – катехол, 2 – гидроксibenзойная кислота, 3 – моно-хлорбензойные кислоты, 4 – ди-хлорбензойные кислоты, 5 – три-хлорбензойные кислоты

При этом, в присутствии в среде 60 г/л хлорида натрия хлор- и гидроксibenзойные кислоты накапливаются в большем количестве, чем в изотонических условиях. Однако, наличие гидроксibenзойных кислот, являющихся предшественниками соединений основного обмена клетки, позволяет предположить, что при разложении смеси ГА, содержащей гидрокси- и аминоэтокси-полихлорированные бифенилы, штаммом

R. wratislaviensis КТ112-7 не происходит накопления опасных для окружающей среды соединений даже в условиях засоления.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективной деструкции смеси ГА, содержащей тетра- и пента-ХБ, НО-ПХБ, аминоэтокси-ПХБ и гидроксиаминоэтокси-ПХБ, штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 в условиях засоления, и позволяют рекомендовать данный штамм для использования в разработках биотехнологий, направленных на уничтожение полихлорированных бифенилов и их производных в различных условиях среды.

5.6. Деструкция смесей гидрокси-полихлорбифенилов штаммами

***R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25**

5.6.1. Особенности разложения смесей гидрокси-ПХБ, полученных на основе ПХБ 29 и ПХБ 30

Для более подробного изучения биодegradативного потенциала штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 по отношению к гидроксилированным хлорбифенилам, были получены смеси с различным количественным и качественным содержанием НО-ПХБ.

В результате химической модификации из ПХБ 29 (2,4,5-трихлорбифенил) получена смесь М1, представленная 2-гидрокси-4,5-дихлорбифенилом, 4-гидрокси-2,5-дихлорбифенилом и 3-гидрокси-4,6-дихлорбифенилом, а из ПХБ 30 (2,4,6-трихлорбифенил) – смесь М2, содержащая 2-гидрокси-4,6-дихлорбифенил и 4-гидрокси-2,6-дихлорбифенил. Таким образом, у всех конгенов смесей М1 и М2 одно из ароматических колец молекулы бифенила не содержит заместителей.

При исследовании биодеструкции смесей М1 и М2 установлено, что штаммы КТ-112-7 и P25 осуществляют 100%-ное разложение 100 мг/л смеси М1 за 10 сут, а М2 – за 14 сут (рисунок 57).

Известно, что ПХБ в процессе аэробной бактериальной трансформации подвергаются окислительной дегградации под действием ферментов класса

оксигеназ с образованием катехол-подобных соединений («верхний» путь) (рисунок 3) (Furukawa, Fujihara, 2008). Очевидно, что для конгенов НО-ПХБ входящих в состав смесей М1 и М2, наиболее удобным структурным фрагментом для атаки диоксигеназы является незамещенный ароматический цикл (рисунок 23). В результате окисления компонентов смесей М1 и М2 по незамещенному кольцу, с дальнейшей трансформацией по «верхнему» пути образуются гидроксированные хлорбензойные кислоты.

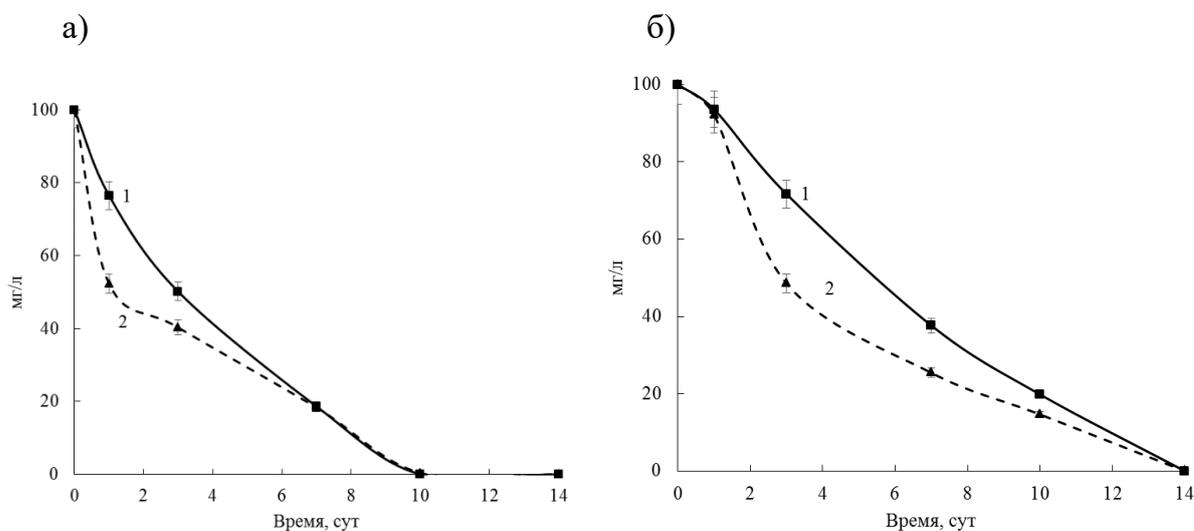


Рисунок 57 – Графики зависимости концентрации смесей М1 (а) и М2 (б) от времени биодеструкции под действием штаммов КТ112-7 (1) и Р25 (2)

При ВЭЖХ-анализе установлено, что основными метаболитами смесей М1 и М2 под действием штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25, являются гидрокси-дихлорбензойные кислоты (НО-диХБК):

- смесь М1 – 2-НО-4,5-диС1-БК, 4-НО-2,5-диС1-БК, 3-НО-4,6-диС1-БК;
- смесь М2 – 2-НО-4,6-диС1-БК, 4-НО-2,6-диС1-БК.

Анализ динамики изменения концентрации продуктов разложения смесей М1 и М2 свидетельствует, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25 способны осуществлять деструкцию моногидроксидихлорбензойных кислот (рисунок 58). Ранее показано, что в геноме штамма

КТ112-7 присутствуют гены, кодирующие ферменты деструкции гидроксилированных и хлорированных бензойных кислот (см. главу 4.4, таблица 12). Анализ генетического и ферментного профиля штамма P25, а также ростовых характеристик при культивировании на гидрокси- и хлорбензойных кислотах показал, что штамм характеризуется уникальным сочетанием генов/ферментов, обуславливающим разложение данных веществ до соединений основного обмена клетки (см. раздел 4.4.1).

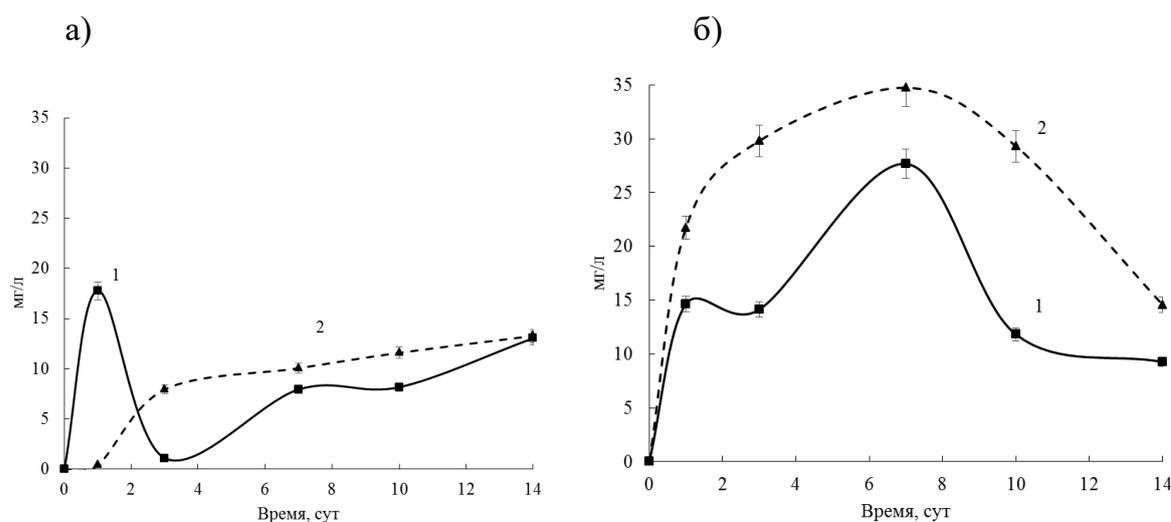


Рисунок 58 – Концентрация гидрокси-дихлорбензойных кислот при биодеструкции смеси M1 (а) и смеси M2 (б) штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 (1) и *R. ruber* P25 (2)

Таким образом, штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 эффективно разлагают смеси, содержащие в своем составе 2 или 3 конгенера моногидрокси-дихлорбифенилов. При этом биоконверсия сопровождается утилизацией образующихся метаболитов. Следует отметить, что эффективность деструкции смесей M1 и M2 выше, чем ПХБ 29 и ПХБ 30, на основе которых получены смеси (таблица 4). Можно предположить, что замена одного атома хлора на гидрокси-группу приводит к повышению биодоступности данных соединений.

5.6.2. Разложение смеси НО-ПХБ, полученной на основе коммерческой смеси ПХБ марки Трихлорбифенил

Полученные результаты по разложению гидроксированных хлорбифенилов позволили предположить, что гидроксирование конгенов, входящих в коммерческие смеси ПХБ, будет способствовать повышению эффективности уничтожения данных смесей. На основе коммерческой смеси ПХБ марки Трихлорбифенил (ТХБ) получена смесь гидроксированных ПХБ (смесь М3), состоящая из диХБ (12.8%), триХБ (7.7%), НО-диХБ (48.6%) и НО-триХБ (30.9%) (Приложение 4, рисунок 83, таблица 41).

Изучена биодеструкция смеси М3 штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25 (рисунок 59).

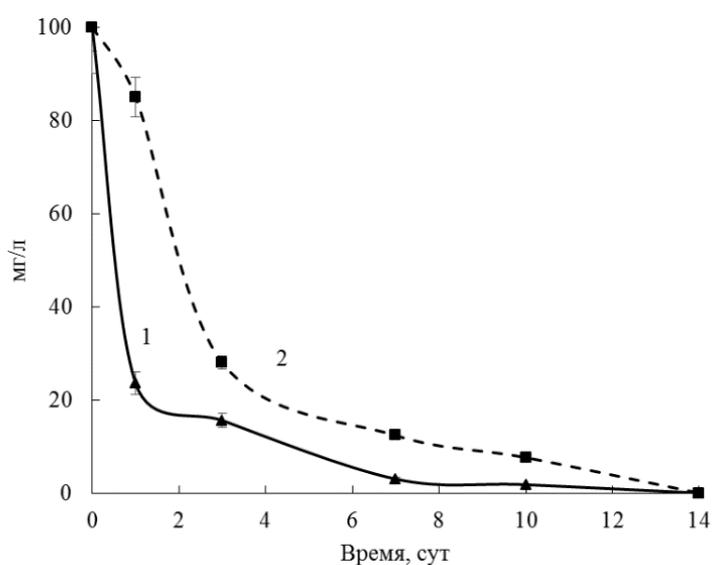


Рисунок 59 – Динамика изменения концентрации смеси М3 под действием бактериальных штаммов КТ112-7 (1) и Р25 (2)

Штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществлял 100%-ную деструкцию смеси М3 за 14 сут. При этом наиболее активно процесс разложения компонентов смеси М3 штаммом КТ112-7 протекал в первые сутки эксперимента. Напротив, в аналогичных условиях штамм Р25 проявлял более

низкую деградтивную активность, оставляя через 14 сут примерно 2% смеси МЗ. Наиболее активно процесс разложения смеси МЗ у обоих штаммов протекал в первые трое суток инкубации (рисунок 59). Используемые методы анализа не позволяют установить особенности трансформации отдельных соединений, входящих в состав смеси МЗ, из-за явления соэлюирования компонентов данной смеси.

При анализе методом ВЭЖХ установлено, что в качестве основных продуктов разложения смеси МЗ в среде аккумулируются (ди-три)хлор- и гидроксид(ди-три)хлорбензойные кислоты. На рисунке 60 показано изменение образования (ди-три)хлор- и гидроксид(ди-три)хлорбензойных кислот для каждого штамма-деструктора. При этом выявлено, что во всех случаях доминирует образование полихлорбензойных кислот.

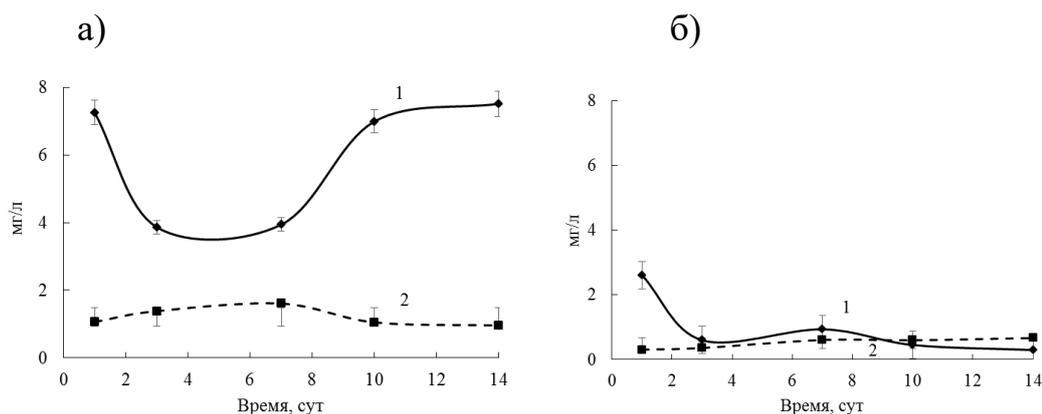


Рисунок 60 – Изменение концентрации (ди-три)хлор- (1) и гидроксид(ди-три)хлорбензойных (2) кислот в процессе деструкции смеси МЗ штаммами КТ112-7 (а) и Р25 (б)

Из полученных результатов можно предположить, что штаммы КТ112-7 и Р25 разлагают в смеси МЗ непрореагировавшие ПХБ более активно, чем НО-ПХБ. С этим связано значительное образование (ди-три)хлорбензойных кислот. Так как доля НО-ПХБ в смеси МЗ выше, чем доля непрореагировавших ПХБ, то вклад гидроксид(ди-три)хлорбензойных кислот как метаболитов также должен быть значительным. Однако при анализе суммарное содержание обнаруженных гидроксид(ди-

три)хлорбензойных кислот было ниже, чем суммарное содержание (ди-три)хлорбензойных кислот. Данный факт, а также результаты, полученные при деструкции смесей М1 и М2 и изучении молекулярно-генетических особенностей данных штаммов (см. главу 4), позволяет предположить, что штаммы КТ112-7 и Р25 способны осуществлять разложение гидроксильированных хлорбензойных кислот.

В процессе исследования биodeградации установлено, что штаммы КТ112-7 и Р25 использовали смесь М3 в качестве источника углерода (рисунок 61). При этом процесс биоразложения смеси М3 сопровождался выделением в среду ионов хлора: в случае штамма КТ112-7 до 6.8% от максимально возможного, а в случае штамма Р25 до 22.1% от максимально возможного.

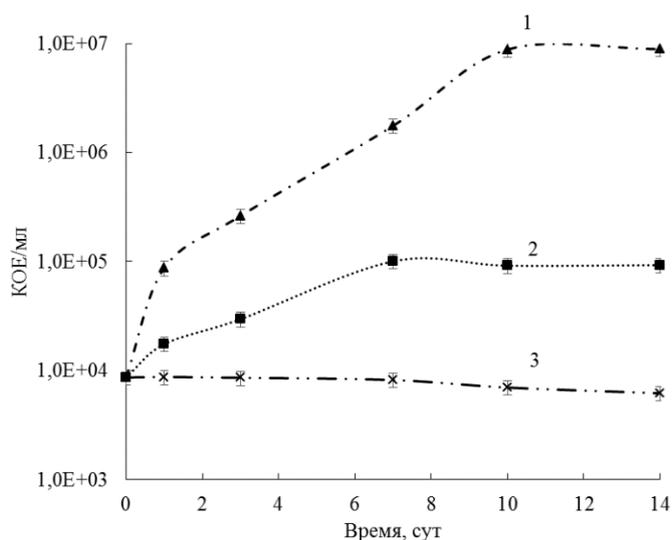


Рисунок 61 – Графики роста штаммов КТ112-7 (1) и Р25 (2) на смеси М3. График 3 – контроль без внесения смеси М3

Учитывая полученные в ходе данного исследования результаты, а также известные ранее (Плотникова и др., 2012; Tehrani *et al.*, 2012; Mizukami-Murata *et al.*, 2016), можно сделать вывод, что бифенил 2,3-диоксигеназа данных штаммов окисляет наименее замещенное кольцо как в представленных в смеси М3 гидроксильированных ПХБ, так и в присутствующих непрореагировавших конгенерах ПХБ (рисунок 3).

При исследовании метаболитов смеси МЗ аккумуляция в среде ГОФДК не обнаружена. При изучении активности штаммов КТ112-7 и Р25 к индивидуальным конгенерам ПХБ было зафиксировано накопление в среде ГОФДК в случае деструкции ди- и трихлорбифенилов (таблицы 4–6). Однако при разложении смесей М1 и М2 (содержащих 3 и 2 конгенера гидроксидихлорбифенилов соответственно), ГОФДК не обнаруживалась. Основную долю в составе смеси МЗ составляют гидроксильные (ди-три)хлорбифенилы – 79.5% (Приложение 4, таблица 41). По-видимому, преобладание конгенеров ПХБ, содержащих в составе молекулы одну гидроксильную группу, способствует скоординированному функционированию ферментов всего «верхнего» пути, что позволяет штаммам КТ112-7 и Р25 эффективно разлагать смесь ПХБ и НО-ПХБ без накопления промежуточных продуктов.

5.6.3. Разложение смесей НО-ПХБ, полученных на основе коммерческой смеси ПХБ марки Совол

В результате химической модификации коммерческой смеси ПХБ марки Совол получены смеси G1, G2, G3, содержащие в своем составе гидроксильные полихлорбифенилы (95.8%, 83.2% и 87.2% соответственно), и непрореагировавшие (три-гекса)-хлорированные бифенилы (Приложение 4, рисунок 84, таблица 42).

Способность штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25 разлагать смеси G1, G2 и G3 изучали при культивировании штаммов в минеральной среде К1 (см. раздел 2.7) с соответствующей смесью G (100 мг/л) без внесения дополнительных источников углерода (рисунок 62).

Установлено, что за 14 суток культивирования штамм КТ112-7 разлагал смесь G1 на 99.8%, смесь G2 – на 100%, смесь G3 – на 99.8%. Штамм Р25 проявлял большую активность к смеси G3 (100% деструкция за 14 сут), но менее активно разлагал смеси G1 и G2 (97.4% и 98.1% соответственно). Следует отметить, что для смеси G1 с максимальным

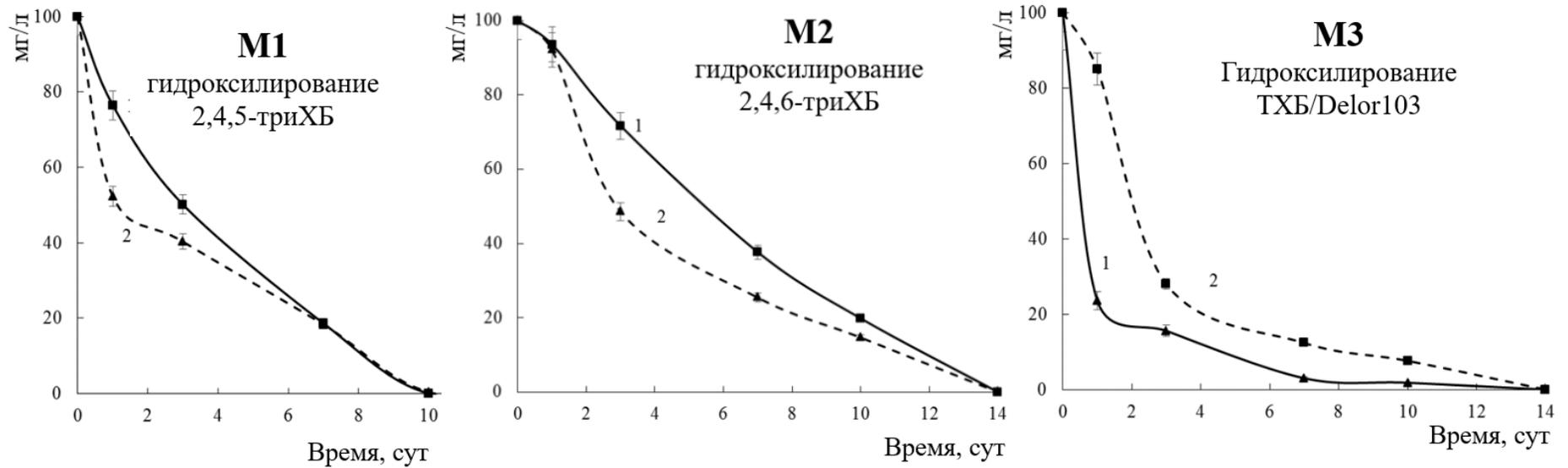


Рисунок 62 – Изменение концентрации смесей G при культивировании на них штаммов КТ112-7 и P25:
 1 – концентрация смеси G под действием штамма P25, 2 – концентрация смеси G под действием штамма КТ112-7,
 3 – рост штамма P25, 4 – рост штамма КТ112-7

содержанием НО-ПХБ за изученный отрезок времени не отмечено полное разложение данными штаммами (рисунок 61).

Установлено, что штаммы КТ112-7 и Р25 использовали смеси G в качестве ростового субстрата (рисунок 61). Коэффициент корреляции Пирсона увеличения бактериальной биомассы и убыли концентрации смесей G1, G2 и G3 составил 0.85–0.94, что свидетельствует о высокой степени корреляционной связи данных процессов. Учитывая, что единственным источником углерода в среде являлась соответствующая смесь G, можно утверждать, что штаммы используют соединения, представленные в смесях, в качестве ростового субстрата.

Скорость роста штаммов была невысокая (таблица 24), что обусловлено труднодоступностью субстрата. Способность расти на смесях НО-ПХБ, как единственном источнике углерода в среде, для аэробных бактериальных штаммов описана впервые. Ранее сообщалось, что штаммы способны эффективно разлагать НО-ПХБ и расти только в присутствии в среде дополнительного источника углерода. Так, при внесении в среду 0.05% дрожжевого экстракта и одного из НО-ПХБ (4-гидрокси-3-ХБ, 4-гидрокси-3,5-диХБ, 4-гидрокси-2',3,4',6'-тетраХБ) зафиксировано увеличение количества клеток штамма *Sphingomonas* sp. N-9 (Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Штамм *B. xenovorans* LB400 эффективно разлагал отдельные гидрокси-ХБ в присутствии в среде незамещенного бифенила (770 мг/л) или сукцината (1180 мг/л) (Tehrani *et al.*, 2012). В настоящем исследовании установлено, что штаммам КТ112-7 и Р25 не требуется ко-субстрат для утилизации смесей НО-ПХБ.

Таблица 24 – Характеристики деструкции смесей G штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25

Штамм	Удельная скорость роста (μ), сут ⁻¹			Скорость деструкции (V_i), мг л сут ⁻¹		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
КТ112-7	0.002	0.006	0.058	0.106	0.126	0.136
Р25	0.027	0.037	0.039	0.161	0.165	0.159

Анализ кривых изменения концентрации смесей G под действием бактериальных штаммов показал, что основная масса смесей была трансформирована в первые 7 суток эксперимента (рисунок 62), что позволило рассчитать для данного отрезка времени скорость деструкции (V_t) субстрата (таблица 24). Статистический анализ показал, что V_t находится в высокой степени корреляционной связи с содержанием НО-ПХБ в составе смеси для всех штаммов (коэффициент корреляции 0.86–0.99). Для известных штаммов-деструкторов ПХБ не описана способность осуществлять деструкцию смесей гидроксированных ПХБ. Однако при исследовании трансформации индивидуальных НО-ПХБ установлена закономерность: наличие одной гидрокси-группы в молекуле ПХБ эффективность биотрансформации будет зависеть от количества атомов хлора (Tehrani *et al.*, 2012, 2014, Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Штамм *Sphingomonas* sp. N-9 эффективно разлагал моногидрокси-(моно-тетра)хлорбифенилы (23–100%), но проявлял слабую деградационную активность к моногидрокси-(пента-гекса)хлорбифенилам (0–11%). Штамм *B. xenovorans* LB400 более эффективно разлагал моногидрокси –(моно-ди)хлорбифенилы (54–100%), чем моногидрокси-(три)хлорбифенил (11–18%) (Tehrani *et al.*, 2014, Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Штамм *P. testosteroni* В-356 проявлял активность к моногидрокси-моноклорированным бифенилам (Sondossi *et al.*, 1991). В представленных в настоящей работе смесях присутствуют как моно-, так и дигидрокси-замещенные хлорбифенилы, содержащие от 3 до 6 атомов хлора в молекуле (Приложение 4, таблица 42). Полученные результаты позволяют предположить, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25 обладают более высокой деградационной активностью по отношению к НО-ПХБ, чем описанные ранее штаммы-деструкторы.

Как известно, бифенил 2,3-диоксигеназа окисляет как незамещенное, так и замещенное кольцо молекулы ПХБ (Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). В большинстве случаев диоксигенирование

субстрата происходит по 2 и 3 углеродным атомам с последующим *мета*-расщеплением между 1 и 2 углеродными атомами окисленного кольца (рисунок 3). Образующаяся при этом ГОФДК может быть зафиксирована при измерении оптической плотности среды культивирования, освобожденной от клеток. Диапазон длин волн, при которых происходит максимальное поглощение некоторыми ГОФДК, составляет 393–452 нм (таблица 1) (Frankova *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2005; Makova *et al.*, 2007). Однако, в случае эффективного функционирования всех ферментов бифенильного пути, ГОФДК не накапливается, что затрудняет ее обнаружение. В настоящем исследовании при разложении смеси G2 накопления ГОФДК не обнаружено, но зафиксировано накопление данного метаболита при разложении смеси G1 штаммом *R. ruber* P25 (ОП₄₁₈ = 0.625) и при разложении смеси G3 штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 (ОП₃₉₀₋₄₀₀ = 0.06–0.08). Так как максимальные пики поглощения были зафиксированы при нескольких длинах волн, можно предположить, что в среде накапливаются ГОФДК, образующиеся при трансформации нескольких конгенов НО-ПХБ, входящих в состав смеси. В работах (Frankova *et al.*, 2004, Makova *et al.*, 2007) указано, что при разложении моногидрокси-(моно-ди)хлорбифенилов оптическая плотность ГОФДК в среде достигала 0.386 – 1.735 о.е. при длине волны 448, 450 и 452 нм. В настоящем исследовании количество ГОФДК, аккумулированной в среде, меньше, чем у описанных штаммов. Различия в длине волны максимального поглощения свидетельствует об образовании соединений, отличных по химической структуре от продуктов *мета*-расщепления моно- и дигидрокси-хлорбифенилов, представленных в работах (Frankova *et al.*, 2004; Fortin *et al.*, 2005; Makova *et al.*, 2007).

Наши исследования показали, что при разложении смесей G, содержащих как НО-ПХБ, так и остаточные количества ПХБ, штаммами рода *Rhodococcus* в среде аккумулируются замещенные бензойные кислоты, катехол и хлоркатехолы, свободные ионы хлора (таблица 25).

Основными продуктами бактериальной деструкции ПХБ и НО-ПХБ являются ХБК (Camara *et al.*, 2004; Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Tehrani *et al.*, 2014; Agulló *et al.*, 2019) (рисунки 3, 23–28). Установлено, что штаммы КТ112-7 и P25 осуществляют разложение конгенов, представленных в смесях G, до стадии образования ХБК (таблица 25).

Таблица 25 – Метаболиты, образующиеся при разложении смесей НО-ПХБ штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25

Смесь НО-ПХБ	Время, сут	Σ СІ-БК*, mg/l	Σ НО-БК**, mg/l	Σ катехол+ хлоркате- холы***, mg/l	мг/л	СІ % от максимально возможного
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> КТ112-7						
G1	1	9.21	46.56	2.72	0.007	0.02
	3	10.49	18.53	2.17	0.22	0.59
	7	10.71	21.51	2.01	1.14	3.07
G2	1	13.61	12.91	1.13	0.03	0.07
	3	15.39	0.58	2.22	2.19	5.09
	7	15.47	1.53	0.35	17.34	40.25
G3	1	3.98	15.89	0.65	0.85	2.03
	3	3.14	25.03	0.04	6.55	15.72
	7	3.21	25.28	0.04	20.82	49.96
<i>Rhodococcus ruber</i> P25						
G1	1	10.14	4.54	0.08	1.14	3.07
	3	7.25	6.08	2.97	10.7	28.63
	7	2.04	9.04	4.08	29.43	78.73
G2	1	1.72	7.76	0.25	6.02	13.97
	3	1.17	9.89	2.99	14.65	34.02
	7	4.64	7.83	0.25	17.44	40.47
G3	1	7.16	34.65	0.24	2.19	5.27
	3	1.46	23.67	0.18	6.65	15.97
	7	4.91	12.45	0.57	11.22	26.91

* в таблице представлена сумма концентраций всех выявленных ХБК

** в таблице представлена сумма концентраций всех выявленных гидроксилированных бензойных кислот

*** в таблице представлена сумма концентраций катехола и выявленных хлорированных катехолов.

Количество аккумулированных ХБК у всех штаммов различалось и не находилось в зависимости от времени деструкции, эффективности деструкции и вида исходной смеси G. Отсутствие данных взаимосвязей, а также высказанное ранее предположение об использовании штаммами смесей G в качестве ростового субстрата, свидетельствует о возможности дальнейшей трансформации образующихся ХБК. Ранее нами было показано, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25 способны разлагать хлорбензойные кислоты (см. главу 4).

Разложение ХБК аэробными бактериальными штаммами может протекать через стадии образования гидроксилированных бензойных кислот или через образование катехола/хлоркатехола, при этом в процессе метаболизма может быть задействовано несколько ферментных систем (рисунки 7–9) (Field, 2008, Solyanikova *et al.*, 2015). В настоящем исследовании в культуральной среде зафиксировано присутствие как гидроксибензойных кислот, так и катехола/(хлор)катехолов (таблица 25). Концентрация гидроксибензойных кислот во всех случаях выше, чем концентрация зафиксированных (хлор)катехолов и катехола. Корреляционных связей между изменениями концентраций всех выявленных метаболитов не выявлено. Ранее нами показано, что в разложении бензойной кислоты и ее замещенных производных, хлоркатехолов и катехола у исследуемых штаммов участвует несколько генетических и ферментных систем (см. главу 4). Вероятно, при разложении смесей гидрокси-ПХБ, и образующихся при этом разнообразных метаболитов, активируются все имеющиеся системы, что обуславливает отсутствие строгих количественных взаимосвязей между концентрациями метаболитов в среде при биодеструкции смесей G данными штаммами.

Также в среде культивирования было зафиксировано накопление свободных ионов хлора (таблица 25). Отщепление хлора может происходить на двух этапах трансформации смесей G: либо при окислении хлорированных атомов углерода в молекуле HO-ПХБ, либо

при последующем окислении хлорбензойной кислоты и/или хлоркатехола. Разделить эти два процесса в настоящем исследовании не представлялось возможным. Увеличение концентрации ионов хлора в среде по мере увеличения периода деструкции было характерно для обоих штаммов. Наиболее высокие показатели аккумуляции хлора установлены для штамма P25 (таблица 25). Можно предположить, что аккумуляция ионов хлора в среде у штамма P25 обусловлена обоими механизмами.

Таким образом, трансформация смесей G штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25 происходит с образованием метаболитов, характерных для классического пути биодеструкции бифенила/ПХБ, и их дальнейшей утилизацией, что обеспечивает разложение исходных смесей без накопления значительного количества соединений, способных оказывать негативное воздействие на окружающую среду.

На основании данных, полученных при проведении исследований по разложению химически модифицированных ПХБ аэробными бактериальными штаммами, установлено, что химическая модификация может быть использована как первая стадия для подготовки ПХБ к эффективной бактериальной трансформации (таблица 26).

Таблица 26 – Эффективность деструкции коммерческих смесей ПХБ и смесей, полученных в результате химической модификации

Смесь ПХБ/ модифицированных ПХБ	Основные группы соединений в смеси	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	
		<i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	<i>R. ruber</i> P25
1	2	3	4
Трихлорбифенил	ПХБ	0.293	0.259
Совол	ПХБ	0.195	0.174
Смеси, полученные при модификации индивидуальных конгенов			
M1	НО-диХБ	0.461	0.328
M2	НО-диХБ	0.462	0.327

1	2	3	4
Смесь, полученная при модификации Трихлорбифенила			
M3	диХБ, триХБ, НО-диХБ, НО-триХБ	0.427	0.271
Смеси, полученные при модификации Совола			
C1	ПХБ, НО-ПХБ, ПХБ-ПЭГ	0.235	—*
C2	ПХБ, НО-ПХБ, ПХБ-ПЭГ	0.289	—
GM	НО-ПХБ, Ме-ПХБ, Ме,НО-ПХБ	0.265	—
GA	ПХБ, НО-ПХБ, АЭ-ПХБ, НО,АЭ-ПХБ	0.441	—
G1	ПХБ, НО-ПХБ, (НО) ₂ -ПХБ	0.329	0.229
G2	ПХБ, НО-ПХБ, (НО) ₂ -ПХБ	0.361	0.230
G3	ПХБ, НО-ПХБ, (НО) ₂ -ПХБ	0.379	0.215

*— активность штамма P25 в отношении данных смесей не исследовалась. Расшифровки аббревиатур приведены в списке сокращений. Процентное содержание компонентов в смесях представлено в Приложении 4.

Введение в молекулу ПХБ дополнительных групп в качестве заместителей приводило к повышению удельной скорости деструкции смесей модифицированных ПХБ, по сравнению с данным показателем для коммерческих смесей ПХБ.

Полученные результаты позволяют предложить комплексный междисциплинарный (химико-биологический) метод, направленный на уничтожение запасов ПХБ, находящихся в местах складирования. Данный метод предполагает две стадии: на первой стадии в молекулы ПХБ вводятся дополнительные группы (гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси-,

аминоэтокси-), что приводит к уменьшению степени хлорирования и повышению гидрофильности ПХБ; на второй стадии активные бактериальные штаммы, в частности *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* P25, осуществляют разложение модифицированных ПХБ до соединений основного обмена клетки. Предложенный метод позволяет осуществить полную деструкцию ПХБ, без выделения в среду токсичных веществ.

ГЛАВА 6. БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ПХБ КАК ОСНОВНЫЕ АГЕНТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

6.1. Очистка искусственно загрязненных почв в модельных системах

6.1.1. Разложение монохлорбифенилов в модельных почвенных системах

Как было показано ранее, штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 характеризуются уникальными генетическими и метаболическими свойствами по отношению к ПХБ, что послужило основой для исследования их потенциала в условиях модельных почвенных систем.

Установлено, что штамм *M. oxydans* B51 активно разлагал ПХБ 1 (2-хлорбифенил) как в опытах с модельными почвенными системами (таблица 27), так и в минеральной среде (см. главу 3, таблица 4).

Таблица 27 – Разложение ПХБ 1 штаммом *M. oxydans* B51 и ПХБ 3 штаммом *R. ruber* P25 в искусственно загрязненных почвенных системах, изменение численности внесенных штаммов

Штамм	Время, сут	Концентрация ХБ*, %		Численность бактерий, КОЕ/г почвы	
		эксперимент	контроль	эксперимент	контроль
<i>M. oxydans</i> B51	0	100	100	$(3.0 \pm 0.01) \times 10^4$	$(3.0 \pm 0.01) \times 10^4$
	1	2	99.8	$(5.0 \pm 0.04) \times 10^6$	$(3.0 \pm 0.02) \times 10^4$
	2	0	99.8	$(8.0 \pm 0.03) \times 10^7$	$(3.0 \pm 0.02) \times 10^4$
<i>R. ruber</i> P25	0	100	100	$(2.0 \pm 0.08) \times 10^8$	$(2.0 \pm 0.08) \times 10^8$
	1	8	99.9	$(5.0 \pm 0.03) \times 10^8$	$(2.0 \pm 0.08) \times 10^8$
	2	0	99.8	$(8.0 \pm 0.05) \times 10^9$	$(2.0 \pm 0.08) \times 10^8$

* Начальная концентрация 100 мг ПХБ/кг почвы

Анализ динамики изменения концентрации ПХБ 1 позволяет констатировать, что наиболее активно разложение ПХБ 1 осуществлялось в первые 24 часа инкубации штамма B51 в модельной почвенной системе (деструкция составила 98%). При этом отмечен активный рост штамма.

Коэффициент корреляции между увеличением колониеобразующих единиц штамма В51 и изменением концентрации ПХБ 1 составляет 0.98, что свидетельствует о взаимосвязанности данных процессов. По всей видимости, штамм В51 использует ПХБ 1 в качестве источника углерода. Следует отметить, что в литературе описано несколько штаммов-деструкторов, осуществляющих разложение ПХБ 1 при культивировании в минеральной среде (Arensdorf *et al.*, 1994; Fava *et al.*, 1994; Hrywna *et al.*, 1999; Kim, Picardal, 2000; Rodrigues *et al.*, 2006). Однако в условиях модельной почвенной системы существуют дополнительные источники углерода, которые могут снижать деградационную активность штаммов (Васильева, 2007, Barriault, Sylvestre, 1993). Анализ полученных результатов и литературных данных показал, что штамм *M. oxydans* В51, даже в присутствии неконтролируемых ростовых субстратов, содержащихся в почве, разлагает ПХБ 1 активнее, чем известные штаммы-деструкторы в условиях периодической культуры с одним источником углерода и энергии. Следует отметить, что эффективность деструкции ПХБ 1 штаммом В51 в почве сопоставима с данным показателем в минеральной среде (таблица 4).

При культивировании штамма *R. ruber* P25 в минеральной среде, содержащей 94.25 мг/л ПХБ 3 (4-хлорбифенил) в качестве единственного источника углерода и энергии, 100%-ная деструкция субстрата достигалась за 1 сут (см. главу 3) В опытах с модельными почвенными системами установлено, что штамм *R. ruber* P25 осуществлял полное разложение ПХБ 3 в течение двух суток (таблица 27). При этом разложение основной части субстрата (92% от исходного) происходило в течение первых суток эксперимента. Анализ динамики роста штамма свидетельствует об использовании ПХБ 3 как ростового субстрата (коэффициент корреляции – 0.94). Следует отметить, что исследуемый штамм утилизирует 4-хлорбензойную кислоту, продукт бактериальной трансформации ПХБ 3 (см. главу 4, таблица 13) Подобные свойства описаны для *Pseudomonas ceracia* P166 и *Burkholderia* sp. SK-3 (Arensdorf, Focht, 1995; Kim, Picardal,

2000). Однако сопоставление экспериментальных данных с литературными показало, что *R. ruber* P25 является перспективным штаммом-деструктором, так как разлагает ПХБ 3 эффективнее, чем *P. cepacia* P166 и *Burkholderia* sp. SK-3.

6.1.2. Биодеструкция искусственных смесей ПХБ штаммами рода *Rhodococcus* в модельных почвенных системах

Для изучения ремедиационного потенциала штаммов в модельных почвенных системах по отношению к смесям ПХБ было использовано две искусственно созданных смеси: смесь ВР (состоит из незамещенного бифенила и семи конгенов, активность штаммов к каждому из которых в отдельности была ранее изучена (см. главу 4)) и смесь А (состоит из 20 конгенов ПХБ) (Приложение 1, таблица 35, 36).

Установлено, что штамм *R. ruber* P25 осуществляет 100%-ное разложение 1 г/л смеси ВР за 110 сут (рисунок 63).

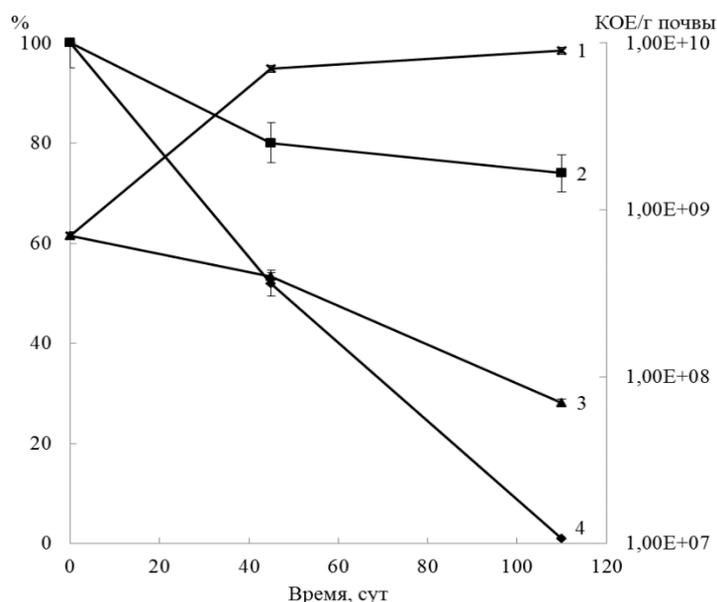


Рисунок 63 – Разложение экспериментальной смеси ВР штаммом *R. ruber* P25 в модельной почвенной системе: 1 – рост штамма *R. ruber* P25, 2 – концентрация смеси ВР в системе без внесения культуры штамма P25, 3 – изменение количества колониобразующих единиц штамма P25 в системе без внесения смеси ВР, 4 – концентрация смеси ВР в биоаугментированной почве

Процесс разложения смеси ВР носил линейный характер и сопровождался ростом бактериальной культуры. Анализ изменения концентрации каждого конгенера в смеси показал, что хлорированные производные бифенила разлагались штаммом в 1.8 раза медленнее, чем незамещенный бифенил. Следует отметить, что с увеличением степени хлорирования молекулы бифенила скорость деструкции компонентов экспериментальной смеси ПХБ снижалась с 2.16 ± 0.3 мг·кг·сут⁻¹ для монохлорбифенилов, до 0.52 ± 0.3 мг·кг·сут⁻¹ для трихлорбифенилов. Аналогичная закономерность выявлена при анализе эффективности деструкции конгенов, входящих в смесь ВР, штаммом Р25 в минеральной среде (см. главу 3).

Изучена способность штаммов *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а, обладающих деструктивной активностью к хлорированным бифенилам и их смесям (см. главы 3–5), осуществлять разложение искусственной смеси ПХБ (смесь А) в модельных почвенных системах (рисунок 64).

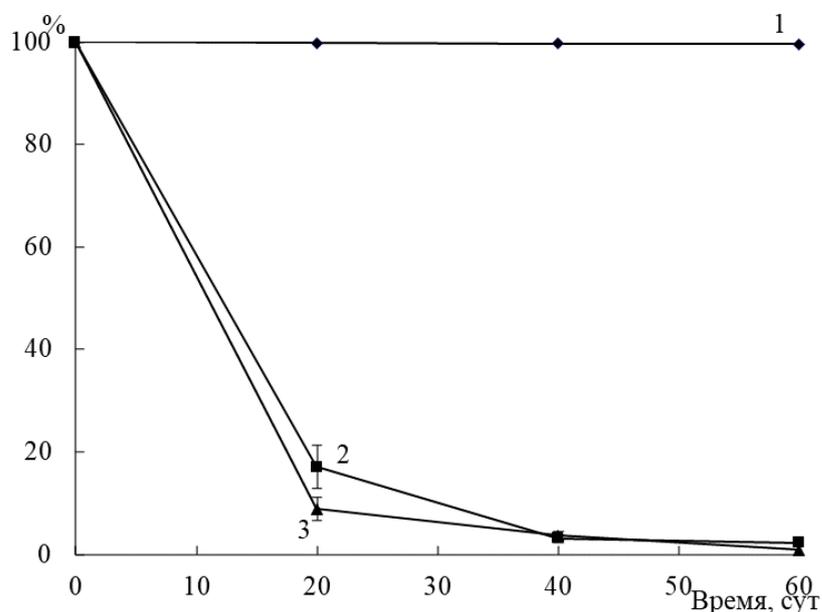


Рисунок 64 – Концентрация смеси А в модельных почвенных системах: 1 – почвенная система без внесения штаммов, 2 – стерильная почвенная система, содержащая штаммами *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а, 3 – нестерильная почвенная система, содержащая штаммами *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а

Установлено, что внесение бактериального консорциума штаммов *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а (начальная концентрация клеток 1×10^6 КОЕ/г сух. почвы) приводит к значительному, статистически достоверному по отношению к контролю, снижению уровня загрязненности почвы полихлорированными бифенилами (начальная концентрация смеси А в почве – 280 мг/кг сух. почвы) (рисунок 64), как в случае стерильной почвы, так и в случае почвы с аборигенной микрофлорой. К концу второго месяца инкубирования в почве обнаруживалось около 1.0% смеси А от начальной концентрации. В модельных системах, не содержащих штаммы *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а, концентрация ПХБ составляла 99.5% от внесенной.

Следует отметить, что снижение количества смеси А в почве происходило за счет разложения всех конгенов, присутствовавших в смеси ((три-гекса)-замещенные хлорбифенилы) (рисунок 65).

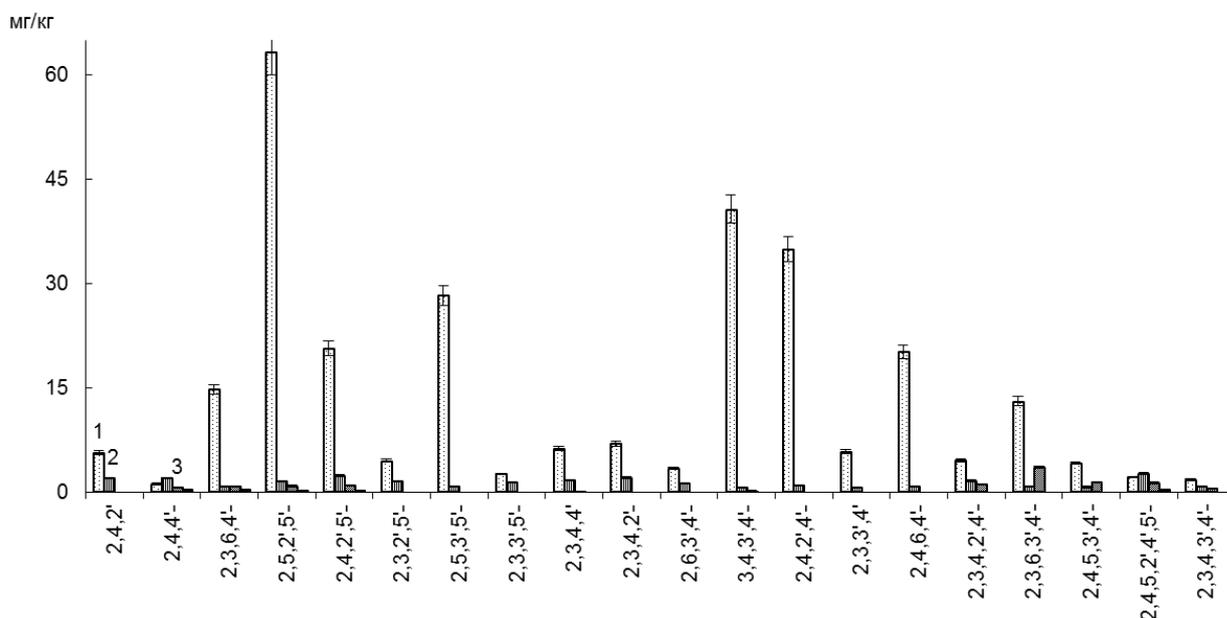


Рисунок 65 – Деструкция конгенов ПХБ, входящих в состав смеси А, в биоаугментированной почвенной системе: 1 – 0 сут, 2 – 20 сут, 3 – 40 сут

К 40 суткам в почве не детектировалось девять тетраХБ (2,3,2',5'-ХБ, 2,5,3',5'-ХБ, 2,3,3',5'-ХБ, 2,3,4,4'-ХБ, 2,3,4,2'-ХБ, 2,6,3',4'-ХБ, 2,4,2',4'-ХБ,

2,3,3',4'-ХБ, 2,4,6,4'-ХБ) (рисунок 65). Наиболее устойчивые к бактериальному разложению 2,4,5,3',4'-ХБ, 2,5,2',5'-ХБ и 2,4,5,2',4',5'-ХБ также подвергались деструкции внесенными штаммами.

Удельная скорость деструкции смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а в модельной почвенной системе составляла 0.115 сут⁻¹, что в 4.4 раза ниже, чем аналогичный показатель в условиях культивирования в минеральной среде (0.506 сут⁻¹) (см. раздел 6.1).

Ранее было показано, что штаммы *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а осуществляют утилизацию соединений, образующихся при разложении смеси А (см. глава 4, 5). Вероятно, данный процесс происходит и в условиях модельной почвенной системы, что подтверждается увеличением числа жизнеспособных клеток штаммов *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а на два порядка (8.5×10^8 КОЕ/г сух. почвы). Удельная скорость роста штаммов *Rhodococcus* sp. В7а и *R. erythropolis* G12а в ПХБ-загрязненной почве составила 0.107 ч⁻¹ и была достоверно выше аналогичного показателя в чистой почве.

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

6.1.3. Эффективность применения бактериального консорциума для очистки почвы, загрязненной Соволом

Исследована способность штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 осуществлять восстановление лесных и техногенно измененных почв, искусственно загрязненных смесью ПХБ торговой марки Совол (рисунок 66).

Внесение штаммов привело к снижению уровня загрязнения Соволом модельной системы с лесной почвой на 72.2% за 90 сут, а с техногенно измененной почвой – на 96.4% за тот же период времени.

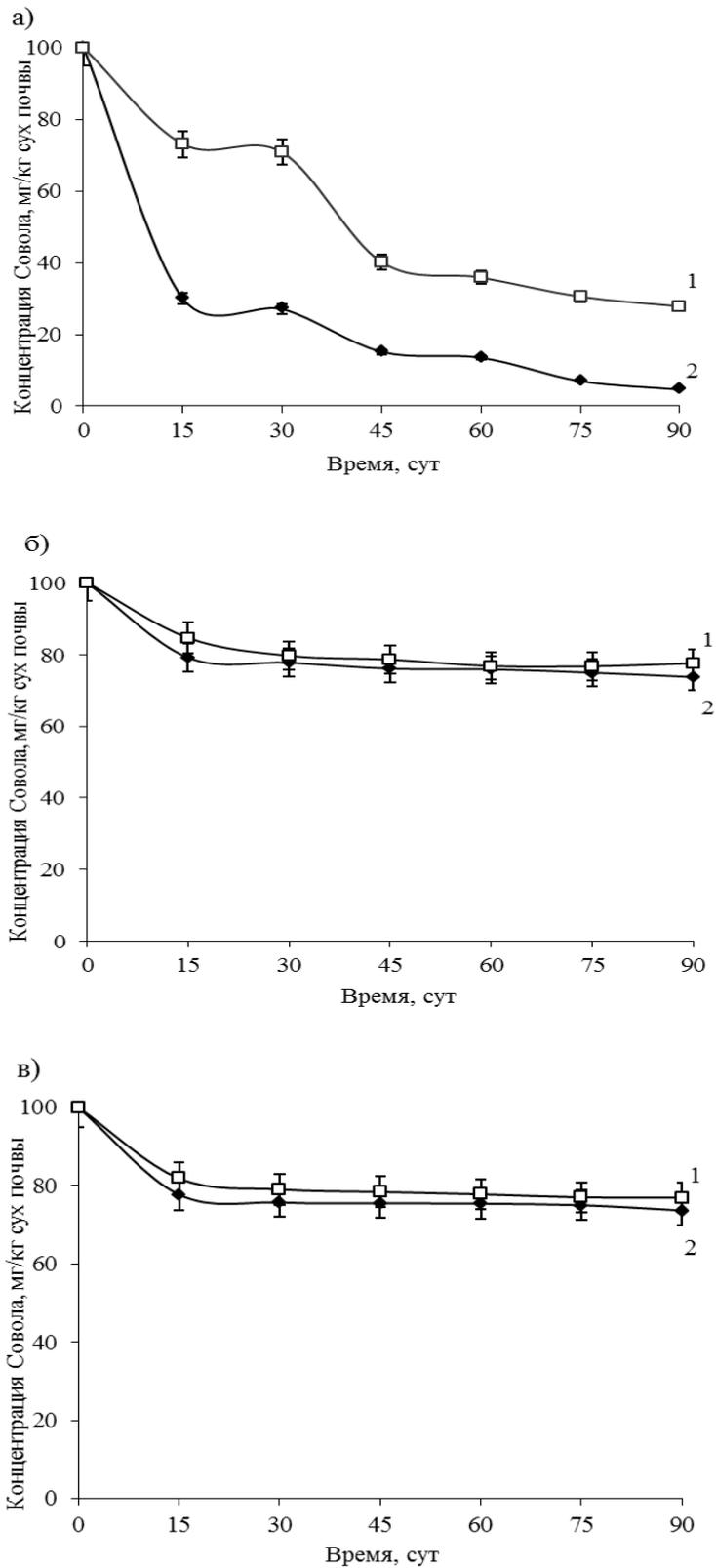


Рисунок 66 – Деструкция смеси СОВОЛ в модельных почвенных системах с природной (1) и промышленной (2) почвой: а – модельные системы, содержащие штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51, б – системы без внесения штаммов, в – системы с внесенными убитыми клетками штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51

Во время первого месяца инкубации уровень убыли СОВОЛА в экспериментальных системах отличался. Так, за 15 сут биоремедиации в модельных системах, содержащих штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51, снижение концентрации СОВОЛА составило 26.9% и 70.1% (в системах с лесной и техногенно измененной почвой соответственно), тогда как в модельных системах без внесения штаммов аналогичный показатель был значительно ниже и составил 15.4% и 21.8% для лесной и техногенно измененной почв соответственно. Близкий уровень снижения концентрации СОВОЛА (18.1 и 22.3%) зафиксирован в модельных системах с внесенными инактивированными культурами штаммов (рисунок 66). Максимальный уровень убыли СОВОЛА в биоаугментированных системах был обнаружен через 90 дней и составил 72.2% в системе с лесной почвой и 96.4% в системе с техногенно измененной почвой, что было значительно выше, чем в системах без внесения живых клеток штаммов-деструкторов за тот же период. Данные результаты показывают, что внесение штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 обуславливает эффективную ремедиацию СОВОЛ-загрязненной почвы.

Известно, что чем выше уровень содержания хлора в смеси ПХБ, тем ниже уровень биодоступности таких смесей. Уровень бактериальной деструкции трехкомпонентной бактериальной культурой Aroclor 1221 (концентрация хлора – 21%) составлял 47.8–93.7%, для Aroclor 1242 (концентрация хлора – 42%) колебался от 16% до 91% у различных штаммов, уровень биодegradации Aroclor 1248 (концентрация хлора 48%) составлял 40–61%, а Aroclor 1254 (концентрация хлора 54%) – только 23–35%, концентрации смесей ПХБ сопоставимы с использованной в настоящем исследовании (Bedard *et al.*, 1987; Quensen *et al.*, 1990; Fava *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2002; Pieper, 2005; Borjia *et al.*, 2005; Patureau, Trably, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2007; Adebusoye *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2010; Tartakovsky *et al.*, 2010).

Совол по уровню содержания хлора и по составу его постоянных конгенов ПХБ находится между Aroclor 1248 и Aroclor 1254 (Приложение 1, таблица 32). Степень удаления СОВОЛА в модельных почвенных системах, аугментированных штаммами *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51, выше, чем соответствующий показатель для Aroclor 1248, и сопоставима с уровнем деструкции менее хлорированной смеси ПХБ - Aroclor 1242.

Различные исследования выявили основную закономерность: уровень биодоступности ПХБ уменьшается с увеличением уровня хлорирования молекулы бифенила (Borjia *et al.*, 2005; Pieper, 2005; Patureau, Trably, 2006; Cao *et al.*, 2011). Результаты деструкции 3-, 4-, 5- и 6-хлорированных бифенилов СОВОЛА в биоаугментированных системах показаны в таблице 28.

Таблица 28 – Деструкция гомологичных групп конгенов ПХБ в биоаугментированных почвенных системах

Модельная почвенная система	Время, сут	Конгеновые группы ПХБ, кол-во заместителей			
		3	4	5	6
Техногенно измененная почва	30	72.9 ± 0.2	71.5 ± 0.2	64.9 ± 0.4	64.6 ± 0.6
	60	100	82.9 ± 0.3	84.3 ± 0.2	88.9 ± 0.5
	90	100	94.2 ± 0.1	95.2 ± 0.2	96.9 ± 0.2
Лесная почва	30	100	51.8 ± 0.5	54.2 ± 0.4	80.6 ± 0.4
	60	100	72.1 ± 0.1	64.4 ± 0.2	87.6 ± 0.3
	90	100	78.4 ± 0.1	73.9 ± 0.1	99.3 ± 0.1

Процент деструкции ПХБ варьировал от 72.9% для группы с тремя заместителями до 64.6% для группы с шестью заместителями в системе с техногенно измененной почвой в течение периода активной биодegradации (первый месяц инкубации). Для модельной системы с лесной почвой и для других периодов инкубации модельной системы с техногенно измененной почвой данная закономерность убывания СОВОЛА по гомологичным группам

ПХБ не была выявлена. Уровень деструкции гомологичных групп ПХБ в настоящем исследовании был выше по сравнению с данными более ранних исследований. Было обнаружено, что ко-инокуляция штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 приводит к более высокой скорости разложения ПХБ в модельных почвенных системах, чем применение данных штаммов индивидуально в почве (см. раздел 6.1.1. и 6.1.2). Более того, комбинация данных двух штаммов значительно увеличивает убыль групп высокохлорированных конгенов коммерческой смеси ПХБ по сравнению с комбинацией штаммов *R. eutropha* H850 и *Arthrobacter* sp. B1B (Singer *et al.*, 2000). Данные результаты показывают, что биоаугментация штаммами *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 может быть использована для достижения высокого уровня аэробной бактериальной деструкции ПХБ-смесей с высокохлорированными конгенерами.

Для ремедиации ПХБ-загрязненных участков важно использовать штаммы, способные выживать в различных почвах и в присутствии аборигенной микрофлоры. Рисунок 67 показывает динамику роста интродуцированных ПХБ-деградирующих штаммов в биоаугментированных системах. Количество жизнеспособных клеток штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 не уменьшалось в присутствии аборигенной микрофлоры и в отсутствии такого селективного фактора, как Совол. Однако, в данных условиях количество колониеобразующих единиц (КОЕ) изменялось незначительно.

Внесение Совола приводило к увеличению количества клеток штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 на три порядка в течение 45 дней. Таким образом, присутствие Совола обеспечило экспоненциальный рост бактериальных штаммов-деструкторов. Аналогичное изменение количества бактерий-деструкторов бифенила отмечено Di Togo с коллегами (2006) при разложении ПХБ в S3 биореакторе.

Следует отметить, что кинетические параметры роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 незначительно различались между системами с лесной

и техногенно измененной почвой (таблица 29). По-видимому, различие в составе взятых в эксперимент почв не оказывает влияния на способность исследуемых штаммов расти в биоаугментированной системе в присутствии Совола.

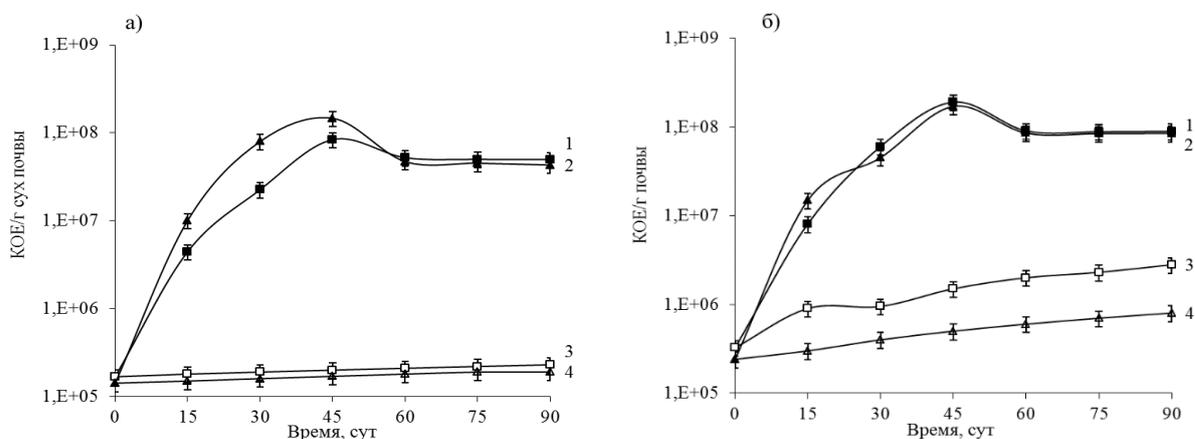


Рисунок 67 – Динамика роста штаммов *R. ruber* P25 (1, 3) и *M. oxydans* B51 (2, 4) в лесной (а) и техногенно измененной почве (б) с внесением Совола (1, 2) и без внесения Совола (3, 4)

Таблица 29 – Кинетические параметры роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 в почвенных системах с Соволом

Штаммы	Техногенно измененная почва		Лесная почва	
	μ (сут ⁻¹)	t_d (сут)	μ (сут ⁻¹)	t_d (сут)
<i>R. ruber</i> P25	0.138 ± 0.001	5.02 ± 0.01	0.141 ± 0.002	4.89 ± 0.01
<i>M. oxydans</i> B51	0.154 ± 0.001	4.49 ± 0.02	0.146 ± 0.003	4.75 ± 0.01

Rodrigues с коллегами (2006) изучал последовательное анаэробно-аэробное разложение Aroclor 1242 (70 мг/кг) с речными осадками и двумя генетически сконструированными штаммами. Бактериальные штаммы были способны значительно разлагать низкохлорированные бифенилы в осадках после анаэробной стадии эксперимента, при этом количество клеток увеличивалось на 1–2 порядка. Наши результаты показали, что штаммы *R. ruber* P25 and *M. oxydans* B51 способны деградировать промышленную смесь ПХБ в почве без этапа анаэробного дехлорирования ПХБ, при этом

количество клеток увеличивалось значительно, чем в случае экспериментов с *B. xenovorans* LB400 (*ohb*) and *Rhodococcus* sp. RHA1 (*fc*) (Rodrigues *et al.*, 2006).

Установлено, что скорость роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 при культивировании на смеси высокохлорированных бифенилов в почве меньше данного параметра при культивировании штаммов на низкохлорированных бифенилах в минеральной среде приблизительно в два раза (таблица 30).

Таблица 30 – Кинетические параметры роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 на хлорбифенилах в различных условиях культивирования

Условия культивирования	ПХБ	Концентрация, мг/л или мг/кг сух почвы	<i>R. ruber</i> P25		<i>Microbacterium</i> sp. B51	
			μ (сут ⁻¹)	t_d (сут)	μ (сут ⁻¹)	t_d (сут)
К1 минеральная среда	моноХБ	94.25	1.70 ± 0.03	0.40 ± 0.02	н.д.*	н.д.
	диХБ	22.3	0.91 ± 0.02	0.76 ± 0.02	4.61 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Стерильная промышленная почва	моноХБ	100	1.49 ± 0.01	0.46 ± 0.01	1.77 ± 0.03	0.38 ± 0.02
	Смесь ВР	780	1.02 ± 0.01	0.67 ± 0.01	н.д.	н.д.
Нестерильная техногенно измененная почва	Совол	100	0.14 ± 0.01	5.02 ± 0.01	0.15 ± 0.01	4.49 ± 0.02
	Совол	100	0.14 ± 0.02	4.89 ± 0.01	0.15 ± 0.03	4.75 ± 0.01

* н.д. – не детектировали

Кинетические параметры при биодegradации коммерческих смесей ПХБ, таких как Aroclor 1242, 1248, 1254 и 1260, в почве или осадках, описаны только для анаэробных смешанных культур (Bedard *et al.*, 1987; Quensen *et al.*, 1990; Fava *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006; Kolar *et al.*, 2007; Adebusoye *et al.*, 2008; Kwon *et al.*,

2008; Correa *et al.*, 2010; Tartakovsky *et al.*, 2010). Полученные нами данные о времени удвоения аэробных штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 в биоаугментированных системах с Соволом сопоставимы с данными о времени удвоения смешанной культуры, осуществляющей дехлорирование смеси Aroclor 1248 (Cho *et al.*, 2002; Field, Sierra-Alvarez, 2008).

Стоит отметить, что выявлена прямая отрицательная корреляция между показателями роста штаммов *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 в биоаугментированных системах, содержащих Совол, и изменением концентрации Совола в процессе биоремедиации. Коэффициент корреляции в биоаугментированной системе с техногенно измененной почвой составил 0.96, а в системе с лесной почвой – 0.87. Данный факт позволяет нам предположить, что интродуцированные штаммы эффективно используют в биоаугментированных системах Совол как источник углерода и энергии.

Таким образом, штаммы *R. ruber* P25 и *M. oxydans* B51 эффективно разлагают как индивидуальные хлорбифенилы, так и их смеси (экспериментальные и коммерческие) в модельных почвенных системах.

6.2. Биоремедиация почв, длительно загрязненных промышленными смесями ПХБ

6.2.1. Очистка ПХБ-загрязненной почвы г. Калуш (Украина) в результате внесения штамма *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7

Для изучения биоремедиационного потенциала штаммов, исследуемых в настоящей работе, в отношении длительно загрязненных ПХБ почв, была использована почва, отобранная на территории хвостохранилища в г. Калуш (см. главу 2, Приложение 2). Концентрация ПХБ в образцах составляла 485 мг/кг (8083 ПДК).

Для восстановления почвы был применен метод биоаугментации. В качестве бактериального агента был внесен штамм *R. wratislaviensis*

КТ112-7, способный эффективно разлагать хлорированные бифенилы и ряд ароматических соединений (см. главы 3-5).

В результате внесения штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 концентрация ПХБ (485 мг/кг) в почве за 60 сут понизилась в 30 раз (рисунок 68). К концу эксперимента концентрация загрязнителя в почве уменьшилась с 8084 ПДК до 25 ПДК.

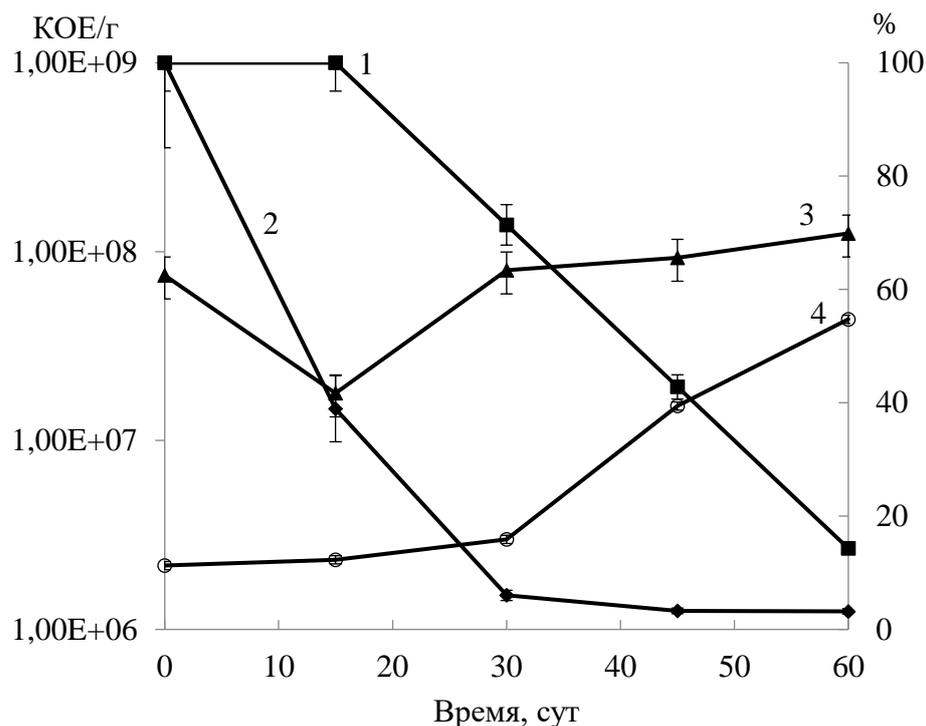


Рисунок 68 – Изменение концентрации ПХБ (%), фитотоксичности почвы (%) и количества внесенных и автохтонных бактерий (КОЕ/г почвы)

Анализ конгенерного состава ПХБ в почве показал, что происходит снижение всех, в том числе высокохлорированных, конгенеров ПХБ (рисунок 69).

Снижение концентрации ПХБ в почве приводило к снижению токсичности почвы и изменению численности микробиоценоза (рисунок 68). На первых этапах при высоком уровне содержания ПХБ наблюдается снижение числа жизнеспособных клеток внесенного штамма, и практически отсутствует изменение в численности гетеротрофных аборигенных бактерий.

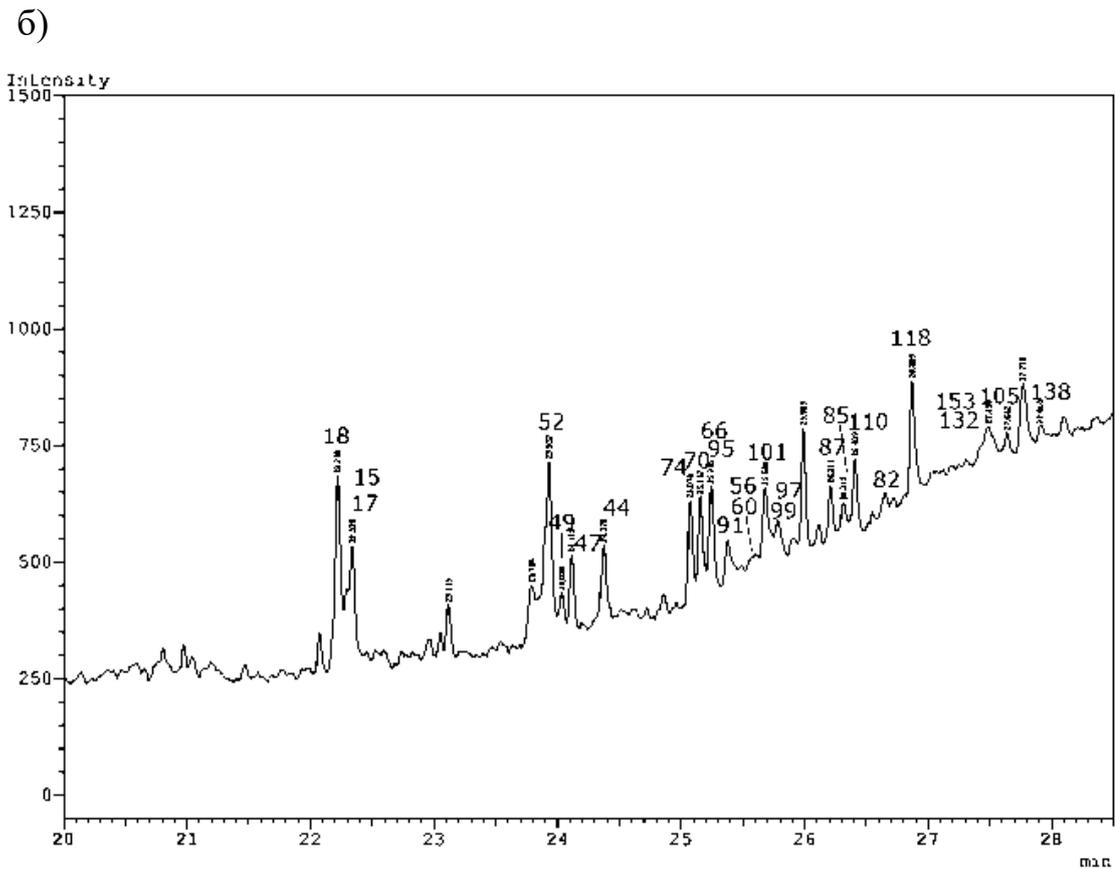
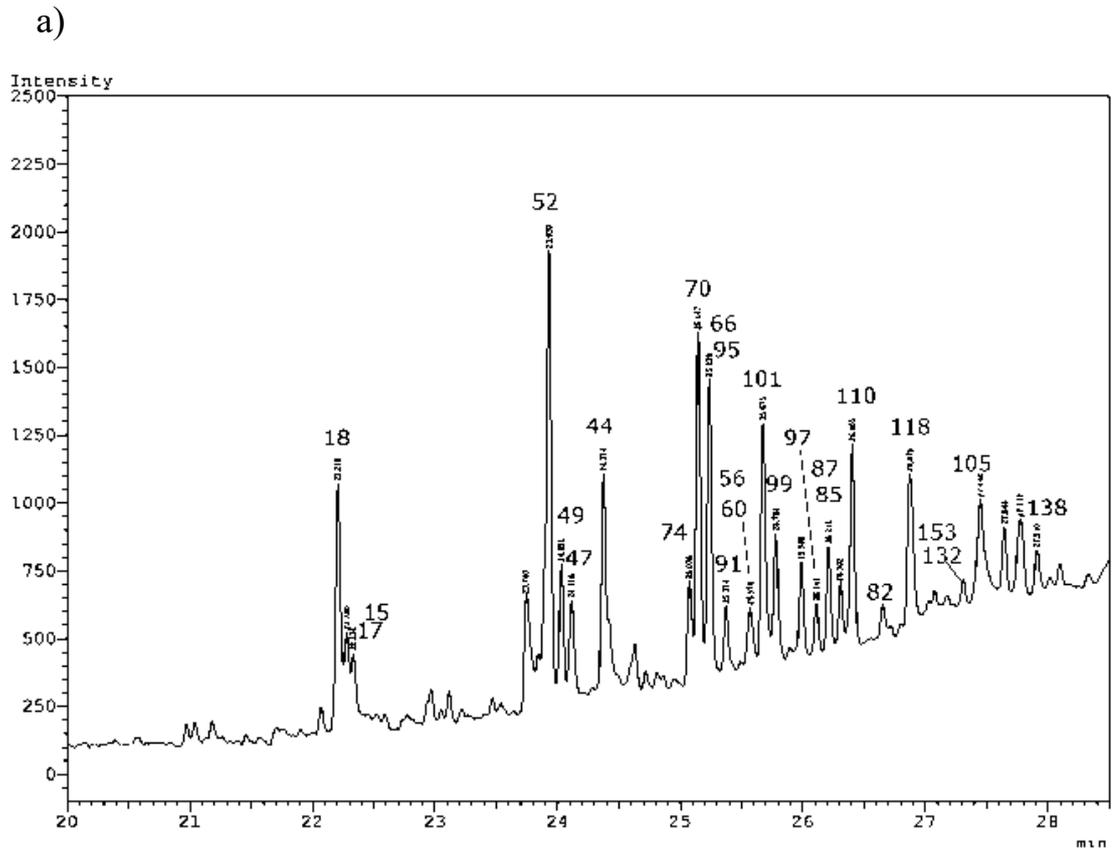


Рисунок 69 – ГХ-МСД хроматограммы исследуемой почвы: а – в начале эксперимента, б – через 60 сут

Однако, в результате снижения концентрации ПХБ до 6% от начальной к концу первого месяца ремедиации, в течение второго месяца эксперимента отмечается значительное увеличение численности как внесенных, так и автохтонных бактерий.

Одним из направлений ремедиации ПХБ-загрязненных почв является фиторемедиация. Однако, в случае высокой концентрации ПХБ в почве, применение растений становится невозможным из-за токсичности поллютанта (Šrédlová, Cajthaml, 2022). В результате контактного фитотестирования с использованием *Raphanus sativus* L. (редиса) установлено, что почва до начала эксперимента по биоремедиации являлась супертоксичной ($I = 100\%$). В результате проведенного эксперимента уровень фитотоксичности почвенного образца снизился. Процент прорастания семян *R. sativus* увеличился с 0% до 43% по сравнению с контрольным образцом. Индекс ингибирования при этом понизился до 14% (рисунок 67). Полученные результаты позволяют предположить, что в процессе биоремедиации, обусловленном внесением штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, почва была очищена до слаботоксичной, что делает возможным дальнейшее применение растений для ускорения процесса восстановления загрязненной территории.

Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 является перспективным для применения в биоремедиационных технологиях по очистке территорий, длительное время загрязненных ПХБ.

6.2.2. Биоремедиация ПХБ-загрязненной почвы г. Чапаевск (РФ)

индивидуальными штаммами и сообществами

Почвы, отобранные на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск длительное время были подвержены загрязнению рядом хлорорганических соединений, в том числе ПХБ (см. глава 2, Приложение 2). Для оценки возможности очистки почв с данным типом загрязнения были использованы индивидуальные штаммы, выделенные из почв г. Чапаевска, *R. wratislaviensis*

Ch625 и *R. wratislaviensis* Ch628, и бактериальная ассоциация Ch6. Установлено, что внесение как индивидуальных штаммов, так и ассоциации приводило к снижению концентрации ПХБ в почве (рисунок 70).

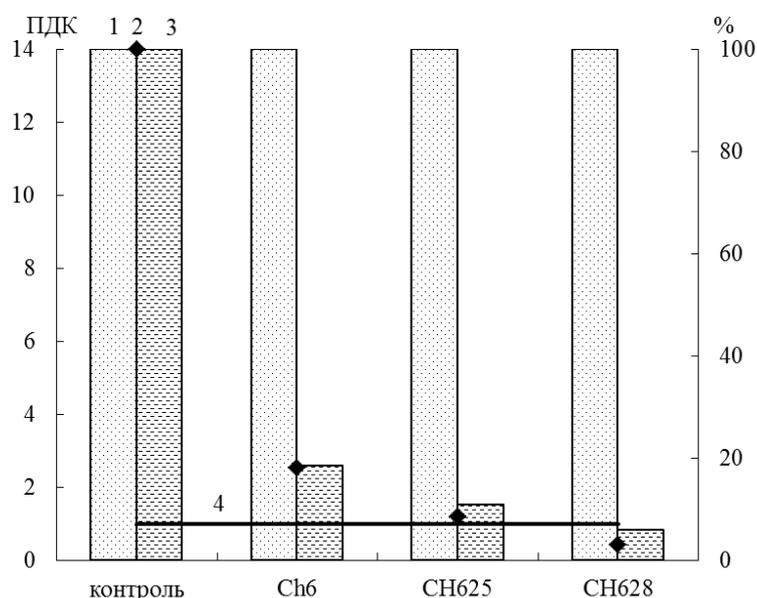


Рисунок 70 – Динамика концентрации ПХБ в почве и индекса фитотоксичности в процессе биоремедиации: 1 – концентрация ПХБ в начале эксперимента, 2 – индекс фитотоксичности почвы через 90 сут, 3 – концентрация ПХБ в почве через 90 сут, 4 – допустимое значение ПДК для ПХБ в почве

Стоит отметить, что биоаугментация индивидуальных штаммов приводит к более эффективной очистке почвы, чем внесение бактериальной ассоциации.

Установлено, что в результате внесения в почву штамма *R. wratislaviensis* Ch625(=ВКМ Ас 2631D) за 3 месяца удалось снизить концентрацию ПХБ в почве до значений, близких к ПДК, уровень деструкции составил 89%. Концентрация ПХБ с 0.85 мг/кг (14 ПДК) была снижена до 0.09 мг/кг (1.5 ПДК). При использовании ассоциации Ch6 данный показатель составил 81%, а остаточная концентрация ПХБ – 0.16 мг/кг (2.7 ПДК). Лучший результат получен при внесении штамма *R. wratislaviensis* Ch628 – остаточное содержание ПХБ составило 0.8 ПДК, а уровень

деструкции 95.9%. Снижение концентрации ПХБ в почве сопровождалось снижением уровня фитотоксичности почвы. Так через три месяца биоремедиации индекс фитотоксичности снизился до 3–18 %, что делает возможным рост растений на данной почве.

Динамика численности гетеротрофных почвенных бактерий, а также аугментированных штаммов свидетельствует, что биоремедиация ПХБ-загрязненной почвы под действием внесенных штаммов протекает эффективно (рисунок 71). Отмечена прямая корреляционная зависимость между снижением концентрации ПХБ в почве и увеличением численности аугментированных штаммов и аборигенной бактериальной флоры (коэффициент корреляции составил 0.978 и 0.984 соответственно).

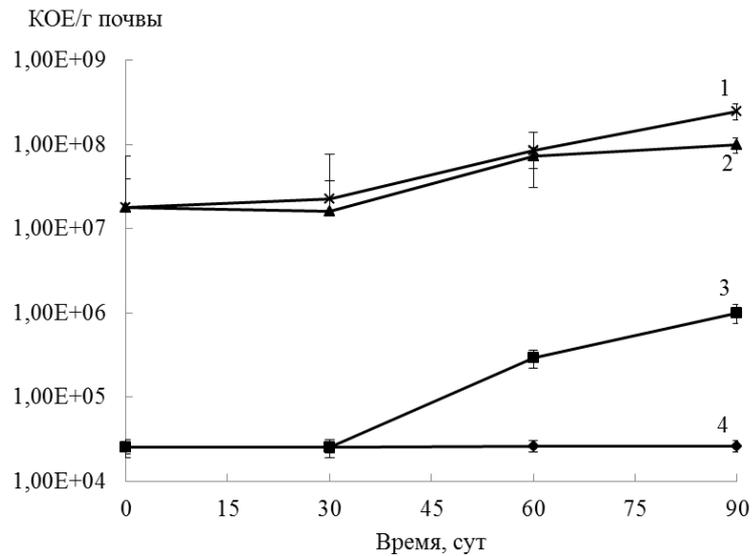


Рисунок 71 – Динамика численности бактерий в почве в процессе биоремедиации: 1 – штамм CH628; 2 – штамм CH625; 3 – аборигенная почвенная микрофлора в биоаугментированных системах; 4 – аборигенная почвенная микрофлора в контрольной почве

Таким образом, в результате биоаугментации штамма *R. wratislaviensis* Ch628 достигнуто снижение уровня загрязнения почвы до предельно допустимых значений, что позволяет рассматривать данный штамм как перспективный для технологий очистки ПХБ-загрязнённых почв.

Изучена возможность биоремедиации почвы, отобранной на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск, в результате биоаугментации штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, а также исследована эффективность сочетания методов биоаугментации (штамм КТ112-7) и биостимуляции (препарат «Гумиком»).

Показано, что внесение культуры штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в концентрации 10^6 и 10^7 КОЕ/г почвы приводит к снижению концентрации ПХБ в почве в 1.4 и 1.2 раза соответственно за 14 сут (начальная концентрация 0.941–1.333 мг ПХБ/кг почвы).

В качестве биостимулятора был использован препарат «Гумиком». Препарат «Гумиком» представляет собой гумино-минеральный комплекс, полученный на основе гуминовых веществ. Выпускается согласно ТУ 2186-002-13787869-2009 и техническому регламенту ТР 013-13787869-2009. Препарат «Гумиком» является продуктом однократной экстракции бурого угля гидроксидом калия с последующим осаждением их фосфорной кислотой. Применяется для повышения содержания гумуса, предпосевной обработки семян, корневой и внекорневой обработки, как самостоятельное удобрение, так и в смеси с любыми протравителями, гербицидами, средствами защиты растений и минеральными удобрениями. Также применяется для опрыскивания почвы перед вспашкой (культивацией). Содержит большое количество питательных элементов и способствует их лучшему усвоению корневой системой растения. Поддерживает высокую реактивность почвы, улучшает растворимость минералов посредством стимуляции корневой системы и точки роста корня. Внесение препарата «Гумиком» в образцы почв отобранных на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск в концентрации 0.01–1% от массы почвы приводило к снижению концентрации ПХБ в 1.2–1.4 раза через 3 месяца после биостимуляции (рисунок 72).

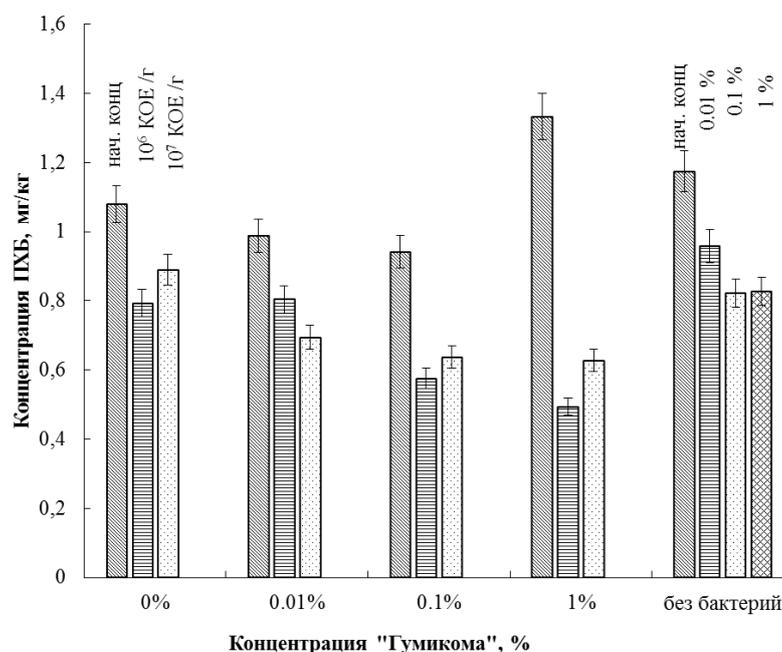


Рисунок 72 – Снижение концентрации ПХБ в почвах, отобранных на территории ОАО «СВЗХ» г. Чапаевск в результате внесения препарата «Гумиком» и совместного внесения с культурой штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7

Совместное внесение бактериальной культуры штамма КТ112-7 и препарата «Гумиком» позволило достичь снижения концентрации ПХБ в почве в 1.3–1.6 раза за 14 сут (рисунок 71). Наилучший результат получен при биоаугментации почвы бактериальной культурой в концентрации 10^6 КОЕ/г почвы и биостимуляции 1% «Гумикома» - концентрация ПХБ снизилась с 22.2 ПДК до 8.2 ПДК.

На основе полученных результатов разработан препарат «Полихлорокс» (изготавливается на производственной базе ООО «ЭМТ», согласно ТУ 9291-001-13787869-2013) (<http://eco-emt.ru>). В состав препарата включены культуры штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. wratislaviensis* Ch625. Препарат представляет суспензию бактериальных клеток в концентрации 10^8 – 10^9 КОЕ/мл и предназначен для разложения хлорорганических соединений в твердых отходах, находящихся в местах складирования (шламонакопителях, отработанных карьерах, промышленных площадках предприятий), ремедиации загрязнённых почв и грунтов,

глубокого обезвреживания загрязненных почв и твердых отходов, подвергшихся очистке механическими, физическими и физико-химическими способами. Получено положительное решение государственной экологической экспертизы (Приложение 5).

Таким образом, разработан способ очистки ПХБ-загрязненных почв, позволяющий проводить обработку почвы бактериальным и биостимулирующим препаратами несколько раз за вегетативный сезон, что обуславливает достижение эффективного снижения концентрации ПХБ в почве.

6.3. Анализ безопасности биотехнологически перспективных штаммов-деструкторов для высших организмов

Согласно имеющимся правовым актам (ФЗ «О санитарно...», 2005; «Сан. Эпид. Правила...», 2000; «Directive...», 2000), все представители рода *Microbacterium* не являются патогенными, а среди бактерий рода *Rhodococcus* вид *R. equi* по международной классификации (Directive..., 2000) отнесен к группе условно-патогенных микроорганизмов. Описана возможность проявлять патогенные свойства для отдельных представителей видов *R. globerulus*, *R. gordoniae* и *R. qingshengii* (Cuello *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004; Avendaño-Herrera *et al.*, 2011). В связи с этим, специальные эксперименты по определению патогенности штаммов *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. wratislaviensis* KT112-7, CH625, CH628, *Rhodococcus* sp. B7a и *R. erythropolis* G12a нами не проводились. Однако, учитывая возможность попадания исследуемых штаммов в организм животных и человека в случае использования их в составе биопрепаратов для ремедиации загрязненных почв, нами проведены исследования по определению антибиотикочувствительности и зоотоксичности на примере штаммов *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25.

Так как предсказать уровень устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 не представлялось

возможным, нами определена чувствительность к антибиотикам, входящим в различные группы антибактериальных препаратов (таблица 31) (Машковский, 2000).

Установлено, что соединения группы β -лактамов, преимущественно подавляющие синтез клеточной стенки грамположительных микроорганизмов, не оказывают ингибирующего действия на рост исследуемых штаммов. Анализ диаметров зон подавления роста штаммов при культивировании с препаратами группы аминогликозидов показал, что оба штамма чувствительны к действию неомицина, но резистентны к стрептомицину (Метод. указания..., 2004). Известно, что оба препарата подавляют синтез белка на уровне рибосом (преимущественно у грамотрицательных микроорганизмов), а неомицин также нарушает синтез цитоплазматической мембраны. Вероятно, исследуемые штаммы обладают защитными системами, препятствующими нарушению биосинтеза белка данными препаратами, но не содержат ферментов, способных инактивировать действие неомицина в отношении синтеза цитоплазматической мембраны клетки.

Таблица 31 – Антибиотикочувствительность штаммов-деструкторов

Антибактериальный препарат	<i>M. oxydans</i> B51			<i>R. ruber</i> P25		
	Диаметр зоны подавления роста, мм	МПК, мг/л	Чувствительность	Диаметр зоны подавления роста, мм	МПК, мг/л	Чувствительность
Бензилпенициллин	0	>32	-	0	>32	-
Ампициллин	0	>32	-	0	>32	-
Оксациллин	0	>32	-	0	>32	-
Стрептомицин	10	>64	-	13	>64	-
Неомицин	16	<4	+	15	<4	+
Левомецетин	12	>32	-	21	<8	+
Ристомицин	17	>32	+	18	<32	+

Результаты опытов по культивированию *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 с ристомицином показали высокую чувствительность обоих штаммов к действию данного антибиотика, что, вероятнее всего, связано с отсутствием ферментативных систем, блокирующих действие ристомицина на биосинтез клеточной стенки. Из таблицы 8.5 видно, что исследуемые штаммы обладали различной антибиотикочувствительностью только к левомецетину. Известно, что левомецетин нарушает биосинтез белка у грамположительных бактерий и, в меньшей степени, активен в отношении грамотрицательных микроорганизмов (Машковский, 2000).

Согласно экспериментальным данным, штамм *R. ruber* P25 проявлял высокую чувствительность к действию левомецетина, и, соответственно, не содержит ферментов, препятствующих действию данного антибиотика на процесс синтеза белка в клетках штамма. Напротив, *M. oxydans* B51, вероятно, обладает необходимыми защитными ферментативными системами, так как проявляет устойчивость к высоким концентрациям левомецетина. Таким образом, для достижения бактерицидного эффекта в отношении штаммов *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 могут быть использованы антибактериальные препараты неомицин и ристомицин.

Проведенные исследования по определению зоотоксичности штаммов *M. oxydans* B51 и *R. ruber* P25 показали, что ни одна из использованных доз (1.4×10^5 и 2.5×10^7 КОЕ/животное) не вызывает развитие характерного для интоксикации симптомокомплекса и не оказывает летального действия на белых мышей. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые штаммы-деструкторы не являются токсичными для животных и человека.

Таким образом, штаммы-деструкторы ПХБ, перспективные для применения в биоремедиационных технологиях, не представляют опасности для высших животных и человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Следует отметить, что исследования, направленные на изучение филогенетического и функционального разнообразия бактерий-деструкторов ПХБ, ведутся на протяжении нескольких десятилетий и охватывают все ведущие страны мира (см. раздел 1.2). Однако, на территории Российской Федерации исследовательские работы, посвященные комплексному изучению штаммов аэробных бактерий, обладающих деградационным потенциалом в отношении полихлорбифенилов, до настоящего исследования не проводились. Проблема очистки ПХБ-загрязненных территорий, а также утилизации не востребуемых ПХБ, для РФ является актуальной, так как ПХБ производились и использовались в промышленных масштабах более 60 лет, что привело к их накоплению как в местах складирования, так и в окружающей среде (Трегер, 2013; Горбунова и др., 2018).

В качестве объектов исследования на таксономическом, молекулярно-генетическом и функциональном уровнях нами были выбраны штаммы аэробных бактерий, выделенные из почв девяти географически удаленных друг от друга территорий, характеризующихся существенными различиями в спектре и концентрации химических загрязнителей. Проведенные исследования позволили выделить бактериальные ассоциации, а также более

300 штаммов аэробных бактерий, осуществляющих разложение бифенила/ПХБ и (хлор)бензойных кислот до соединений основного обмена клетки. Анализ филогенетического разнообразия показал, что доминирующую позицию занимают представители филумов *Proteobacteria* (родов *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bosea*, *Brevundimonas*, *Cupriavidus*, *Mezorhizobium*, *Ohrobactrum*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*), *Actinobacteria* (родов *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*) и *Firmicutes* (родов *Bacillus*, *Planococcus*). Полученные нами результаты об основных таксономических группах штаммов-деструкторов ПХБ, являющихся представителями микробиоценозов на территории РФ, совпадают с общемировыми наблюдениями об основных бактериальных таксонах, представители которых обладают ПХБ-деградативной активностью.

Оценивая накопленные в литературе данные о функциональном разнообразии описанных аэробных штаммов-деструкторов ПХБ, можно говорить об общей закономерности: наиболее доступными для бактериальной трансформации являются конгенеры ПХБ, содержащие 1-4 заместителя в молекуле в *орто*- или *мета*-положении, а конечными интермедиатами являются хлорбензойные кислоты (Hou, Dutta, 2000; Pieper, Seeger, 2008; Ponce *et al.*, 2011; Somaraja *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2014; Ilori *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015; Atago *et al.*, 2016; Shuai *et al.*, 2016; Kour *et al.*, 2019). Проведенные нами исследования позволили выявить штаммы *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D), *R. wratislaviensis* CH625 (=ВКМ Ас-2631D), *R. wratislaviensis* CH628, *R. wratislaviensis* P1, *R. wratislaviensis* G10, *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Microbacterium oxydans* B51, обладающие уникальными путями разложения хлорбифенилов. При детекции основных интермедиатов установлено, что данные штаммы осуществляют окисление как *орто*-, так и *пара*-замещенного кольца в молекулах дихлорированных и

трихлорированных бифенилов с расположением заместителей {1+1} и {2+1}. Сопоставление данных о выявленных метаболитах при разложении ПХБ, ростовых параметрах при культивировании на бензойной и хлорбензойных кислотах, ферментативной активности и функциональных генах позволило нам установить, что хлорбензойные кислоты не являются конечным продуктом деструкции ПХБ у исследуемых штаммов. Заслуживает внимания тот факт, что разложение хлорбензойных кислот происходит как в результате атаки бензоат 1,2-диоксигеназы с образованием катехола/хлоркатехолов, так и в результате действия комплекса ферментов, приводящих к образованию *para*-гидроксибензойной и протокатеховой кислот. Образовавшиеся интермедиаты трансформируются далее до соединений основного обмена клетки. Представленные данные об особенностях разложения ХБК штаммами-деструкторами ПХБ являются новыми и вносят существенный вклад в понимание механизмов бактериальной трансформации хлорароматических поллютантов.

Современные исследования направлены на изучение процессов бактериального окисления полихлорированных бифенилов на молекулярно-генетическом уровне. Ключевым ферментом деструкции ПХБ является бифенил 2,3-диоксигеназа (ДО) (Parales, Resnick, 2006; Fukuda, 2014; Agulló *et al.*, 2019). Известно, что спектр разлагаемых конгенов ПХБ зависит от особенностей строения α -субъединицы бифенил 2,3-ДО, кодируемой геном *bphA1*, на которой располагается каталитический центр фермента (Wang *et al.*, 2021). Применение в настоящем исследовании современной методологической базы позволило выявить особенности строения α -субъединицы бифенил 2,3-ДО (*bphA1*-гена) у штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Установлено, что *bphA1*-гены штаммов рода *Rhodococcus* отличающихся метаболическим профилем при разложении ПХБ, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами фенилпропионат ДО (97.7–100%, 2 штамма), бифенил ДО (99.5–100%, 4 штамма), бифенил/толуол ДО

грамположительных бактерий (87.1–99.6%, 14 штаммов). Вместе с тем, *bphA1*-гены штаммов рода *Pseudomonas* демонстрируют наибольший уровень сходства с генами бифенил/толуол ДО грамотрицательных бактерий (93.0–100%, 7 штаммов). Интересно отметить, что в геноме 5 штаммов рода *Pseudomonas* и 11 штаммов рода *Rhodococcus*, у которых изучен ген *bphA1*, выявлены плазмиды большой молекулярной массы, что может обуславливать горизонтальный перенос генов деструкции ПХБ. После проведенного анализа *bphA1*-генов для дальнейшего исследования структуры α -субъединицы бифенил 2,3-ДО были отобраны два штамма: *R. wratislaviensis* КТ112-7 (=ВКМ Ас-2623D) и *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896). Применение методов моделирования и биоинформатики позволило получить уникальные данные о вторичной и третичной структуре $VphA1_{КТ112-7}$ и $VphA1_{P25}$, на основании нуклеотидной последовательности *bphA1*-гена. Установлено, что третичная структура $VphA1_{КТ112-7}$ имеет наибольший уровень сходства с $VphA1$ штамма *R. jostii* RHA1 (гены *bphA1* у обоих штаммов локализованы на плазмидах), тогда как третичная структура $VphA1_{P25}$ является уникальной: не выявлено достоверного сходства с какой-либо α -субъединицей бифенил/ толуол/ бензол/фенилпропионат 2,3-диоксигеназ.

Впервые задокументирована и размещена в международной базе данных GenBank полногеномная нуклеотидная последовательность штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7. Установлено, что геном представлен хромосомой (CP072193.1) и двумя мегаплазмидами: pRHWK1 (CP072194.1) и pRHWK2 (CP072195.1). Биоинформатический анализ генома штамма КТ112-7 подтвердил полученные экспериментальные данные о способности штамма утилизировать ПХБ до соединений основного обмена клетки. Установлено уникальное расположение *bph*-генов: плазмида pRHWK1 несет *bph*-гены (*bphA1A2A3A4CB*), кодирующие ферменты классического «верхнего» пути разложения бифенила/ПХБ (уровень сходства с *bph*-генами штамма-деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (GenBank ABG99107.1) составляет 99–

100%); на хромосоме находятся гены «*bphA1A2B*» филогенетически близкие генам, кодирующим ферменты деструкции нафталина у актинобактерий (наибольший уровень сходства с генами нафталин диоксигеназы штамма *R. oracus* TKN14 (GenBank BAE53376.1) – 98%). Известно, что нафталин 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.12) родококков способна осуществлять гидролитическое окисление (поли)ароматических соединений, в том числе бифенила/хлорированных бифенилов (Barriault, Sylvestre, 1999; Gibson, Parales, 2000; Mukerjee-Dhar *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Впервые в одном геноме описана плазмидная (pRHWK1, участок ДНК 132078–133338 нуклеотид) и хромосомная (участок ДНК 4804486–4805746 нуклеотид) локализация генов *ohbAB*, обуславливающих разложение 2-хлорбензойной кислоты. Также в геноме штамма КТ112-7 выявлены гены, кодирующие ферменты деструкции гидрокси-бензойных кислот и катехола/хлоркатехолов. Сравнительный анализ генома штамма КТ112-7 с геномами штаммов-деструкторов ПХБ, размещенными в международной базе данных NCBI, подтвердил уникальность штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7.

Известно, что группа ПХБ состоит из 209 соединений (конгенеров). В промышленности ПХБ применялись в виде коммерческих смесей, содержащих от 40 до 70 конгенеров (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015; Erickson, Kaley, 2011). Химический анализ смесей ПХБ торговых марок Трихлорбифенил (ТХБ) и Совол, производившихся на химических предприятиях РФ, показал, что основную долю в них составляют (три-гекса)-хлорированные конгенеры (Кириченко и др., 2000; Первова и др., 2015). Учитывая тот факт, что большинство известных штаммов-деструкторов ПХБ эффективно разлагают низкохлорированные бифенилы, в настоящее время существует необходимость поиска и изучения штаммов аэробных бактерий, не только осуществляющих деструкцию ПХБ без накопления токсичных метаболитов, но и способных разлагать многокомпонентные коммерческие смеси ПХБ. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. ruber*

P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Pseudomonas* sp. MD8, *M. oxydans* B51 эффективно разлагали экспериментальную (20 конгенов, основная доля - тетрахлорированные) и коммерческие смеси ПХБ Трихлорбифенил/Delor 103 и Совол (40–50 конгенов, основную долю составляют три- и пентахлорированные ПХБ, соответственно). Многие исследователи отмечают, что эффективность разложения смесей ПХБ аэробными бактериями ниже, чем деструкции отдельных конгенов (Masai *et al.*, 1995; Furukawa, 2000; Sondossi *et al.*, 2004; Lambo, Patel, 2006; Iori *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009). В тоже время, у представленных в настоящем исследовании штаммов уровень деструкции смесей ПХБ достигал 95–100% за 3–14 суток при начальной концентрации 32–600 мг/л, что сопоставимо с результатами по разложению отдельных конгенов ПХБ (см. разделы 3, 5). Следует отметить, что по эффективности деструкции коммерческих смесей ПХБ штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. MD1, *Rhodococcus* sp. MD2, *Rhodococcus* sp. B7a, *R. erythropolis* G12a, *Pseudomonas* sp. MD8, *M. oxydans* B51 превосходят известные ранее (Bedard *et al.*, 1987; Kolar *et al.*, 2007; Petrič *et al.*, 2007; Adebusoye *et al.*, 2008; Hatamian-Zarmi *et al.*, 2009).

Одним из лимитирующих факторов биодоступности ПХБ для бактерий является их низкая растворимость в воде (Горбунова и др., 2018). Решение данной проблемы возможно путем введения в молекулу хлорбифенилов дополнительных заместителей иной химической природы. В качестве таких заместителей могут выступать гидрокси-, аминоэтокси-, полиэтиленгликолокси- группы и некоторые другие (Горбунова и др., 2018). Основываясь на данных по химической функционализации ПХБ, нами была выдвинута гипотеза, что модифицированные в результате химической предобработки ПХБ будут более доступны для аэробной бактериальной деструкции. Кроме того, в настоящее время остро стоит вопрос формирования вторичных поллютантов – гидрокси- и метокси-

полихлорированных бифенилов, образующихся в результате трансформации ПХБ в окружающей среде под действием абиотических и биотических факторов (Camara *et al.*, 2004; Passatore *et al.*, 2014; Tehrani, Van Aken, 2014; Sun *et al.*, 2016, 2018; Li *et al.*, 2019). В литературе присутствуют единичные сообщения о способности штаммов аэробных бактерий осуществлять разложение отдельных конгенов гидроксилированных хлорбифенилов (Francova *et al.*, 2004; Tehrani *et al.*, 2012, 2014; Kanteev *et al.*, 2015; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Заслуживает внимания тот факт, что гидрокси- и метокси-ПХБ присутствуют в природных средах в виде смесей, однако, до настоящего исследования изучение бактериальной деструкции данных смесей не проводилось. Применение междисциплинарного подхода, а именно, химических методов синтеза и анализа в комплексе с современными микробиологическими методами, позволило получить принципиально новые научные и практические данные о способности аэробных бактерий разлагать гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси и аминоэтокси-полихлорированные бифенилы. Установлено, что введение новых функциональных групп в молекулу ПХБ приводит к повышению эффективности деструкции смесей модифицированных ПХБ штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7 и *R. ruber* Р25. Удельная скорость деструкции смесей модифицированных ПХБ выше аналогичного показателя для коммерческих смесей ПХБ в 1.05–2.26 раза. Период разложения смесей, содержащих гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолокси- и аминоэтокси-полихлорбифенилы, на 73–100% при исходной концентрации 100–1500 мг/л составил 4–14 сут. Происходит разложение всех компонентов смесей и отсутствует накопление опасных интермедиатов, что подтверждается данными аналитических исследований (см. раздел 5). Полученные сведения позволили предложить новый междисциплинарный подход к уничтожению ПХБ, основанный на сочетанном использовании химических и биологических процессов, включающий в себя этап химической

функционализации ПХБ и последующий этап бактериальной деструкции полученных соединений.

В последнее время широко обсуждается вопрос разработки природоподобных технологий с использованием биodeградативного потенциала биологических объектов, и, в частности, аэробных бактерий (Šrédlová, Cajthaml, 2022). Отдельный этап работы был посвящен изучению возможности использования штаммов, выделенных в ходе настоящего исследования, в качестве основы биоремедиационных препаратов, применяемых в экобиотехнологиях, направленных на очистку ПХБ-загрязненных территорий. Установлено, что штаммы *M. oxydans* B51, *R. ruber* P25, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH625, *R. wratislaviensis* CH628, *Rhodococcus* sp. B7a в условиях модельных почвенных систем, содержащих от 14 до 16667 ПДК ПХБ (0.84–1000 мг ПХБ/кг почвы) разлагали загрязнитель на 72–100% за 14–90 сут. Проведение исследований как на искусственно загрязненных почвах, так и на почвах с многолетним загрязнением, показало, что внесение штаммов-деструкторов не приводило к угнетению аборигенной микрофлоры и накоплению токсичных метаболитов, а также способствовало снижению уровня фитотоксичности почвы (см. раздел б), что делает перспективным применение фиторемедиационных технологий для полного восстановления ПХБ-загрязненных почв. Учитывая полученные результаты, запатентованы активные штаммы-деструкторы ПХБ, а также способ очистки ПХБ-загрязненных почв, основанный на сочетанном использовании штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 и гуминно-минерального препарата «Гумиком» (патенты РФ №2262531, №2548804, №2585537, №2562156, №2563660). Совместно с ООО «Эмульсионные технологии» разработан микробиологический препарат «Полихлорокс» на основе штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH625 для очистки почв, загрязнённых ПХБ. Препарат получил положительное заключение государственной экологической экспертизы (Приложение 5).

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

ВЫВОДЫ

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

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

3. Установлено, что *bphA1*-гены, кодирующие α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (ключевой фермент деструкции ПХБ) штаммов рода *Rhodococcus*, отличающихся метаболическим профилем при разложении ПХБ, имеют существенные различия и характеризуются наибольшим уровнем сходства с генами диоксигеназ (ДО), гидрокслирующих ароматическое кольцо: фенилпропионат ДО (97.7–100%) – 2 штамма, бифенил ДО (99.5–100%) – 4 штамма, бифенил/толуол ДО (87.1–99.6%) – 14 штаммов. На основании транслированных аминокислотных

последовательностей получены модели вторичной и третичной структур α -субъединицы бифенил 2,3-ДО (BphA1) штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. ruber* P25. Показано, что α -субъединица бифенил 2,3-ДО штамма KT112-7 (BphA1_{pRHWK1}) на 98.65% сходна с BphA1 активного деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1, в тоже время, третичная структура BphA1_{p25} является уникальной: не выявлено достоверного сходства с какой-либо α -субъединицей бифенил/толуол/бензол/фенилпропионат 2,3-диоксигеназ.

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

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

6. Впервые показана возможность аэробной бактериальной трансформации химически модифицированных смесей ПХБ, в молекулах которых в качестве заместителей присутствуют гидрокси-, метокси-, полиэтиленгликолюкси- и аминоэтокси-группы, без накопления опасных для окружающей среды соединений. Показано, что штаммы *R. ruber* P25 и

R. wratislaviensis КТ112-7 осуществляют деструкцию смесей (концентрация 100–1500 мг/л) на 73–100% за 4–14 суток. Установлено, что удельная скорость деструкции смесей модифицированных ПХБ, полученных на основе коммерческих смесей Трихлорбифенил/Deloc 103 и Совол, была выше аналогичного показателя при разложении исходных смесей (Трихлорбифенил/Deloc 103 и Совол) в 1.05–1.45 и 1.21–2.26 раза, соответственно. Предложен междисциплинарный (химико-биологический) подход для разработки новых технологий, направленных на уничтожение неостребованных смесей ПХБ.

7. Установлено, что активные деструкторы ПХБ *M. oxydans* В51, *R. ruber* Р25, *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. erythropolis* G12a, *R. wratislaviensis* СН625, *R. wratislaviensis* СН628 и *Rhodococcus* sp. В7а могут быть использованы в качестве биологических агентов при создании биоремедиационных препаратов. Эффективность деструкции ПХБ вышеперечисленными штаммами в условиях модельной почвенной системы составила 72–100% (при исходном уровне загрязнения ПХБ от 14 до 16667 ПДК) за 14–90 суток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПХБ – Полихлорированные бифенилы
- СОЗ – Стойкие органические загрязнители
- ХБК – хлорбензойные кислоты
- ГОФДК – гидрокси-оксо-фенилгексадиеновая кислота
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГХ – газовая хроматография
- ПИД – пламенно-ионизационный детектор
- МС – масс-спектрометрический детектор
- 2-НО-БК – 2-гидроксибензоат/салицилат
- 3-НО-БК – 3-гидроксибензоат
- 4-НО-БК – 4-гидроксибензоат
- 2,4-диНО-БК – 2,4-дигидроксибензоат
- 2,5-диНО-БК – 2,5-дигидроксибензоат
- 3,4-диНО-БК – 3,4-дигидроксибензоат
- 2-ХБК – 2-хлорбензойная кислота
- 3-ХБК – 3-хлорбензойная кислота
- 4-ХБК – 4-хлорбензойная кислота
- 2,4-диХБК – 2,4-дихлорбензойная кислота
- 2,3-диХБК – 2,3-дихлорбензойная кислота
- 2,5-диХБК – 2,5-дихлорбензойная кислота
- 2,6-диХБК – 2,6-дихлорбензойная кислота
- 3,5-диХБК – 3,5-дихлорбензойная кислота
- 3,4-диХБК – 3,4-дихлорбензойная кислота
- моноХБ – моноклорбифенил
- диХБ – дихлорбифенил
- триХБ – трихлорбифенил
- ПХБ 1 – 2-хлорбифенил
- ПХБ 2 – 3-хлорбифенил
- ПХБ 3 – 4-хлорбифенил

ПХБ 4 – 2,2'-дихлорбифенил
ПХБ 8 – 2,4'-дихлорбифенил
ПХБ 12 – 3,4-дихлорбифенил
ПХБ 15 – 4,4'-дихлорбифенил
ПХБ 17 – 2,4,2'-трихлорбифенил
ПХБ 28 – 2,4,4'-трихлорбифенил
ПХБ 29 – 2,4,5—трихлорбифенил
ПХБ 30 – 2,4,6-трихлорбифенил
БДО – бифенил диоксигеназа
Б/Т ДО – бензол/толуол диоксигеназа
ФПДО – фенил пропионат диоксигеназа
НДО – нафталин диоксигеназа
Кат 1,2-ДО – катехол 1,2-диоксигеназа
Кат 2,3-ДО – катехол 2,3-диоксигеназа
ПГБГ – *para*-гидроксибензоат диоксигеназа
НО-ПХБ – гидрокси-полихлорбифенилы
ПХБ-ПЭГ – полиэтиленгликоль-полихлорбифенилы
Ме-ПХБ – метокси-полихлорбифенилы
Ме,НО-ПХБ – метокси-гидрокси-полихлорбифенилы
АЭ-ПХБ – аминоэтокси – полихлорбифенилы
НО,АЭ-ПХБ – гидрокси-аминоэтокси-полихлорбифенилы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабыкин, М.М. Плазмиды различных штаммов *Pseudomonas spheroides* / М.М. Бабыкин [и др.] // Молекулярная генетика микроорганизмов и вирусов. – 1984. – № 7. – С. 23–28.
2. Боярский, В.П. Способ химической переработки полихлорированных бифенилов / В.П. Боярский [и др.] // Патент № 2623216 РФ. Опубл. 23.06.2017 г. – Бюл. № 18.
3. Васильева, Г.К. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами / Г.К. Васильева, Е.Р. Стрижакова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 725–741.
4. Генералова, К.Н. Адсорбция клеток бактерий на углеродных сорбентах. Вестник пермского национального исследовательского политехнического университета. / К.Н. Генералова, А.А. Минькова, В.Ф. Олонцев // Химическая технология и биотехнология. – 2014. – № 2. – С. 53–64.
5. Горбунова, Т.И. Полихлорбифенилы: Проблемы экологии, анализа и химической утилизации / Т.И. Горбунова [и др.] – М.: КРАСАНД; Екатеринбург: УрО РАН. – 2011. – 400 с.
6. Горбунова, Т.И. Пример междисциплинарного подхода к проблеме обезвреживания техногенных полихлорбифенилов / Т.И. Горбунова [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 454, № 4. – С. 411 – 416. DOI: 10.7868/S086956521404015X
7. Горбунова, Т.И. Химическая функционализация полихлорированных бифенилов: новые достижения / Т.И. Горбунова [и др.] – Екатеринбург: Издательство Уральского Университета. – 2018. – 728 с.
8. Горбунова, Т.И. Химические методы превращений полихлорбифенилов / Т.И. Горбунова, В.И. Салоутин, О.Н. Чупахин // Успехи химии. – 2010. – Т. 79, № 6. – С. 565–586.
9. ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». – М.: Стандартинформ. – 2008. – 50 с.

10. ГОСТ 12071-2014. «ГРУНТЫ. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов». – М.: Стандартинформ. – 2019. – 8 с.
11. ГОСТ 17.4.3.01-83. «Охрана природы. ПОЧВЫ. Общие требования к отбору проб». – М.: Стандартинформ. – 2008. – 8 с.
12. ГОСТ 17.4.4.02-84. «Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа». – М.: Стандартинформ. – 2008. – 9 с.
13. Демин, Д.В. Ремедиация почв, загрязнённых полихлорбифенилами: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.13 / Демин Дмитрий Викторович. – Пушино, 2013. – 138 с.
14. Дуган, И.Н. Пути катаболизма ароматических субстратов у родококков / И.Н. Дуган, Е.Л. Головлева // Микробиология. – 1985. – Т.54. – С. 128–134.
15. Егорова, Д. О. Деструкция ароматических углеводородов 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. doi:10.7868/S0555109913030070
16. Егорова, Д.О. Бактериальная деструкция смеси гидрокси- и метоксипроизводных полихлорированных бифенилов/ Д.О. Егорова [и др.] // Доклады Академии Наук. –2019. – Т. 486, №3. – С. 307–311.
17. Егорова, Д.О. Бактериальная деструкция смеси, полученной при химической модификации полихлорированных бифенилов полиэтиленгликолями / Д.О. Егорова, Т.И. Горбунова, М.Г. Первова, В.А. Демаков // Биотехнология. – 2013. – №4. – С. 56–64.
18. 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. – 2014. – №4. – С. 64–72.

19. Егорова, Д.О. Биоремедиация почвы, длительное время загрязненной дихлордифенилтрихлорэтаном, с использованием аэробного штамма *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628 / Д.О. Егорова [и др.] // Почвоведение. – 2017. – №10. – С. 1262–1269.
20. 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. doi:10.7868/S0555109918030042
21. 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. 655–662.
22. 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.
23. Жариков, Г.А. Разработка и полевые испытания технологий биоремедиации территорий, загрязненных токсичными химическими веществами / Г.А. Жариков [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2013. – №2(44). – С. 41–51.
24. Жарикова, Н.В. Бактериальные гены инициации деградации хлорфеноксисукусных кислот, кодирующие негемовые железосодержащие оксигеназы с кластером Риске-типа / Н.В. Жарикова [и др.] // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 292–305.
25. Заварзина, Д.Г. GEOALKALIBACTER FERRINYDRITICUS GEN. NOV., SP. NOV., первый алкалофильный представитель семейства ГЕОБАКТЕРАСЕАЕ, выделенный из содового озера / Д.Г. Заварзина [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т.75, № 6. – С. 775–785.

26. Зайцев, Г.М. Подготовительный метаболизм 4-хлорбензойной кислоты у *Arthrobacter globiformis*. / Г.М. Зайцев, Ю.Н. Карасевич // Микробиология. – 1981. – Т. 50. – С. 423–428.
27. Занавескин, Л.Н. Полихлорбифенилы: проблемы загрязнения окружающей среды и технологические методы обезвреживания / Л.Н. Занавескин, В.А. Аверьянов // Успехи химии. – 1998. – Т. 67, № 8. – С. 788–800.
28. Капранов, В.В. Штамм бактерий *Alcaligenes latus*, разлагающий полихлорированные бифенилы / В.В. Капранов, Г.А. Жариков, Р.В. Боровик // Патент РФ №2155804 С1. – 11.02.1999.
29. Кириченко, В.Е. Идентификация изомерных полихлорированных бифенилов в техническом продукте «Совол» / В.Е. Кириченко [и др.] // Аналитика и контроль. – 2000. – Т. 4, № 1. – С. 41–44.
30. Корсакова, Е.С. Анализ загрязнения почв лесопарковых зон Перми и территории заказника «Предуралье» стойкими органическими загрязнителями / Е.С. Корсакова, Д.О. Егорова // Антропогенная трансформация природной среды. – 2015. – С. 152–156.
31. Крятов, И.А. Регулирование безопасных уровней содержания полихлорированных бифенилов в почве: российский и международный опыт. / И.А. Крятов [и др.] // Гигиена и санитария. – 2013. – № 6. – С. 52–57.
32. Лапушкин, М.Ю. Многолетний мониторинг трансформации и миграции полихлорированных бифенилов на загрязненном участке в г. Серпухове Московской области / М.Ю. Лапушкин, Н.Н. Лукьянова, Г.К. Васильева // Использование и охрана природных ресурсов в России. – 2020. – № 4(164). – С. 75–80.
33. Максимов, А.Ю. Имобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber gtl*, обладающего нитрилгидратазной активностью. / А.Ю. Максимов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – № 43(2). – С. 193–198.

34. Максимова, Ю.Г. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованных на волокнистых углеродных адсорбентах. / Ю.Г. Максимова [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 51–58.
35. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. М.: Мир. – 1984. – 390 с.
36. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. 14-е изд. в 2-х т. / М.Д. Машковский. – М.: ООО Изд. «Новая волна», ЗАО «Издательский дом Оникс». – 2000. – 1148 с.
37. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. – 2004. – 74 с.
38. Методы общей бактериологии: Пер. с англ.; под ред. Ф. Герхардт и др. М.: Мир. – 1983. – Том 1, 2, 3.
39. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Звягинцева Д. Г. – М.: Изд-во МГУ. – 1991. – 304 с.
40. Назаров, А.В. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами / А.В. Назаров [и др.] // Экология человека. – 2016. – № 3. – С. 3–8.
41. Первова, М.Г. Исследование конгенов полихлорированных бифенилов в технической смеси «Трихлорбифенил» / М.Г. Первова [и др.] // Журнал общей химии. – 2015. – Т. 85, № 8. – С. 1374–1379. DOI: 10.1134/S1070363215080216.
42. Питерских, И.А. Разработка государственного стандартного образца состава раствора Совола / И.А. Питерских [и др.] // Завод. лаборатория. Диагностика материалов. – 2001. – Т. 67, № 8. – С. 63–66.

43. 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.
44. Плотникова, Е.Г. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. / Е.Г. Плотникова, Д.О. Рыбкина, В.А. Демаков // Патент на изобретение РФ №2262531, опубл. 20.10.2005. – 8 с.
45. Плотникова, К.А. Оптимизация химической стадии предподготовки технических полихлорбифенилов к уничтожению / К.А. Плотникова [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2017. – Т.476, № 1. – С. 45–50.
46. ПНД Ф 2.1:2.2:2.3.2-03. Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений. Москва, 2003, 12 с.
47. Пьянкова, А.А. Микробно-токсикологический анализ почвы, длительное время загрязненной хлорорганическими поллютантами / А.А. Пьянкова, Д.Н. Андреев, Д.О. Егорова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18), № 2(1). – С. 604–606.
48. Романов, В. П. Окислительное дегалогенирование 2-хлор- и 2,4-дихлорбензоатов штаммом *Pseudomonas aeruginosa* / В.П. Романов [и др.] // Микробиология. – 1993. – Т.62. – С. 887 — 895.
49. Российская Федерация. Законы. О ратификации Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях : федер.закон : [принят Гос. Думой 17 июля 2011 г.: одобр. Советом Федерации 22 июня 2011 г.]. – Российская Газета, 29 июня 2011. URL: <https://rg.ru/2011/06/29/konvenciya-dok.html> (дата обращения 20.10.2021).
50. Рыбкин, А.В. Оценка уровня загрязненности хлорорганическими соединениями крови мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) на территории крупного промышленного центра / А.В. Рыбкин, Д.О. Рыбкина // Поволжский экологический журнал. – 2006. – №1. – С. 51–60.

51. Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I – IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами» СП 1.2.1318-03. [URL:https://ohranatruda.ru/upload/iblock/824/4293820301.pdf](https://ohranatruda.ru/upload/iblock/824/4293820301.pdf). (дата обращения 23.12.2021).
52. СанПиН №4630-88 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) и ориентировочно допустимые уровни (ОДУ) вредных веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования» URL: <https://docs.cntd.ru/document/543557105>. (дата обращения 22.12.2021).
53. Сеницын, А.П. Имобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Сеницын [и др.] – М.: Изд-во МГУ. – 1994. – 288 с.
54. Соляникова, И.П. Диоксигеназы, индуцирующиеся при разложении бензоата деструкторами хлорбифенилов *Rhodococcus wratislaviensis* G10 и хлорфенолов *Rhodococcus opacus* 1CP, и гены, потенциально вовлеченные в этот процесс / И.П. Соляникова [и др.] // Биохимия. – 2016. – Т.81, № 9. – С. 1239–1253.
55. Суворова, М.М. Особенности орто-расщепления пирокатехина при разложении пара-толуата бактерией *Rhodococcus opacus* 1cp / М.М. Суворова, И.П. Соляникова, Л.А. Головлева // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 12. – С. 1618–1626.
56. Трегер, Ю. СОЗ – стойкие и очень опасные/ Ю. Трегер // The Chemical Journal. – 2013. – №1. – Р. 30–34.
57. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г №52-ФЗ с изменениями от 30.12.2001 г., 10.01. 2003 г., 30.06. 2003 г., 22.08.2004 г., 9.05.2005 г.

58. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: Медицина. – 2005. – 600 с.
59. 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.
60. 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.
61. Abramowicz, D.A. Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment / D.A. Abramowicz // Environmental health perspectives. – 1995. – V. 103, №. 5. – P. 97–99.
62. 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.
63. Adebusoye, S.A. Characterization of multiple novel aerobic polychlorinated biphenyl (PCB)-utilizing bacterial strains indigenous to contaminated tropical African soils / S.A. Adebusoye [et al.] // Biodegradation. – 2008. – V. 19, № 1. – P. 145–159.
64. Adebusoye, S.A. Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Ascarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems / S.A. Adebusoye [et al.] // Chemosphere. – 2008. – V. 73, № 1. – P. 126–132.
65. 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.

66. 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 [et al.]// *Chemosphere*. – 2008. – V. 70, №. 4. – P. 656–663.
67. Agulló, L. Genetics and Biochemistry of Biphenyl and PCB Biodegradation. In: Rojo F. (eds) *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*/ L. Agulló, D.H. Pieper, M. Seeger // Springer, Cham. – 2019. – P. 595–622.
68. Aken, B.V. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: new trends and promises / B.V. Aken, P.A. Correa, J.L. Schnoor // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – V. 44, № 8. – P. 2767–2776.
69. Alvarez, A. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals / A. Alvarez [et al.] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 166. – P. 41–62.
70. Ang, L.I. Isolation and characteristics of a novel biphenyl-degrading bacterial strain, *Dyella ginsengisoli* LA-4 / L.I. Ang [et al.] // *Journal of Environmental Sciences*. – 2009. – V. 21, №. 2. – P. 211–217.
71. Arensdorf, J.J. *Meta* cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166 / J. J. Arensdorf, D. D. Focht // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V.61. – P. 443–447.
72. 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. – P. 2884–2889.
73. Asturias, J.F. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases found in *Rhodococcus globerulus* P6: identification of a new family of extradiol dioxygenases / J.A. Asturias [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – V. 269. – P. 7807–7815.
74. 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.
75. 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.
76. Ausbel, F.M. Short protocols in molecular biology / F.M. Ausbel [et al.] // Third edition. N.Y.: John Wiley and Sons. – 1995. – P. 450
77. Avendaño-Herrera, R. Pseudo-membranes on internal organs associated with *Rhodococcus qingshengii* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) / R. Avendaño-Herrera [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2011. – V. 147, № 1–2. – P. 200–204
78. Baggi, G. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents / G. Baggi [et al.] // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2008. – V.62, № 1. – P. 57–64.
79. Baig, M.S. Homology modeling and docking studies of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl-2,3-dioxygenase involved in degradation of polychlorinated biphenyls / M.S. Baig, N. Manickam // International Journal of Biological Macromolecules. – 2010. – V.46. – P. 47–53.
80. Bako, C.M. Biodegradation of PCB congeners by *Paraburkholderia xenovorans* LB400 in presence and absence of sediment during lab bioreactor experiments / C.M. Bako [et al.] // Environmental Pollution. – 2021. – V. 271. – Article 116364.
81. Baldwin, B.R. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR / B.R. Baldwin, C.H. Nakatsu, L. Nies // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, № 6. – P. 3350–3358.
82. Barriault, D. Catalytic activity of *Pseudomonas putida* strain G7 naphthalene 1,2-dioxygenase on biphenyl / D. Barriault, M. Sylvestre // International Biodeterioration and Biodegradation. – 1999. – V. 44. – P. 33–37.

83. 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.
84. Barriault, D. Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms / D. Barriault, M. Sylvestre // *Can. J. Microbiol.* – 1993. – V. 54. – P. 594–595.
85. Becker, B. Rapid differentiation of between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates / B. Becker [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotech.* – 1964. – V.12. – P. 421–423.
86. Bedard, D.L // *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications* / D. L. Bedard, M.M. Haggblom, I.D. Bossert // The Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers. – 2003. – P. 443–465.
87. Bedard, D.L. Method for bioremediation PCBS / D.L. Bedard, M.J. Brennan // US Patent N4876201. – 1989.
88. Bedard, D.L. *Alcaligenes eutrophus* for biodegrading PCBS / D.L. Bedard, M.J. Brennan // US Patent N4843007. – 1989.
89. 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.
90. 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.
91. Benning M. M. Dunaway Mariano D., Holden H. M. The three-dimensional structure of 4-hydroxybensoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3 / M. M. Benning [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V.273. – P. 33572–33579.
92. Bhalla, R. Toxicity of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) using the bioluminescent assay Microtox. *Ecotoxicol* / R. Bhalla, R. Tehrani, B.

- Van Aken // 2016 – V. 25. – P. 1438–1444. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1693-z>
93. Bhatt, P. Plasmid-mediated catabolism for the removal of xenobiotics from the environment / P. Bhatt [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – V. 420. – Article 126618.
94. 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 [*et al.*] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282, №. 50. – P. 3637–36385.
95. Billingsley, K.A. Remediation of PCBs in soil by surfactant washing and biodegradation in the wash by *Pseudomonas* sp. LB400 / K.A. Billingsley [*et al.*] // *Biotechnol. Lett.* – 2002. – V. 24. – P. 1827–1832.
96. Blasco, R. From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway / R. Blasco [*et al.*] // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V.270. – P. 29229–29235.
97. Bokvajová, A. Screening and separation of microorganisms degrading PCBs / A. Bokvajová, J. Burkhard // *Environmental Health Perspectives Supplements*. – 1994. – V.102, № 2 – P. 552–559.
98. Bopp, L. Method for biodegrading PCBS / L. Boop // US Patent N 5009999. – 1991.
99. Bopp, L. *Pseudomonas putida* capable of degrading PCBS / L. Boop // US Patent N 4843009. – 27.06.1989.
100. Borja, J. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation / J. Borja [*et al.*] // *Proc. Biochem.* – 2005. – V. 40 – P. 1999–2013.
101. Briganti, F. XAS characterization of the active sites of novel intradiol ring-cleaving dioxygenases: hydroxyquinol and chlorocatechol dioxygenases / F. Briganti [*et al.*] // *FEBS Letters*. – 1998. – V.433. – P. 58–62.
102. Brown, J.F. PCB transformations in upper Hudson sediments / J.F. Brown [*et al.*] // *Northeastern Environmental Science*. – 1984. – V. 3. – P. 166–178.

103. Bruhlmann, F. Transformation of polychlorinated biphenyls by a novel BphA variant through the meta-cleavage pathway / F. Bruhlmann, W. Chen // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. – V.179. – P. 203–208.
104. Buckman, A.H. Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish / A.H. Buckman [et al.] // Aquatic Toxicol. – 2006. – V. 78. – № 2. – P. 176–185.
105. Camara, B. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway / B. Camara [et al.] // Environmental Microbiology. – 2004. – V. 6(8). – P. 842–850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00630.x>
106. 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.
107. Cervantes-González, E. Microbial diversity assessment of polychlorinated biphenyl-contaminated soils and the biostimulation and bioaugmentation processes / E. Cervantes-González [et al.] // Environmental monitoring and assessment. – 2019. – V. 191, №. 2. – doi: 10.1007/s10661-019-7227-4.
108. Chae, J.C. Genetic structure and functional implication of the *pcb* gene cluster for hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate from *Pseudomonas* sp. DJ-12 / J.C. Chae [et al.] // Gene. – 2000. – V. 258. – P. 109–116.
109. 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.
110. 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.
111. Chakraborty, J. Thermophilic bacteria are potential sources of novel Riske non-heme iron oxygenases / J. Chakraborty [et al.] // AMB Express. – 2017. – V. 7, №. 1. – doi: 10.1186/s13568-016-0318-5.

112. Chang, K. H. Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: A site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate: coenzyme A ligase / K. H. Chang, H. Xiang, D. Dunaway Mariano // *Biochemistry*. – 1997. – V.36. – P. 15650–15659.
113. 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. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0191-5>
114. 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 Announce*. – 2015. – V. 3, №. 3. – doi: 10.1128/genomeA.00439-15.
115. Chaudhry, G. R. Chapalamadugu S. Biodegradation of halogenated organic compounds / G. R Chaudhry // *Microbiological Reviews*. – 1991. – V.55. – P. 59–79.
116. Chebrou H. Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it / H. Chebrou // *J. Bacteriol.* – 1999. – V.181. – P. 4805–4811.
117. Cho Y.C. Kinetics of polychlorinated biphenyl dechlorination by Hudson River / Y.C. Cho, R.C. Sokol, G.Y. Rhee // *New York, USA, sediment microorganisms, Environ. Toxicol. Chem.* 21. – 2002. – P.715–719.
118. Chun, C.L. Electrical stimulation of microbial PCB degradation in sediment / C.L. Chun // *Water Res.* – 2013. – V.47. – P.141–152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.038>
119. 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.

120. Colbert, C.L. Structural characterization of *Pandoraea pnomenusa* 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.
121. Coleman, M.L. Ecosystem-specific selection pressures revealed through comparative population genomics / M.L. Coleman, S.W. Chisholm // USA: *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V. 107. – P. 18634–18639 doi:10.1073/pnas.1009480107.
122. Commandeur, L.C.M. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes* sp. JB1: metabolites and enzymes / L.C.M. Commandeur [et al.] // *Biodegradation*. – 1996. – V. 7, № 6. – P.435–443.
123. Copley, S. D. Enzymic dehalogenation of 4-chlorobenzoil coenzyme A in *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1 / S. D. Copley, G. P. Crooks // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58 – P. 1385–1387.
124. Correa, P.A. The effects of individual PCB congeners on the soil bacterial community structure and the abundance of biphenyl dioxygenase genes / P.A. Correa // *Environ Int.* 36. – 2010 – P. 901–906
125. Cuello, O.H. *Rhodococcus globerulus* keratitis after laser in situ keratomileusis / O.H. Cuello [et al.] // *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. – 2002. – V. 28, № 12. – P. 2235–2237.
126. D'Argenio, D.A. Substitution, insertion, deletion, suppression, and altered substrate specificity in functional protocatechuate 3,4-dioxygenases / D.A. D'Argenio [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1999. – V. 181. – P. 6478–6487.
127. 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.
128. Denef, V. J. Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. / V.J. Denef // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 585–595.

129. Dennis, J.J. The evolution of IncP catabolic plasmids / J.J. Dennis // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2005. – V.16. – P. 291–298.
130. Devi, N.L. Persistent Organic Pollutants (POPs): Environmental risks, toxicological effects, and bioremediation for Environmental Safety and Challenges for Future Research. In: Saxena G., Bharagava R. (eds) *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety.* – 2020. – Springer, Singapore. – P. 53–76. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_4
131. DeWeerd, K. A. Microbial dichlorination of polychlorinated biphenyl compounds / K.A. DeWeerd, D.L. Bedard // US Patent N5484729. – 1996.
132. 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.
133. Di Gioia, D. Structures of homologous composite transposons carrying *cbaABC* genes from Europe and North America / D. Di Gioia [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V.64. – P. 1940–1946.
134. Di Torro, S. Intensification of the aerobic bioremediation of an actual site soil historically contaminated by polychlorinated biphenyls (PCBs) through bioaugmentation with a non-acclimated, complex source of microorganisms / S. Di Torro, G. Zanaroli, F. Fava // *Microb. Cell Fact.* 5 – 2006. – P. 11–19
135. Directive 2000/54/EC in the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. *Official Journal of the European Communities.* – V. 262. – P. 21–33
136. Don, R. H. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus* / R. H. Don, J. M. Pemberton // *J. Bacteriol.* – 1981. – V.145. – P. 681–686.
137. 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.

138. Dunning Hotopp, J.C. Horizontal gene transfer between bacterial and animals / J.C. Dunning Hotopp // Trends Genet. – 2011. – V.27(4). – P.157–163. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.005.
139. Egorova, D.O. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains / D.O. Egorova [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2020. – V. 400. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123328>
140. 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. – P. 183 – 199.
141. Egorova, D.O. Carcinogenic and teratogenic status of human population and polychlorinated biphenyls contaminations of soils and biota (European pied flycatcher) in a Perm (Western Ural, Russia) / D.O. Egorova, S.A. Buzmakov // Environmental Geochemistry and Health. – 2020. – V. 42. – P. 4299 – 4311.
142. Elangovan, S. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Fate, Challenges and Bioremediation / S. Elangovan [et al.] // Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. – 2019. – P. 165–188.
143. Erickson, B.D. Application of polychlorinated biphenyls / B.D. Erickson, R.G. Kaley II // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2011. – V. 18. – P. 135–151.
144. 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.
145. Ewald, J.M. Growth of *Dehalococcoides* spp. and increased abundance of reductive dehalogenase genes in anaerobic PCB-contaminated sediment microcosms / J.M. Ewald [et al.] // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2020. – V.27. – P. 8846–8858. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05571-7>.
146. Fantroussi, S. Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested-PCR monitoring / S. Fantroussi [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V.63. – P. 806–811.

147. Fava, F. Degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls by a three-membered bacterial co-culture / F. Fava [*et al.*] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1994. – V.41. – P. 117–123.
148. Fava, F. Role of the reactor configuration in the biological detoxification of a damp site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab-scale slurry phase conditions / F. Fava, D. Di Gioia, L. Marchetti // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V.53. – P. 243–248.
149. Fava, F. Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed batch bioreactors / F. Fava [*et al.*] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – V.45. – P. 562–568.
150. Fedi, S. Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site/ S. Fedi [*et al.*] // *Res. Microbiol.* – 2001. – V. 152. – P. 583–592.
151. 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.
152. Fetzner S. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications / S. Fetzner, F. Lingens // *Microbiological Reviews.* – 1994. – V.58. – P. 641–685.
153. Fetzner, S. Bacterial dehalogenation / S. Fetzner // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – V.50. – P. 633–657.
154. Field J.A. Microbial transformation of chlorinated benzoates / J.A. Field, R. Sierra-Alvarez // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* – 2008. – V. 7. – P. 191–210.
155. 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.
156. Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm, 22-23 May // UNEP / POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme. Geneva. – 2001. – 44 p.

157. Fortin, P.D. Directed evolution of a ring-cleaving dioxygenase for polychlorinated biphenyl degradation / P.D. Fortin [*et al.*] // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280, № 51. – P. 42307–42314.
158. Fortin, P.D. Evolutionary divergent extradiol dioxygenases possess higher specificities for polychlorinated biphenyl metabolites / P.D. Fortin [*et al.*] // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187, № 2. – P. 415–421.
159. Frame, G.M. A collaborative study of 209 PCB congeners and Aroclors on 20 different HRGC columns. Retention and coelution database / G.M. Frame // Fresenius J. Anal. Chem. – 1997. – V. 357, № 6. – P. 714–722.
160. Francisco JR, P.B. The chlorobenzoate dioxygenase genes of *Burkholderia* sp. Strain NK8 involved in the catabolism of chlorobenzoates / P.B. Francisco Jr [*et al.*] // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 121–133.
161. FranckMokross, A. C. Simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted aromatic compounds: competition between *Pseudomonas* strains using the *ortho* and *meta* pathway or the *ortho* pathway exclusively / A.C. FranckMokross, E. Schmidt // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V.50. – P. 233–240.
162. Francova, K. Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from *Burkholderia* sp. LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356 to catalyze oxygenation of ortho-hydroxychlorobiphenyls formed from PCBs by plants / K. Francova [*et al.*] // Environmental Pollution. – 2004. – V. 127. – P. 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00257-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00257-4).
163. Friemann, R. Structures of the multicomponent Riske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system / R. Friemann [*et al.*] // Acta Crystallographica sect D. – 2009. – V. 65. – P. 24–33.
164. Fukuda, K. Complete genome sequence of polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 (NBRC 109938) / K. Fukuda [*et al.*] // Genome Announce. – 2014. – V. 2, № 5. – doi: 10.1128/genomeA.00865-14.
165. Fukuda, M. *Rhodococcus* Multiple-Enzyme and Parallel-Degradation System for Aromatic Compounds. In: Nojiri H., Tsuda M., Fukuda M.,

- Kamagata Y. (eds) Biodegradative Bacteria. Springer, Tokyo. – 2014. – P.3–18. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54520-0_1
166. 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.
167. 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.
168. Furukawa, K. Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features/ K. Furukawa, , Fujihara, // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – V.105. – P. 433–449. doi: 10.1263/jbb.105.433.
169. Furusawa, Y. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / Y. Furusawa [et al.] // J. Mol. Biol. – 2004. – V.342. – P.1041–1052.
170. García, M.T. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria / M.T. García, A. Ventosa, E. Mellado // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 54, № 1. – P. 97–109.
171. Gartemann, K.H. Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1, and development of a system for transposon mutagenesis / K.H. Gartemann, R. Eichenlaub // J. Bacteriol. – 2001. – V.183. – P. 3729–3736.
172. Gascher, J. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii* / J. Gascher [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. – V.184. – P. 6301–6315.
173. Genthner, B. R. Reduction of 3-chlorobenzoate, 3-bromobenzoate, and benzoate to corresponding alcohols by *Desulfomicrobium escambiense*, isolated from a 3-chlorobenzoate-dechlorinating coculture / B. R. Genthner, G. T. Townsend, B. O. Blattmann // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V.63. – P. 4698–4703.

174. Ghosal, D. Gene duplication in haloaromatic degradative plasmids pJP4 and pJP2 / D. Ghosal, You. In-Soon // *Can. J. Microbiol.* – 1988. – V. 34. – P. 709–715.
175. Gibson, D.T. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology / D.T. Gibson, R.E. Parales // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – V. 11. – P. 236–243.
176. 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. doi: 10.1007/s11356-013-1739-1
177. 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.
178. 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.
179. Goodfellow, M. *Chemical Methods in Bacterial Systematic* / M. Goodfellow, D.E. Minnikin. – London: Academic Press. – 1985. – 412 p.
180. Gorbunova, T.I. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus*-strains / T.I. Gorbunova [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials.* – 2021. – V. 409. – 124471. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124471>
181. 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.
182. Goto, E. Metabolic enhancement of 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118) using cytochrome P450 monooxygenase isolated from soil bacterium under the presence of perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and the structural basis

- of its metabolism / E. Goto [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2018. – V.210. – P. 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.026>.
183. Haak, B. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the plasmid-encoded genes for the two-component 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* 2CBS / B. Haak, S. Fetzner, F. Lingens // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – V. 177, № 3. – P. 667–675.
184. Haddad, S. Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070 / S. Haddad, D.M. Eby, E.L. Neidle // *Applied Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 67. – P. 2507–2514.
185. Haggblom, M. M. Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by α denitrifying bacterium / M. M. Haggblom, L.Y. Young // *Archives of Microbiology*. – 1999. – V.171. – P. 230–236.
186. Haggblom, M. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds / M. Haggblom // *J. Basic Microbiol.* – 1990. – V. 2. – P. 115–141.
187. Hall, J. A. Variation in stable carbon isotope fraction during aerobic degradation of phenol and benzoate by contaminant degrading bacteria / J. A. Hall [*et al.*] // *Organic Geochemistry*. – 1999. – V. 30. – P. 801–811.
188. Hartnet, C. DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and of DNA sequences withing genes during their evolutionary divergence / C. Hartnet [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 1990. – V.172. – P. 956–966.
189. 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.
190. Hauser, R. Predictors of serum dioxin levels among adolescent boys in Chapaevsk, Russia: A cross-sectional pilot study / R. Hauser [*et al.*] // *Environmental Health*. – 2005. – V. 4. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-8>

191. Hernandez, B. S. Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil / B. S. Hernandez [et al.] // *Biodegradation*. – 1997. – V. 8, № 3. – P. 153–158.
192. Hickey, W. J. Cloning, nucleotide sequencing, and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2 / W. J. Hickey [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 4603–4609.
193. Hickey, W. J. Integration of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and molecular cloning for the identification and functional characterization of mobile *ortho*-halobenzoate oxygenase genes in *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2 / W. J. Hickey, G. Sabat // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V.67. – P. 5648–5655.
194. 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.
195. Hirose, J. Draft genome sequence of the polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Comamonas testosteroni* KF712 (NBRC 110673) / J. Hirose [et al.] // *Genome Announce*. – 2015. – V. 3, №. 5. – doi: 10.1128/genomeA.01214-15.
196. Holoman, T. R. P. Characterization of defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-*ortho*-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA / T. R. P. Holoman [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V.64. – P. 3359–3367.
197. 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.
198. 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 // *Microb. Ecol.* – 2016. – V.72 – P. 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0812-y>

199. Horv'athov'a, H. 2018. Bioremediation of PCB-contaminated shallow river sediments: the efficacy of biodegradation using individual bacterial strains and their consortia / H. Horv'athov'a, K. L'aszlov'a, K. Dercov'a // *Chemosphere*. – V.193. – P. 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.012>.
200. 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.
201. Hrywna, Y. Construction and characterization of recombinant bacteria that grow on ortho- and para-substituted chlorophenyls / Y. Hrywna [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 72. – P. 2476–2482.
202. 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
203. 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
204. Huang, S. Contrasting dynamics of polychlorinated biphenyl dissipation and fungal community composition in low and high organic carbon soils with biochar amendment / S. Huang [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – V. 25. – P. 33432–33442.
205. Huang, Y. Genetic and biochemical characterization of a 4-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum* / Y. Huang [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 78. – P. 75–83.
206. Hurtubise, Y. Characterization of active recombinant his-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase / Y. Hurtubise, D. Barriault, M. Sylvestre // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V.271. – P. 8152–8156.

207. Hurtubise, Y. Involvement of the terminal oxygenase β -subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyl / Y. Hurtubise, D. Barriault, M. Sylvestre // *J. Bacteriol.* – 1998. – V.180. – P. 5828–5835.
208. Ilori, M.O. Aerobic mineralization of 4,4'-dichlorobiphenyl and 4-chlorobenzoic acid by a novel natural bacterial strain that grows poorly on benzoate and biphenyl / M.O. Ilori, G.K. Robinson, S.A. Adebusoye // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 24. – P. 1259–1265. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9597-y>
209. 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.
210. 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.
211. Imbeault, N. Y. R. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase / N. Y. R. Imbeault [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 12430–12437.
212. Ines, P. Unraveling metabolic flexibility of rhodococci in PCB transformation / P. Ines // *Chemosphere.* – 2021. – V. 282. – Article 130975.
213. Iwai, S. Comparison of the specificities and efficacies of primers for aromatic dioxygenase gene analysis of environmental samples / S. Iwai [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P.3551–3557.
214. Iwai, S. Development of an oligonucleotide microarray to detect di- and monooxygenase genes for benzene degradation in soil / S. Iwai [et al.] // *FEMS Microbiology Letters.* – 2008. – V. 285(1). – P. 111–121.
215. Iwasaki, T. Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl

- degradation in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 / T. Iwasaki [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – P. 5396–5402.
216. Jadan, A.P. Biocatalytic potential of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase from *Rhodococcus rhodnii* 135 and *Rhodococcus opacus* 557 / A.P. Jadan [et al.] // *Add. Synth. Catal.* – 2004. – V. 346. – P. 367–375.
217. 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.
218. Jia, Y. Identification and characterization of a meta-cleavage product hydrolase involved in biphenyl degradation from *Arthrobacter* sp. YC-RL1 / Y. Jia [et al.] // *Appl. Microb. Biotech.* – 2019. – V. 103. – P. 6825–6836. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09956-z>
219. Jones, A.L. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil / A.L. Jones [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2004. – V. 54, № 2. – P. 407–411
220. Jouanneau, Y. Ring-hydroxylating dioxygenases involved in PAH biodegradation: structure, function, biodiversity / Y. Jouanneau [et al.] // *Microbial bioremediation of non-metals: current research*. – Caiser Academic Press. Norfolk. UK. – 2011. – P. 149–175.
221. 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.
222. Kahlon, R.S. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology* / R.S. Kahlon // Springer International Publishing Switzerland. – 2016. – P. 519. doi: 10.1007/978-3-319-31198-2_4
223. Kanteev, M. A crystal structure of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with bound substrate provides insights into the enzymatic mechanism / M. Kanteev [et al.] // *Biochem. Biophys. Acta*. – 2015. – V. 1854. – P. 1906–1913. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.002>

224. Kasai, Y. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. Strain A5 / Y. Kasai [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69, № 11. – P. 6688–6697.
225. Kaschabek, S. R. Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate: succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase / S. R. Kaschabek [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. – V.184. – P. 207–215.
226. Keil H. Degradation of 4-chlorobenzoate by *Pseudomonas* sp. CBP3: induction of catabolic enzymes / H. Keil, U. Klages, F. Lingens // FEMS Microbiol. Lett. – 1981. – V.10. – P. 213–215.
227. 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 [et al.] // Microbiology. – 1996.– V. 142. – P. 3241–3251.
228. Khan, A.A. Nucleotide sequence of the gene encoding cis-biphenyl dihydrodiol dehydrogenase (*bphB*) and the expression of an active recombinant His-tagged *bphB* gene product from a PCB degrading bacterium, *Pseudomonas putida* OU83 / A.A. Khan [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V.154. – P. 317-324.
229. 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.
230. Kim, A.A. Investigation of PCBs biodegradation by soil bacteria using tritium-labeled PCBs. / A.A. Kim [et al.] // Nuclear Chemistry. – 2004. – V. 259(2). – P. 301–304.
231. 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.

232. 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.
233. Kimura, N. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally / N. Kimura [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 1997. – V.179. – P. 3936–3943.
234. Kimura, N. *Pseudomonas furukawii* 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.
235. Kitagawa, W. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / W. Kitagawa [*et al.*] // *Journal of Bacteriology.* – 2001. – V. 183 (22). – P.6598–6606.
236. Kobayashi, K. Hydrolytic dehalogenation of 4-chlorobenzoic acid by an *Acinetobacter* sp / K. Kobayashi, K. Hirayama, S. Tobita // *General and Applied Microbiology.* – 1997. – V. 43. – P. 105–108.
237. Kohler, H.-E. P. Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells / H.-E. P. Kohler, D. Kohler-Staub, D.D. Focht // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – V. 54. – P. 1940–1945.
238. Köhler, K.A.K. Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. Strain VLB120 a solvent tolerant, styrene degrading bacterium, isolated from forest soil / K.A.K. Köhler [*et al.*] // *Journal of Biotechnology.* – 2013. – V. 168. – P. 729– 730. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.10.016.
239. Kolar, A.B. PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments / A.B. Kolar [*et al.*] // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 2007. – V. 60. – P. 16–24. <https://doi.org/10.16/j.ibiod.2006.11.004>

240. Kong, C. Genome sequence of *Dyella ginsengisoli* strain LA-4, an efficient degrader of aromatic compounds / C. Kong [et al.] // Genome Announce. – 2013. – V. 1, № 6. doi: :10.1128/genomeA.00961-13.
241. Konig, C. A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP / C. Konig [et al.] // Microbiology. – 2004. – V. 150. – P. 3075–3087.
242. 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.
243. 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.
244. Krasotkina, J. Characterization of the B₁₂- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* / J. Krasotkina [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – V.44. – Article 40991.
245. Kuang, S. Quantitative proteomic analysis of *Rhodococcus ruber* responsive to organic solvents / S. Kuang, X. Fan, R. Peng // Biotechnology and Biotechnological Equipment. – 2008. – V. 32(6). – P. 1418–1430.
246. 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.
247. Kwon, S.-H. Bioremediation of Aroclor 1242 by a consortium culture in marine sediment microcosm / S.-H. Kwon [et al.] // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2008. – V. 13. – P. 730–737.
248. Labbe, D. Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulation from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5 / D. Labbe, J. Garnon, P. C. K. Lau // J. Bacteriol. – 1997. – V.179. – P. 2772–2776.

249. 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.
250. Lászlóvá, K. The application of Biosurfactants in Bioremediation of the Aged Sediment contaminated with polychlorinated biphenyls / K. Lászlóvá [et al.] // *Water, Air, Soil Pollution*. – 2018. – V. 229. – Article 219.
251. Leammli C. M., one of the two chloromuconate cycloisomerases of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), cannot efficiently convert 2-chloro-cis,cis-muconate to trans-dienlactone to allow growth on 3-chlorobenzoate / C. M. Leammli [et al.] // *Archives of Microbiology* – 2002. – V. 178. – P. 13–25.
252. Lehtinen, T. Bioremediation trial on aged PCB-polluted soils—a bench study in Iceland / T. Lehtinen [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21. – 2014. – P. 1759–1768. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2069-z>.
253. Li, C. Photochemical formation of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) from decachlorobiphenyl (PCB-209) on solids/air interface / C. Li [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2019. – V. 378. – Article 120758 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120758>
254. Li, D. Genom-wide investigation and functional characterization of the β -keto adipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 / D. Li [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2010. – V. 10. – Article 36. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/36>
255. Li, Q. New metabolites in dibenzofuran cometabolic degradation by a biphenyl-cultivated *Pseudomonas putida* Strain B6-2 / Q. Li [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43, № 22. – P. 8635–8642.
256. Liang, B. Horizontal transfer of dehalogenase genes involved in the catalysis of chlorinated compounds: evidence and ecological role / B. Liang [et al.] // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2012. – V. 38. – P. 95–110.
257. Liang, Y. Potential for polychlorinated biphenyl biodegradation in sediments from Indiana Harbor and Ship Canal / Y. Liang [et al.] // *International biodeterioration & biodegradation*. – 2014. – V. 89. – P. 50–57.

258. Löffler, F. Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: an ATP/coenzyme A dependent reaction / F. Löffler, R. Müller, Lingens F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – V. 176. – P. 1106–1111.
259. Löffler, F. Identification of 4-chlorobenzoyl-coenzyme A as intermediate in the dehalogenation catalyzed by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3 / F. Löffler, R. Müller // *FEBS Lett.* – 1991. – V. 290. – P. 224–226.
260. Löffler, F.E. Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications / F.E. Löffler [*et al.*] // Ed. By M.M. Häggblom and I.D. Bossert. – 2003. – P. 53–87.
261. Luo, A. Characterization of a cytochrome P450 monooxygenase capable of high molecular weight PAHs oxidization from *Rhodococcus* sp. P14 / A. Luo [*et al.*] // *Process Biochemistry.* – 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.024>.
262. Mackova, M. Biotransformation of PCBs by plant and bacteria – consequences of plant-microbe interactions / M. Mackova [*et al.*] // *European Journal Soil Biology.* – 2007. – V. 43. – P. 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.02.006>
263. Maiorova, A.V. Optimization of the reaction of polychlorobiphenyls with a binucleophile by thermodynamic modeling / A.V. Maiorova [*et al.*] // *Russ. J. Appl. Chem.* – 2017. – V.90. – P. 915–922. doi:10.1134/S107042721706012X.
264. 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.
265. Margesin, R. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments / R. Margesin, F. Schinner // *Applied Microbiology Biotechnology.* – 2001. – V. 56. – P. 650–663 DOI:10.1007/s002530100701
266. Marko, M. A. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder / M. A.

- Marko, R. Chipperfield, H. C. Birnboim // *Analyt. Biochem.* – 1982. – V.121. – P. 382.
267. 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.
268. Masai, E. The *bphDEF* meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E. Masai [*et al.*] // *Gene.* – 1997. – V.187, №1. – P. 141–149.
269. Masuda, Y. Health effect of polychlorinated biphenyls and related compounds. / Y. Masuda // *Int. J. Health Sci.* – 2003. – V. 49. – P. 333–336.
270. Matturo, B Polychlorinated biphenyl (PCB) anaerobic degradation in marine sediments: microcosm study and role of autochthonous microbial communities / R. Matturo [*et al.*] // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2016. – V. 23. – P. 12613–12623. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.12.004>.
271. McKay, D.B. Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the gene products / D.B. McKay [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – P. 1924–1930.
272. 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.
273. Mercier, A. Biofilm formation vs. PCB adsorption on granular activated carbon in PCB-contaminated aquatic sediment. / A. Mercier [*et al.*] // *J. Soils Sediments.* – 2013. – V. 13. – P. 793–800.
274. Merlin, C. *Tn4371*: a modular structure encoding a phage-like integrase, a *Pseudomonas*-like catabolic pathway, and RP4/Ti-like transfer functions / C. Merlin, D. Springael, A. Toussaint // *Plasmid.* – 1999. – V. 41. – P. 40-54.
275. Mesarch, M.B. Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR / M.B.

- Mesarch, C.H. Nakatsu, L. Nies // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, № 2. – P. 678–683.
276. 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 [*et al.*] // *Marine pollution bulletin.* – 2007. – V. 54, № 11. – P. 1754–1761.
277. Mills III, S.A. A summary of the 209 PCB congener nomenclature. / S.A. Mills III, D.I. Thal, J. Barney // *Chemosphere.* – 2007. – V. 68. – P. 1603–1612. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.03.052.
278. Mizukami-Murata, S. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil / S. Mizukami-Murata [*et al.*] // *Chemosphere.* – 2016. – V. 165. – P. 173–182.
279. Mohn, W.W. Microbial reductive dehalogenation / W.W. Mohn, J.M. Tiedje // *Microbiological Reviews.* – 1992. – V.56. – P. 482–507.
280. Moiseeva, O.V. A new modified *ortho* cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: genetics and biochemical evidence / O.V. Moiseeva [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 2002. – V.184. – P. 5282–5292.
281. 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.
282. Mondello, F.J. Identification and modification of dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation / F.J. Mondello [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 3096–3103.
283. 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.
284. Mukerjee-Dhar, G. Analysis of changes in congener selectivity during PCB degradation by *Burkholderia* sp. strain TSN101 with increasing concentrations

- of PCB and characterization of the *bphBCD* genes and gene products / G. Mukerjee-Dhar [*et al.*] // Archives in Microbiology. – 1998. – V. 169. – P. 61–70.
285. 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 (UK). – 2005. – V. 151. – P. 4139–4151.
286. 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.
287. Muller, R. Enzymatic dehalogenation of 4-chlorobenzoate by extracts from *Arthrobacter* sp. SU DSH 20407 / R. Muller, R.H. Oltmanns, F. Lingens // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. – 1988. – V. 369. – P. 567–571.
288. Muller, R. Incorporation of [¹⁸O] water into 4-hydroxybenzoic acid in the reaction of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3 / R. Muller [*et al.*] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 124. – P. 178–182.
289. Murinová, S. Potential Use of newly isolated bacterial strain *Ochrobactrum anthropi* in bioremediation of polychlorinated biphenyls. / S. Murinová, K. Dercová // Water, Air, & Soil Pollution. – 2014. – V. 225. – Article 1980. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-1980-3>
290. Murinová, S. Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment. / S. Murinová, K. Dercová, H. Dudášová // Int. Biodeter. Biodegrad. – 2014. – V. 91. – P. 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.011>
291. 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.

292. Na, K.S. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains / K.S Na [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2005. – V. 99, № 4. – P. 378–382.
293. Nagata, Y. Complete genome sequence of the representative γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26 / Y. Nagata [et al.] // J. Bacteriol. – 2010. – V. 192. – P. 5852–5853.
294. 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 [et al.] // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2014. – V. 93, № 1. – P. 89–94. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1286-6>
295. Nam, J.-W. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations / J.-W. Nam [et al.] // Bioscience Biotechnology Biochemistry. – 2001. – V. 65. – P. 254–263.
296. Nandhagopal, N. Crystal structure of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. strain RHA1 of the PCB degradation pathway / Nandhagopal N. [et al.] // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 309. – P. 1139–1151.
297. Natarajan, M.R. Degradation of biphenyl by methanogenic microbial consortium / M.R. Natarajan [et al.] // Biotechnol. Lett. – 1999. – V. 21. – P. 741–745.
298. Natarajan, M.R. Dechlorination of polychlorinated biphenyl congeners by an anaerobic microbial consortium / Natarajan M.R. [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 46. – P. 673–677.
299. Negret-Bolagay, D. Persistent organic pollutants: the trade-off between potential risks and sustainable remediation methods. / D. Negret-Bolagay [et al.] // Journal of environmental Management. – 2021. – V. 300. – Article 113737. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113737>.
300. Nishi, A. A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715 / A. Nishi, K. Tominaga, K. Furukawa // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 1949–1955.

301. Noda, Y. Molecular cloning of the protocatechuate 4,4- dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. / Y. Noda [et al.] // J Bacteriol. – 1990. – V. 172. – P. 2704–2709
302. Nogales, B. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil / B. Nogales [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – P. 1874–1884.
303. 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.
304. 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.
305. 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.
306. Ono, K. Purification and some properties of protocatechuate 4,5-dioxygenase / K. Ono, M. Nozaki, O. Hayashi // Biochem Biophys Acta. – 1970. – V. 220, №2. – P. 224–238
307. Ornston, L.N. Properties of an inducible uptake system for β -ketoadipate in *Pseudomonas putida* / L.N. Ornston, D. Parke // J. Bacteriol. – 1976. – V. 125. – P. 475–488.
308. Ouyang, X. Enhanced bioremediation of 2,3',4,4',5-prntachlorobiphenyl by consortium GYB1 immobilized on sodium alginate-biochar / X. Ouyang [et al.] // Science of the Total Environment. – 2021. – V. 788. – Article 147774.
309. Overhage, J.A. Molecular characterization of the genes *pcaG* and *pcaH*, encoding protocatechuate 3,4-dioxygenase, which are essential for vanillin catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR 199. / J.A. Overhage [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 951–960.

310. 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.
311. Parales, R.E. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases / R.E. Parales, S.M. Resnic // In: Ramos J.L., Levesque R.C. (eds) *Pseudomonas*. – 2006. – Springer. Boston, MA. – P. 287–340.
312. Park, S.H. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks / S.H. Park, K.H. Oh, C.K. Kim // *Curr. Microbiol.* – 2001. – V. 43, № 3. – P. 176–181.
313. Passatore, L. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives / L. Passatore [*et al.*] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2014. – V. 278. – P. 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
314. Patureau, D. Impact of anaerobic and aerobic processes on polychlorobiphenyl removal in contaminated sewage sludge, / D. Patureau, E. Trably // *Biodegradation*. – 2006. – V. 17. – P. 9–17.
315. Paul, C.E. Flavoprotein monooxygenase: Versatile biocatalysts. / C.E. Paul [*et al.*] // *Biotechnol. Adv.* – 2021. – Adv. 107712. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107712>.
316. Petrič, I. Enrichment and characterization of PCB-degrading bacteria as potential seed cultures for bioremediation of contaminated soil / I. Petrič [*et al.*] // *Food Technol. Biotechnol.* – 2007. – V. 45, № 1. – P. 11–20.
317. 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.
318. Pieper, D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls / D.H. Pieper // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2005. – V. 67, № 2. – P. 170–191. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1810-4>

319. 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.
320. Plaku-Alakbarova, B. Peripubertal serum levels of dioxins, furans and PCBs in a cohort of Russian boys: can empirical grouping methods yield meaningful exposure variables? / B. Plaku-Alakbarova [et al.] // *Chemosphere*. – 2021. – V. 275. – Article 130027.
321. Polz, M.F. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. / M.F. Polz, E.J. Alm, W.P. Hanage // *Trends Genet.* – 2013. – V. 29. – P. 170–175. doi: 10.1016/j.tig.2012.12.006.
322. Ponce, B.L. Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400 / B.L. Ponce [et al.] // *Enzyme and microbial technology*. – 2011. – V. 49, № 6-7. – P. 509–516.
323. Potrawfke, T. Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71 / T. Potrawfke, J. Armengaud, R.-M. Wittich // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 183. – P. 997–1011.
324. Priefert, H. Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygenase of *Rhodococcus* sp. I24 / H. Priefert [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – V. 65, № 2. – P. 168–176.
325. Providenti, M.A. Identification and functional characterization of CbaR, a MarR-like modulator of the *cbaABC*-encoded chlorobenzoate catabolism pathway / M.A. Providenti, R.C. Wyndham // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 3530–3541.
326. Quensen, J.F. Dechlorination of 4 commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments / J.F. Quensen, S.A. Boyd, J.M. Tiedje // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56. – P. 2360–2369.

327. Radarie, D. Genetic and biochemical characterization of the Biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain B4 / D. Radarie, Y. Jouanneau // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 11 (5). – P. 763–771.
328. Radice, F. Cloning of the *Arthrobacter* sp. FG1 dehalogenase genes and construction of hybrid pathways in *Pseudomonas putida* strains / F. Radice [*et al.*] // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2007. – V. 75. – P. 1111–1118.
329. Raymond, R.L. Microbial Oxidation of n-Paraffinic Hydrocarbons / R.L. Raymond // *Development of Industrial Microbiology.* – 1961. – V. 2, № 1. – P. 23–32.
330. Reddy, A.V.B. Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis. / A.V.B. Reddy, M. Moniruzzaman, T.M. Aminabhavi // *Chemical Engineering Journal.* – 2019. – V. 358. – P. 1186–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.205>
331. Reineke, W. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly / W. Reineke // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1998. – V. 52. – P. 287–331.
332. Reineke, W. Microbial degradation of haloaromatics / W. Reineke // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1988. – V. 42. – P. 263–287.
333. Rezek, J. Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade *Solanum nigrum* SNC-90 / J. Rezek [*et al.*] // *Chemosphere.* – 2007 – V. 69, № 8. – P. 1221–1227
334. 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.
335. Rodarie, D. Genetic and Biochemical Characterization of the Biphenyl Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. B4 / D. Rodarie, Y. Jouanneau // *Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 2001. – V. 11, № 5. – P. 763–771.

336. Rodrigues, J.L.M. Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400 (*ohb*) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1 (*fcb*), / J.L.M. Rodrigues [*et al.*] // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V.72. – P. 2476–2482.
337. Rojas-Avelizapa, N.G. Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactants on polychlorinated biphenyl biodegradation / N.G. Rojas-Avelizapa [*et al.*] // World J. Microb. Biot. – 2000. – V. 16. – P. 319–324.
338. Romanov, V. NADPH-dependent reductive *ortho* dehalogenation of 2,4-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepedonicum* KZ-4 and coryneform bacterium strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A / V. Romanov, R.P. Hausinger // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178. – P. 2656–2661.
339. Romanov, V. *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component *ortho*-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate / V. Romanov, R.P. Hausinger // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176. – P. 3368–3374.
340. Romine, M.F. Complete sequence of a 184- kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. / M.F. Romine [*et al.*] // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181. – P. 1585–1602.
341. 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 [*et al.*] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 87. – P. 1543–1554.
342. 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.
343. Schmitz, A. Sequence Analysis of Genes for Dehalogenation of 4-Chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. Strain SU / A. Schmitz [*et al.*] // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58, № 12. – P. 4068–4071

344. Seah, S. Y. K. Comparative specificities of two evolutionarily divergent hydrolases involved in microbial degradation of polychlorinated biphenyls / S. Y. K. Seah [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – P. 1511–1516.
345. Seah, S. Y. K. Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls / S. Y. K. Seah [*et al.*] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – V. 275. – P. 15701–15708.
346. Seah, S.Y.K. Purification and preliminary characterization of a serine hydrolase involved in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls / S.Y.K. Seah [*et al.*] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1998. – V. 273. – P. 22943–22949.
347. Seeger, M. PCB-degrading recombinant bacterium, product for the bioremediation and method of bioremediation / M. Seeger, J.M.S. Salinas, F.A. Canala-Echevarria // US Patent N7989194 B2. – 02.08.2011
348. Seeger, M. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the *bph*-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400 / M. Seeger [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65, № 8. – P. 3614–3621.
349. Senda, T. Three-dimensional structures of free form and two substrate complexes of an extradiol ring-cleavage type dioxygenase, the BphC enzyme from *Pseudomonas* sp. strain KKS102 / T. Senda [*et al.*] // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 255. – P. 735–752.
350. 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 [*et al.*] // *Environmental Health.* – 2014. – V. 13, № 1. doi: 10.1186/1476-069x-13-114.
351. 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.

352. Shah, V. Taxonomic profiling and metagenome analysis of a microbial community from a habitat contaminated with industrial discharges. / V. Shah [et al.] // *Microbiol Ecology*. – 2013. – № 66. – P. 533–550. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0253-9>
353. 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.
354. Shimizu, S. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / S. Shimizu [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67, № 5. – P. 2021–2028
355. 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.
356. Shintani, M. Complete genome sequence of the thermophilic polychlorinated biphenyl degrader *Geobacillus* sp. strain JF8 (NBRC 109937) / M. Shintani [et al.] // *Genome Announce*. – 2014. – V. 2, № 1. – doi: 10.1128/genomeA.01213-13.
357. 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.
358. Shumkova, E.S. Draft genome sequence of *Rhodococcus ruber* strain P25, an active polychlorinated biphenyl degrader / E.S. Shumkova [et al.] // *Genome Announce*. – 2015. – V. 3, № 5. – doi: 10.1128/genomeA.00990-15.
359. Shuttleworth, K.L. Physiological and genetic comparison of two aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* strains / K.L. Shuttleworth [et al.] // *Molecules and Cells*. – 2000. – V. 10. – P. 199–205.

360. 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 [et al.] // *Chemosphere*. – 2003. – V. 53, № 6. – P. 609–618.
361. Singer, A.C. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria, / A.C. Singer [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 54. – P. 838 – 843.
362. Singer, A.C. Differential enantioselective transformation of atropisomeric polychlorinated biphenyls by multiple bacterial strains with different inducing compounds / A.C. Singer, C.S. Wong, D. E. Crowley // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – P. 5756 – 5759.
363. Solyanikova, I.P. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by *Actinobacteria*. / I.P. Solyanikova [et al.] // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 2015. – V. 100. – P. 155–164. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.02.028
364. 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.
365. 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.
366. Sondossi, M. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl by biphenyl/chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testosterone*, strain B-356. / M. Sondossi [et al.] // *Journal of Industrial Microbiology*. – 1991. – V. 7. – P. 77–88.
367. Song, M. Anaerobic degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Biphenyls Ethers (PBDEs), and microbial community dynamics of electronic waste- contaminated soil. / M. Song [et al.] // *Sci.*

- Total Environ. – 2015. – V. 502. – P. 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.Scitotenv.2014.09.045>.
368. Song, M. Identification of biphenyl-metabolizing microbes in activated biosludge using cultivation-independent and -dependent approaches / M. Song [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2018. – V. 353. – P. 534–541.
369. 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.
370. 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.
371. Šrédlová, K. Recent advances in PCB removal from historically contaminated environmental matrices / K. Šrédlová, T. Cajthaml // Chemosphere. – 2022. – V. 287. – Article 132096.
372. Stanier, R.Y. Protocatechuate acid oxidase / R.Y. Stanier, J.L. Ingraham // J. Biol. Chem. – 1954. – V. 210. –P. 799–808.
373. Steliga, T. Assessment of biodegradation efficiency of polychlorinated biphenyls (PCBs) and petroleum hydrocarbons (TPH) in soil using three individual bacterial strains and their mixed culture. / T. Steliga [et al.] // Molecules. – 2020. – V. 25. – Article 709.
374. Stingley, R.L. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 / R.L. Stingley, A.A. Khan, C.E. Cerniglia // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – V. 322 (1). – P. 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.089>.
375. Su, X. Aerobic degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by a resuscitated strain *Castellaniella* sp. SPC4: Kinetics model and pathway for biodegradation / X. Su [et al.] // Science of the Total Environment. – 2019. – V. 688. – P. 917–925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.364>

376. Su, X. *Rhodococcus biphenylivorans* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium / X. Su [et al.] // Antonio van Leeuwenhoek. – 2015. – V. 107, № 1. – P. 55–63.
377. 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.
378. Suenaga, H. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active site engineering. / H. Suenaga [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184. – P. 3682–3688
379. Suenaga, H. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzenes / H. Suenaga [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – P. 5441–5444.
380. 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 Announce. – 2015. – V. 3, № 2. – doi: 10.1128/genomeA.00143-15.
381. 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.
382. Sun, J. Detection of methoxylated and hydroxylated polychlorinated biphenyls in sewage sludge in China with evidence for their microbial transformation. / J. Sun [et al.] // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – Article 29782. <https://doi.org/10.1038/srep29782>
383. Sun, J. Formation of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls by *Bacillus subtilis*: new insights into microbial metabolism / J. Sun, L. Pan, L. Zhu // Science of the Total Environment. – 2018. – V. 613–614. – P. 54–61.

384. Sun, J. Formation of hydroxylated and methoxylated polychlorinated biphenyls by *Bacillus subtilis*: new insights into microbial metabolism. / J. Sun, L. Pan, L. Zhu // *Sci. Total Environ.* – 2018. – V. 613-614. – P. 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.063>
385. Sylvestre, M. Biphenyl/chlorobiphenyls catabolic pathway of *Comamonas testosteroni* B-356: Prospect for use in bioremediation. / M. Sylvestre // *Int. Biodeter. Biodegrad.* – 1995. – P. 189–211.
386. 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.
387. Syvanen M. Evolutionary implications of horizontal gene transfer / M. Syvanen // *Annu. Rev. Genet.* – 2012. – V. 46. – P. 341–358. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155529
388. 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 [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2007. – V. 71, № 5. – P. 1136–1144.
389. 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.
390. Tan, H.M. Bacterial catabolic transposons / H.M. Tan // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V. 51. – P. 1–12.
391. Tartakovsky, A. Degradation B. of Aroclor 1242 in single-stage coupled anaerobic/aerobic bioreactor / A. Tartakovsky [et al.] // *Water Res.* – 2001. – №35. – P. 4323–4330.
392. Tehrani, R. Biodegradation of mono-hydroxylated PCBs by *Burkholderia xenovorans*. / R. Tehrani [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2012. – V. 34. – P. 2247–2252. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1037-x>

393. Tehrani, R. Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: source, fate, and toxicities / R. Tehrani, B. Van Aken // *Environmental Science of Pollution Research*. – 2014. – V. 21. – P. 6334–6345. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1742-6>
394. Tehrani, R. Transformation of hydroxylated derivatives of 2,5-dichlorobiphenyl and 2,4,6-trichlorobiphenyl by *Burkholderia xenovorans* LB400. / R. Tehrani, M.M. Lyv, B. Van Aken, // *Environ. Sci. Poll. Res.* – 2014. – V. 21. – P. 6346–6353. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1629-6>
395. Thompson, I.P. Response of soil microbial communities to single and multiple doses of an organic pollutant / I.P. Thompson [*et al.*] // *Soil Biol. Biochem.* – 1999. – V. 31. – P. 95–105.
396. Tiirola, M.A. *Novosphingobium lentum* sp. Nov., a psychrotolerant bacterium from a polychlorophenol bioremediation process. / M.A. Tiirola [*et al.*] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – №55. – P. 583–588. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63386-0>
397. 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.
398. Tsoi, T.V. Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* KZT1 *fcba* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli* / T.V. Tsoi [*et al.*] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1991. – V. 81. – P. 165–170.
399. Tu, C. Rhizoremediation of a dioxin-like PCB polluted soil by alfalfa: dynamic characterization at temporal and spatial scale / C. Tu [*et al.*] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 189. – P. 517–524.
400. Ulaszewska, M.M. PCDD/Fs and dioxine-like PCBs in human milk and estimation of infants' daily intake: A review / M.M. Ulaszewska, E. Zuccato, E. Davoli // *Chemosphere*. – 2011. – V. 83. – P. 774–782.

401. Vaillancourt, F.H. Characterization of Extradiol Dioxygenases from a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Strain That Possess Higher Specificities for Chlorinated Metabolites / F.H. Vaillancourt [*et al.*] // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185, № 4. – P. 1253–1260.
402. Vaillancourt, F.H. The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by catecholic substrates / F.H. Vaillancourt [*et al.*] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 2019–2027.
403. Vaillancourt, F. H. Molecular basis for the stabilization and inhibition of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by *t*-butanol / F.H. Vaillancourt [*et al.*] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 34887–34895.
404. Valizadeh, S. Bioremediation strategies with biochar for polychlorinated biphenyls (PCBs)-contaminated soils: A review / S. Valizadeh [*et al.*] // *Environmental Research.* – 2021. – V. 200. – Article 111757.
405. Valleys, T. PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates / T. Valleys [*et al.*] // *FEMS Microbiol. Ecology.* – 1997. – V. 27. – P. 269–278.
406. van Duuren, J.B.J.H. Generation of a *catR* deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces *cis,cis*-muconate from benzoate at high rate and yield / J.B.J.H. van Duuren [*et al.*] // *Journal of Biotechnology.* – 2011. – V. 156. – P. 163–172.
407. Vandenberg, P.A. Isolation and genetic characterization of bacteria that degrade chloroaromatic compound / P.A. Vandenberg, R.H. Olsen, J. Colaruoto // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1981. – V. 42. – P. 737–739.
408. 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. – e0221253
409. Versalovic, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic [*et al.*] // *Meth. Cell. Mol. Biol.* – 1994. – V. 5. – P. 25–40.

410. Vetting, M.W. Structure of *Acinetobacter* sp. ADP1 protocatechuate 3,4-dioxygenase at 2.2 Å resolution: implications for the mechanisms of an intradiol dioxygenase. / Vetting, M.W. [et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 7943–7955
411. 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.
412. Viger, J.F. Metabolism of chlorobiphenyls by a variant biphenyl dioxygenase exhibiting enhanced activity toward dibenzofuran / J.F. Viger [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2012. – V. 419, № 2. – P. 362–367.
413. 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 [et al.] // *Genome Announce*. – 2014. – V. 2, № 3. – doi: 10.1128/genomeA.00474-14.
414. Viney, I. Preliminary studies on the development of a microbiological treatment for polychlorinated biphenyls / I. Viney, R.J.F. Bewley // *Arch. Environ. Con. Tox.* – 1990. – V. 19. – P. 789–796.
415. Vodovar, N. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. / N. Vodovar [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2006. – №24. – P. 673–679. doi: 10.1038/nbt1212
416. Vollmer, M.D. Substrate specificities of the chloromuconate cycloisomerases from *Pseudomonas* sp. B13, *Ralstonia eutropha* JMP134 and *Pseudomonas* sp. P51 / M.D. Vollmer [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V. 51. – P. 598–605.
417. Wagner-Dobler, I. Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments / I. Wagner-Dobler [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – P. 3014–3022.

418. Wang, Y The engineered biphenyl dioxygenases enhanced the metabolism of dibenzofuran / Y. Wang [*et al.*] // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2021. – V. 161. – Article 105228
419. Wang, Y. Measuring the bioavailability of polychlorinated biphenyls to earthworms in soil enriched with biochar or activated carbon using triolein-embedded cellulose acetate membrane. / Y. Wang [*et al.*] //J. Soils Sediments. – 2016. – № 16. – P. 527–536.
420. Wang, Y. Sequence and expression of the *bpdC1C2BADE* genes involving in the initial steps of biphenyl/chlorobiphenyl degradation by *Rhodococcus* sp. M5 / Y. Wang [*et al.*] // Gene. – 1995. – V. 164. – P. 117–122.
421. Warenik-Bany, M. Impact of environmental pollution on PCDD/F and PCB bioaccumulation in game animals / M. Warenik-Bany [*et al.*] // Environmental Pollution. – 2019. – V. 255. – doi: 10.1016/j.envpol.2019.113159.
422. 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.
423. Watanabe, T. Draft genome sequence of *Cupriavidus pauculus* strain KF709, a biphenyl-utilizing bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil / T. Watanabe [*et al.*] // Genome Announce. – 2015b. – V. 3, № 2. – doi: 10.1128/genomeA.00222-15.
424. Watanabe, T. Draft genome sequence of *Pseudomonas toyotomiensis* KF710, a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil / T. Watanabe [*et al.*] // Genome Announce. – 2015a. – V. 3, № 2. – doi: 10.1128/genomeA.00223-15.
425. Watanabe, T. Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 / T. Watanabe [*et al.*] // J. Bacteriol. – 2000. – V. 275. – P. 31016–31023.

426. Weber, J.B. Polychlorinated biphenyls: phytotoxicity, absorption and translocation by plants, and inactivation by activated carbon. / J.B. Weber, E. Mrozek // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1979. – № 23. – P. 412–417.
427. Wiegel, J. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls / J. Wiegel, Q.Z. Wu // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000. – V. 32, № 1. – P. 1–15.
428. Willetts, A. Conferring the metabolic self-sufficiency of the CAM plasmid of *Pseudomonas putida* ATCC 17453: the key role of putidaredoxin reductase / A. Willetts // *Microorganisms.* – 2019. – V. 7. – Article 395.
429. 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 [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72, № 5. – P. 3504–3514.
430. Xu, C. Degradation of three monochlorobenzoate isomers by different bacteria isolated from a contaminated soil / C. Xu [*et al.*] // *International Biodeterioration and Biodegradation.* – 2017. – V. 120. – P. 192–202.
431. 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.
432. Xu, Y. Complete genome sequence of the polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. WB1 / Y. Xu, M. Yu, A. Shen // *Genome Announce.* – 2016. – V. 4, № 5. – doi: e00996-16.
433. Yamada, A. Two nearly identical aromatic compound hydrolase genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / A. Yamada [*et al.*] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – P. 2006 – 2012.
434. Yamada, T. Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. / A. Yamada [*et al.*] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – № 73. – P. 452–457. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0472-9>

435. Yang, X. Characterization and functional analysis of a novel gene cluster involved in biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain R04 / X. Yang [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2007. – V. 103, № 6. – P. 2214–2224.
436. 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.
437. 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.
438. 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.
439. Yoo, M. Biphenyl hydroxylation enhanced by an engineered o-xylene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain DK17. / M. Yoo [et al.] // Res. Microbiol. - 2011. – V. 162. – P. 724–728.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.013>
440. 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.
441. Zaar, A. A novel pathway of aerobic benzoate catabolism in the bacteria *Azoarcus evansii* and *Bacillus stearothermophilus* / A. Zaar [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – P. 24997 – 25004.
442. Zaitsev, G.M. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains / Zaitsev G.M. [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1991. – V. 81. – P. 171–176.

443. Zhang, G.-Y. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11 / G.-Y. Zhang [et al.] // J. Hazard. Materials. – 2009. – V. 172. – P. 580–586.
444. 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.
445. Zhang, R. Insights into the catalytic mechanism of dehydrogenase BphB: A quantum mechanics/molecular mechanics study / R. Zhang [et al.] // Chemosphere. – 2018. – V. 208. – P. 69–76.
446. Zhang, Y. Syntrophic interactions within a butane-oxidizing bacterial consortium isolated from Puguang Gas Field in China. / Y. Zhang [et al.] // Microb. Ecol. – 2016. – V. 72. – P. 538–548. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0799-4>
447. 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.
448. Zhu, L. Degradation mechanism of biphenyl and 4,4'-dichlorobiphenyl cis-dihydroxylation by non-heme 2,3 dioxygenases BphA: A QM/MM approach / L. Zhu [et al.] // Chemosphere. – 2020. – V. 247. – Article125844.
449. Zielinski, M. Pin-pointing biphenyl dioxygenase residues that are crucial for substrate interaction / M. Zielinski [et al.] // J. Bacteriology. – 2003. – V. 185. – P. 6976–6980.
450. 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

Состав коммерческих и экспериментальных смесей ПХБ

Таблица 32 – Сопоставление состава коммерческих смесей ПХБ, %

ПХБ	Трихлор- бифенил/ Delor 103	Совол	Aroclor			
			1242	1248	1254	1260
моно-СВ	–	–	3	–	–	–
ди-СВ	14.5	–	13	2	–	–
три-СВ	47.7	2.1	28	18	–	–
тетра-СВ	29.3	19.1	30	40	11	–
пента-СВ	3.8	51.5	22	36	49	12
гекса-СВ	<0.1	17.9	4	4	34	38
гепта-СВ	–	1.9	–	–	6	41
окта-СВ	–	–	–	–	–	8
нана-СВ	–	–	–	–	–	1
[Cl], %	43.5	52.1	40–42	48	52–54	60

Таблица 33 – Оценка относительного содержания конгенов ПХБ, входящих в состав смеси Трихлорбифенил*

Номер конгенера по ИЮПАК	Расположение атомов хлора	Относительное содержание, %	Номер конгенера по ИЮПАК	Расположение атомов хлора	Относительное содержание, %
4/10*	2,2`/2,6	2.8	42	2,3,2`,4`	2.8
7/9	2,4/2,5	0.3	46	2,3,2`,6`	2.2
6	2,3`	0.9	47/48*	2,4,2`,4`/2,4,5,2`	2.0
5/8	2,3/2,4`	7.5	44	2,3,2`,5`	2.5
19	2,6,2`	1.0	37	3,4,4`	1.3
18	2,5,2`	9.1	42	2,3,2`,4`	2.8
15	4,4`	3.2	41/64*	2,3,4,2`/2,3,6,4`	1.2
17	2,4,2`	3.1	40	2,3,2`,3`	0.3
24/27*	2,3,6/2,6,3`	0.7	74	2,4,5,4`	0.7
16/32*	2,3,2`/2,6,4`	6.2	76/70*	3,4,5,2`/2,5,3`,4`	1.0
26	2,5,3`	1.3	66/95*	2,4,3`,4`/2,3,6,2`,5`	2.2/1.4
25	2,4,3`	0.6	56/60*	2,3,3`,4`/2,3,4,4`	1.0
31/28*	2,5,4`/2,4,4`	18.6	101	2,4,5,2`,5`	0.5
20/33*	2,3,3`/3,4,2`	4.7	99	2,4,5,2`,4`	0.2
53	2,5,2`,6`	2.6	97	2,4,5,2`,3`	0.1
22	2,3,4`	1.8	87	2,3,4,2`,5`	0.2
51	2,4,2`,6`	2.0	85	2,3,4,2`,4`	0.1
45	2,3,6,2`	0.8	110	2,3,6,3`,4`	0.6
52	2,5,2`,5`	2.4	82	2,3,4,2`,3`	0.1
44	2,3,2`,5`	2.5	118	2,4,5,3`,4`	0.3
37	3,4,4`	1.3	105	2,3,4,3`,4`	0.2
41/64*	2,3,4,2`/2,3,6,4`	1.2			

*Состав смеси ТХБ представлен на основании данных Перова и др., 2015. ** элюируются совместно

Таблица 34 – Оценка относительного содержания конгенов ПХБ, входящих в состав в смеси Совол*

Номер конгенера по ИЮПАК	Расположение атомов хлора	Относительное содержание, %
28	2,4,4`	0.4
33	3,4,2`	0.3
22	2,3,4`	0.2
52	2,5,2`,5`	3.9
49	2,4,2`,5`	1.5
47	2,4,2`,4`	0.5
44	2,3,2`,5`	1.9
41/64**	2,3,4,2`/2,3,6,4`	0.8
74	2,4,5,4`	1.8
70/66**	2,5,3`,4`/2,4,3`,4`	6.6
95	2,3,6,2`,5`	2.6
91	2,3,6,2`,4`	0.9
56/60**	2,3,3`,4`/2,3,4,4`	2.0
84/92**	2,3,6,2`,3`/2,3,5,2`,5`	2.1
101	2,4,5,2`,5`	6.5
99	2,4,5,2`,4`	6.2
97	2,4,5,2`,3`	2.6
87	2,3,4,2`,5`	3.3
85	2,3,4,2`,4`	2.4
110	2,3,6,3`,4`	8.2
82	2,3,4,2`,3`	1.5
149	2,3,6,2`4`,5`	4.0
118	2,4,5,3`,4`	11.1
153/132**	2,4,5,2`4`,5`/2,3,4,2`,3`,6`	6.1
105	2,3,4,3`,4`	4.3
138	2,3,4,2`,4`,5`	4.9
128	2,3,4,2`,3`,4`	2.0
156	2,3,4,5,3`,4`	0.9
180	2,3,4,5,2`,4`,5`	0.6
170	2,3,4,5,2`,3`,4`	0.2

* Состав смеси Совол представлен на основании данных Кириченко и др., 2000, Питерских и др., 2001; ** элюируются совместно

Таблица 35 – Состав экспериментальной смеси А *

ПХБ / положение хлора в молекуле	Концентрация конгенов ПХБ, %	ПХБ, положение хлора в молекуле	Концентрация конгенов ПХБ, %
ПХБ 17 / 2,4,2'-	2.04	ПХБ 64 / 2,3,6,4'-	5.27
ПХБ 28 / 2,4,4'-	0.44	ПХБ 71 / 2,6,3',4'-	1.22
ПХБ 41 / 2,3,4,2'-	0.52	ПХБ 72 / 2,5,3',5'-	10.12
ПХБ 44 / 2,3,2',5'-	1.61	ПХБ 75 / 2,4,6,4'-	7.21
ПХБ 47 / 2,4,2',4'-	12.49	ПХБ 77 / 3,4,3',4'-	14.54
ПХБ 49 / 2,4,2',5'-	7.41	ПХБ 85 / 2,3,4,2',4'-	1.65
ПХБ 52 / 2,5,2',5'-	22.61	ПХБ 105 / 2,3,4,3',4'-	0.65
ПХБ 56 / 2,3,3',4'-	2.08	ПХБ 110 / 2,3,6,3',4'-	4.68
ПХБ 58 / 2,3,3',5'-	0.94	ПХБ 118 / 2,4,5,3',4'-	1.50
ПХБ 60 / 2,3,4,4'-	2.24	ПХБ 153 / 2,4,5,2',4',5'-	0.77

* Смесь А получена экспериментально в ИОС УрО РАН (Егорова и др., 2011)

Таблица 36 – Состав экспериментальной смеси ВР *

ПХБ	Положение хлора в молекуле	Концентрация конгенера в смеси, %
Бифенил	–	20
ПХБ 1	2-	20
ПХБ 3	4-	20
ПХБ 4	2,2’-	10
ПХБ 8	2,4’-	10
ПХБ 15	4,4’-	10
ПХБ 17	2,4,2’-	5
ПХБ 28	2,4,4’-	5

* Смесь ВР составлена в «ИЭГМ УрО РАН» из индивидуальных конгенов ПХБ (Егорова и др., 2009)

Приложение 2

Карты-схемы территорий отбора образцов почв

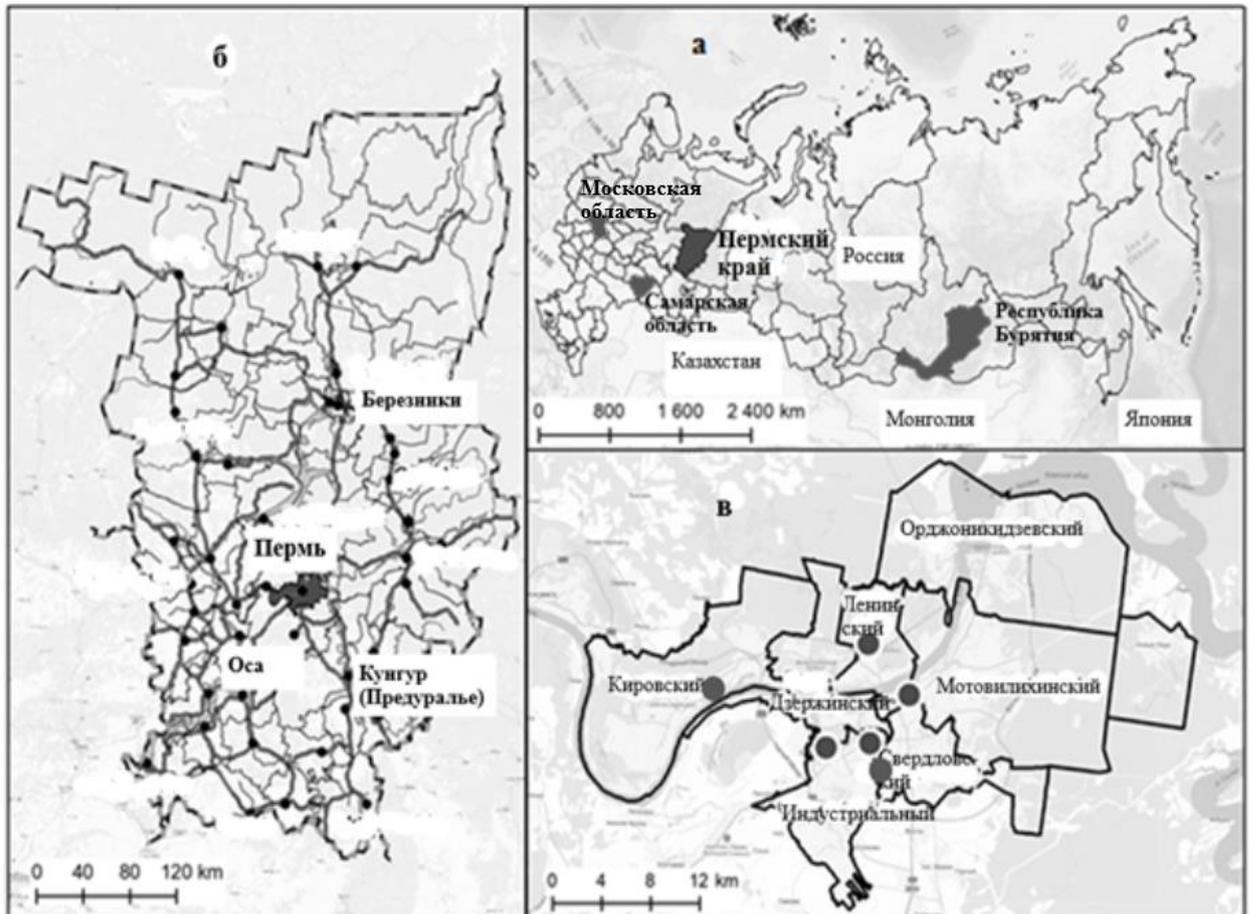


Рисунок 73 – Карта России (а), Пермского края (б) и города Перми (в) с указанием территорий (а, б) и точек (•) (в) отбора почвенных образцов

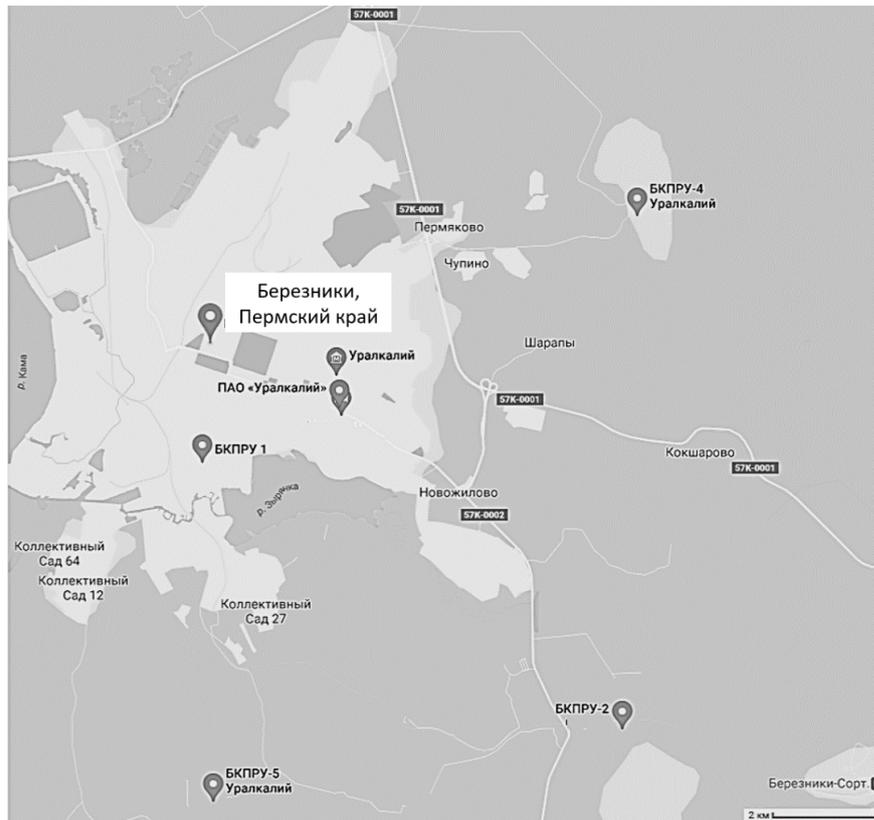


Рисунок 74 – Карта-схема г. Березники, Пермский край

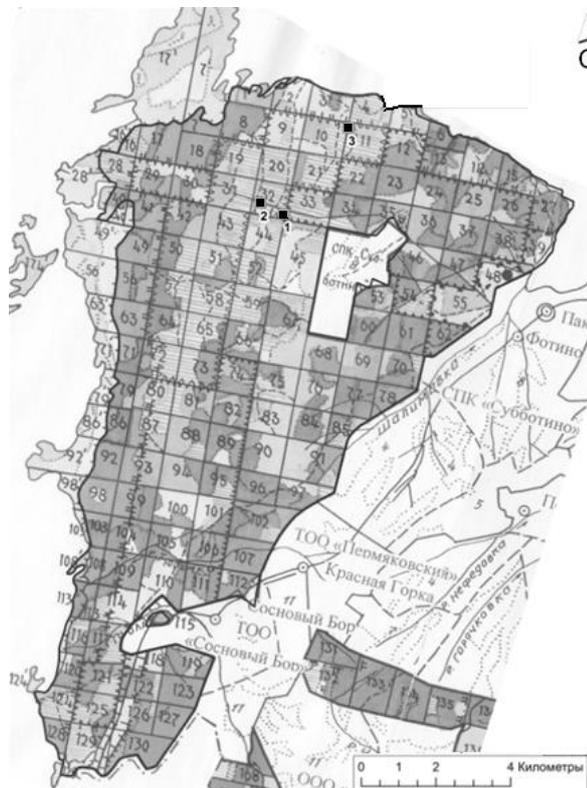


Рисунок 75 – Карта-схема ООПТ «Осинская лесная дача»: ■ – точки отбора образцов почвы.

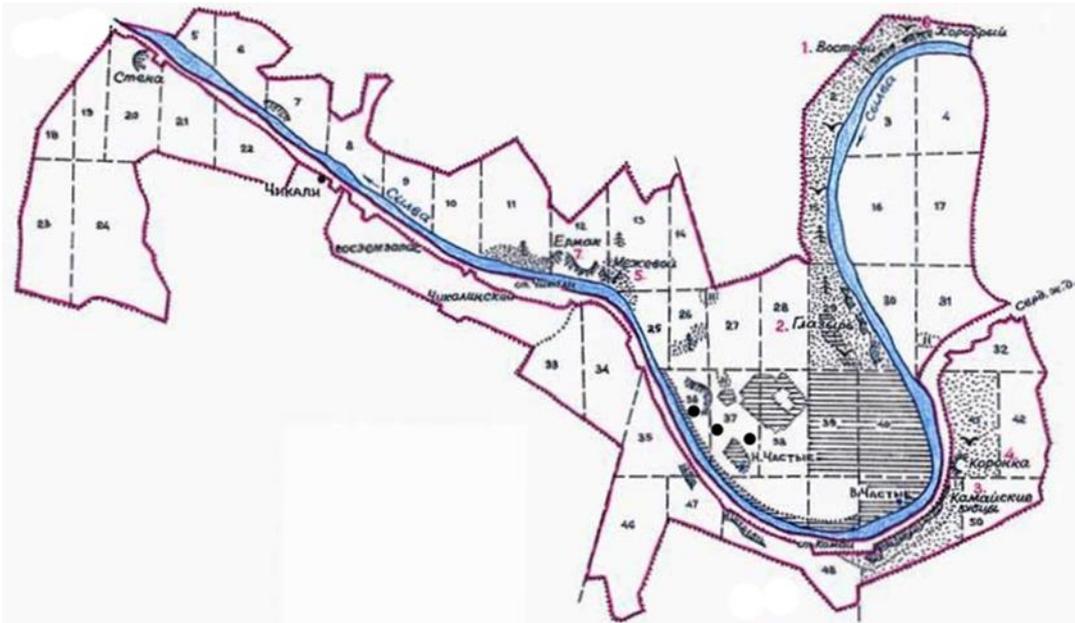


Рисунок 76 – Карта-схема территории заказника «Предуралье»: ● - точки отбора образцов почвы (<http://www.psu.ru>).



Рисунок 77 – Карта г. Чапаевска, Самарская область. Черным обведена территория ОАО «СВЗХ», на которой производился отбор образцов почвы и грунта.

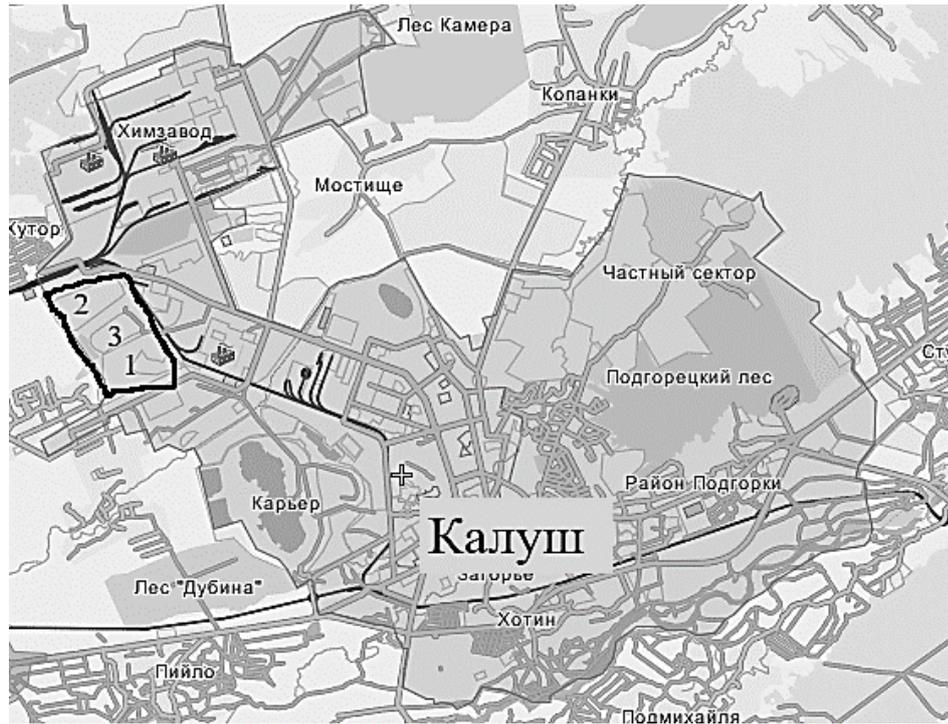


Рисунок 78 – Карта-схема г. Калуш (Украина). Черным контуром обозначена территория захоронения токсичных отходов: 1 – хвостохранилище 1, 2 – хвостохранилище 3, 3 – хвостохранилище 2



Рисунок 79 – Карта-схема расположения озер Котокельское (1), Белое (2) и Соленое (3)

Таблица 37 – Перечень штаммов, использованных в настоящем исследовании

№	Филум/тип, * класс	Род	Вид	Штамм, (номер в коллекции), номер в GenBank	Год выделения	Разлагаемые соединения
1	2	3	4	5	6	7
Штаммы, выделенные из образцов почв г. Перми						
1	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	н/о**	BP9-5	2019	Бифенил/ПХБ
2	<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	н/о	E20	2017	Бифенил/ПХБ
3			н/о	E35	2017	Бифенил/ПХБ
4			<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i>	н/о	P39
5			н/о	H1	1998	Фенол, ХБК
6			н/о	H3	1998	Фенол, ХБК
7			н/о	H24	1998	Фенол, ХБК
8			н/о	H25	1998	Фенол, ХБК
9	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Arthrobacter</i>	н/о	P29	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
10			н/о	H4	1998	Фенол, ХБК
11			н/о	H5	1998	Фенол, ХБК
12			н/о	SF27	2000	Бифенил/ПХБ
13	<i>Firmicutes, Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	н/о	K53	2019	Бифенил/ПХБ
14			н/о	K25	2019	Бифенил/ПХБ
15			н/о	BP9ST	2019	Бифенил/ПХБ
16	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	н/о	SIB4	2017	Бифенил/ПХБ
17			н/о	SIB5	2017	Бифенил/ПХБ
18			н/о	SIB8	2017	Бифенил/ПХБ
19	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Cellulomonas</i>	н/о	P27	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
20			н/о	P28	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
21			н/о	G118	2003	(галоген)БК
22	<i>Deinococcus-Thermus, Deinococci</i>	<i>Deinococcus</i>	н/о	G101	2003	(галоген)БК
23			н/о	G104	2003	(галоген)БК

1	2	3	4	5	6	7
24	<i>Deinococcus-Thermus, Deinococci</i>	<i>Deinococcus</i>	н/о	G108	2003	(галоген)БК
25			н/о	G125	2003	(галоген)БК
26	<i>Bacteroidetes, Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacterium</i>	н/о	P38	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
27			н/о	G14	2000	Бифенил/ПХБ, ХБК
28	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Kocuria</i>	н/о	BP9ST4	2019	Бифенил
29			н/о	K29	2019	Бифенил
30	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Microbacterium</i>	н/о	P26	1999	Бифенил/ПХБ
31	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Micrococcus</i>	н/о	G105	2003	(галоген)БК
32			н/о	G109	2003	(галоген)БК
33			н/о	G120	2003	(галоген)БК
34			н/о	G126	2003	(галоген)БК
35			н/о	BP9ST1	2019	Бифенил
36			н/о	BP9ST2	2019	Бифенил
37			н/о	BP9ST3	2019	Бифенил
38			н/о	BP9-A5	2019	Бифенил
39			н/о	SIB1	2017	Бифенил/ПХБ
40			н/о	SIB2	2017	Бифенил/ПХБ
41	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Ohrobactrum</i>	н/о	BP9H	2019	Бифенил
42			н/о	BP9-11	2019	Бифенил
43			н/о	E22	2017	Бифенил/ПХБ
44			н/о	E24	2017	Бифенил/ПХБ
45	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>ruber</i>	P25 (=ИЭГМ896), LDUF01000000	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
46			<i>ruber</i>	S9a, KP972447	1998	Бифенил/ПХБ
47			<i>wratislaviensis</i>	G10, KP972448	2000	Бифенил/ПХБ
48			<i>wratislaviensis</i>	P1, FJ752167	1998	Бифенил/ПХБ
49			<i>wratislaviensis</i>	P12, KP972445	1998	Бифенил/ПХБ
50			<i>wratislaviensis</i>	P13, KP972446	1998	Бифенил/ПХБ
51			<i>wratislaviensis</i>	P20, KC832467	1998	Бифенил/ПХБ
52			<i>erythropolis</i>	P2m	1998	Бифенил/ПХБ

1	2	3	4	5	6	7		
53	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>	P2kr, KP972443	1998	Бифенил/ПХБ		
54			<i>erythropolis</i>	P2(51)	1998	Бифенил/ПХБ		
55			<i>erythropolis</i>	P23a	2011	Бифенил/ПХБ		
56			<i>erythropolis</i>	G12a, KP972444	2011	Бифенил/ПХБ		
57			<i>erythropolis</i>	P1-1	2011	Бифенил/ПХБ		
58			н/о	BP9-1	2019	Бифенил		
59			н/о	BP9-2	2019	Бифенил		
60			н/о	BP9-4	2019	Бифенил		
61			н/о	BP9-7	2019	Бифенил/ПХБ		
62			н/о	BP9-8	2019	Бифенил/ПХБ		
63			н/о	DB11	2000	Бифенил/ПХБ		
64			н/о	SN31	2000	Бифенил/ПХБ		
65			н/о	P10-7	2000	Бифенил/ПХБ		
66			н/о	P10-7a	2000	Бифенил/ПХБ		
67			н/о	P10-7b	2000	Бифенил/ПХБ		
68			н/о	PG4	2000	Бифенил/ПХБ		
69			н/о	P50	2000	Бифенил/ПХБ		
70			<i>Firmicutes, Bacilli</i>	<i>Planococcus</i>	н/о	G110	2003	(галоген)БК
71			<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	P22	1999	Бифенил/ПХБ, ХБК
72	н/о	P23			1999	Бифенил/ПХБ, ХБК		
73	н/о	P24			1999	Бифенил/ПХБ, ХБК		
74	н/о	G1			1999	Бифенил/ПХБ		
75	н/о	G11			2000	Бифенил/ПХБ		
76	н/о	G12			2000	Бифенил/ПХБ		
77	н/о	G13			2000	Бифенил/ПХБ		
78	<i>fluorescens</i>	H2			1998	Фенол, ХБК		
79	<i>fluorescens</i>	H8			1998	Фенол, ХБК		
80	<i>fluorescens</i>	G106			2003	(галоген)БК		
81	<i>fluorescens</i>	G112			2003	(галоген)БК		
82	<i>fluorescens</i>	G113			2003	(галоген)БК		

1	2	3	4	5	6	7
83	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	H12	1998	Фенол, ХБК
84			<i>putida</i>	H15	1998	Фенол, ХБК
85			<i>putida</i>	G107	2003	(галоген)БК
86			н/о	H17	1998	Фенол, ХБК
87			н/о	G127	2003	Бифенил/ПХБ
88			н/о	G128	2003	Бифенил/ПХБ
89			н/о	G129	2003	Бифенил/ПХБ
90			н/о	G132	2003	Бифенил/ПХБ
91			н/о	G133	2003	Бифенил/ПХБ
92			н/о	G134	2003	Бифенил/ПХБ
93			н/о	G135	2003	Бифенил/ПХБ
94			н/о	G137	2003	Бифенил/ПХБ
95			н/о	G117	2003	(галоген)БК
96			н/о	G119	2003	(галоген)БК
97			н/о	SIB3	2017	Бифенил/ПХБ
98			н/о	SIB6	2017	Бифенил/ПХБ
99			н/о	SIB7	2017	Бифенил/ПХБ
100			н/о	SIB9	2017	Бифенил/ПХБ
101			н/о	SIB10	2017	Бифенил/ПХБ
102			н/о	E2	2017	Бифенил
103			н/о	E3	2017	Бифенил
104			н/о	E12	2017	Бифенил
105			н/о	E13	2017	Бифенил
106			н/о	E14	2017	Бифенил
107			н/о	E15	2017	Бифенил
108			н/о	E16	2017	Бифенил
109			н/о	E23	2017	Бифенил
110			н/о	E25	2017	Бифенил
111			н/о	E26	2017	Бифенил
112			н/о	E27	2017	Бифенил

1	2	3	4	5	6	7
113	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	E28	2017	Бифенил
114			н/о	E29	2017	Бифенил
115			н/о	E30	2017	Бифенил
116			н/о	E31	2017	Бифенил
117			н/о	E36	2017	Бифенил
118			н/о	P8	2000	Бифенил/ПХБ
119			н/о	P8a	2000	Бифенил/ПХБ
120			н/о	P9	2000	Бифенил/ПХБ
121			н/о	SKL2	2000	Бифенил/ПХБ
122			н/о	SKL3	2000	Бифенил/ПХБ
123			н/о	N18a	2000	Бифенил/ПХБ
124			н/о	VRP2-2, KY971637.1	2016	Бифенил/ПХБ
125			н/о	VRP2-6, KY977422.1	2016	Бифенил/ПХБ
Штаммы, выделенные из образцов почв г. Березники						
126	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Arthrobacter</i>	н/о	B107	2000	Бифенил/ПХБ
127			н/о	EK20	2008	Бифенил
128			н/о	EK21	2008	Бифенил
129			н/о	EK22	2008	Бифенил
130			н/о	EK37	2008	Бифенил
131			н/о	EK39	2008	Бифенил
132			н/о	EK45	2008	Бифенил
133	<i>Firmicutes, Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	н/о	EK1	2009	Бифенил/ПХБ
134			н/о	PO2	2010	Бифенил/ПХБ
135			н/о	EK2	2008	Бифенил/ПХБ
136			н/о	EK3	2008	Бифенил/ПХБ
137			н/о	EK4	2008	Бифенил/ПХБ
138			н/о	EK5	2008	Бифенил/ПХБ
139			н/о	EK6	2008	Бифенил/ПХБ

1	2	3	4	5	6	7
140	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Brevibacterium</i>	н/о	EK13	2008	Бифенил/ПХБ
141			н/о	EK19	2008	Бифенил/ПХБ
142			н/о	EK15	2008	Бифенил/ПХБ
143			н/о	EK25	2008	Бифенил/ПХБ
144			н/о	EK17	2008	Бифенил/ПХБ
145			н/о	EK23	2008	Бифенил/ПХБ
146	<i>Actinobacteria, Actinobacteria</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	н/о	EK14	2008	Бифенил/ПХБ
147			н/о	EK16	2008	Бифенил/ПХБ
148			н/о	EK27	2008	Бифенил/ПХБ
149			н/о	EK38	2008	Бифенил/ПХБ
150			н/о	EK41	2008	Бифенил/ПХБ
151	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Gordonia</i>	н/о	EK18	2008	Бифенил/ПХБ
152	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>oxydans</i>	B51	2000	Бифенил/ПХБ, ХБК
153			<i>foliorum</i>	BN52	2014	Бифенил/ПХБ
154			н/о	EK24	2008	Бифенил/ПХБ
155			н/о	EK26	2008	Бифенил/ПХБ
156			н/о	EK29	2008	Бифенил/ПХБ
157			н/о	EK28	2008	Бифенил/ПХБ
158	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	B2	2000	Бифенил/ПХБ
159			н/о	B7	2000	Бифенил/ПХБ
160			н/о	B8	2000	Бифенил/ПХБ
161			н/о	B106	2000	Бифенил/ПХБ
162			н/о	RO1612	2010	Бифенил/ПХБ
163			н/о	EK-30	2008	Бифенил/ПХБ
164			н/о	EK31	2008	Бифенил/ПХБ
165			н/о	EK32	2008	Бифенил/ПХБ
166			н/о	EK33	2008	Бифенил/ПХБ
167			н/о	EK34	2008	Бифенил
168			н/о	EK35	2008	Бифенил
169			н/о	EK36	2008	Бифенил

1	2	3	4	5	6	7
170	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	EK40	2008	Бифенил
171			н/о	EK41	2008	Бифенил
172			н/о	EK42	2008	Бифенил
173			н/о	EK43	2008	Бифенил
174			н/о	EK44	2008	Бифенил
175	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>	B7b, KP985700	2012	Бифенил/ПХБ
176			<i>erythropolis</i>	B106a, KP972444	2012	Бифенил/ПХБ
177			<i>wratislaviensis</i>	RO112	2010	Бифенил/ПХБ
178			<i>wratislaviensis</i>	КТ112-7 (=ВКМ АС-2623D), СР072193	2008	Бифенил/ПХБ, ХБК
179			<i>wratislaviensis</i>	EK7	2008	Бифенил/ПХБ
180			<i>wratislaviensis</i>	EK10	2008	Бифенил/ПХБ
181			<i>opacus</i>	EK9	2008	Бифенил/ПХБ
182			<i>opacus</i>	EK11	2008	Бифенил/ПХБ
183			<i>jostii</i>	EK8	2008	Бифенил/ПХБ
184			н/о	B7a	2008	Бифенил/ПХБ
185			н/о	КВВ16, MN078966.1	2015	Бифенил/ПХБ
186	н/о	ВВЛ12-2, MN094599.1	2015	Бифенил/ПХБ		
Штаммы, выделенные из образцов почв г. Калуж						
187	<i>Firmicutes, Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>vietnamensis</i>	MD7	2011	Бифенил/ПХБ
188	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	MD6	2011	Бифенил/ПХБ
189			н/о	MD8	2011	Бифенил/ПХБ
190	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>wratislaviensis</i>	MD1	2011	Бифенил/ПХБ
191			<i>wratislaviensis</i>	MD2	2011	Бифенил/ПХБ
192			н/о	MD3	2011	Бифенил/ПХБ
193			н/о	MD4	2011	Бифенил/ПХБ
194			н/о	MD5	2011	Бифенил/ПХБ

1	2	3	4	5	6	7
Штаммы, выделенные из образцов почв г. Серпухов						
195	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	S13, FJ752168	1996	Бифенил/ПХБ
196			н/о	S210, KP972449	1996	Бифенил/ПХБ
197			н/о	S211, KC832468	1996	Бифенил/ПХБ
198			н/о	S212, KP972450	1996	Бифенил/ПХБ
199			н/о	S214	1996	Бифенил/ПХБ
200			н/о	S9	1996	Бифенил/ПХБ
201			н/о	S213	1996	Бифенил/ПХБ
202			н/о	S220	2001	Бифенил/ПХБ
203			н/о	S221	2001	Бифенил/ПХБ
Штаммы, выделенные из образцов почв г. Чапаевск						
204	<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>marplatensis</i>	Ch1-2	2013	Бифенил/ПХБ
205			н/о	B3-164	2015	БК
206			н/о	B3-165	2015	БК
207			н/о	B5-167	2015	БК
208			н/о	A-147	2015	Бифенил/ПХБ
209			н/о	R14-4	2013	Бифенил/ПХБ
210			н/о	R6-412	2013	Бифенил/ПХБ
211			н/о	AA, MT040690	2017	(галоген)БК
212	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	Ch4-6	2013	Бифенил/ПХБ
213			<i>calcoaceticus</i>	Ch5-1	2013	Бифенил/ПХБ
214	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>oryzae</i>	Ch1-C1	2013	Бифенил/ПХБ
215			<i>oryzae</i>	Ch2-7	2013	Бифенил/ПХБ
216	<i>Firmicutes, Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	Ch5-7	2013	Бифенил/ПХБ
217			<i>simplex</i>	Ch1-C6	2013	Бифенил/ПХБ
218			н/о	Ch5-6	2013	Бифенил/ПХБ
219			н/о	BD, MT040692	2017	Бифенил/ПХБ
220			н/о	DI, MT040691	2018	(галоген)БК
221	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>oxydans</i>	Ch2-8	2013	Бифенил/ПХБ
222	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Ochrobactrum</i>	н/о	A5-67	2015	БК

1	2	3	4	5	6	7
223	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Ochrobactrum</i>	н/о	B2-174	2015	БК
224			н/о	B6-173	2015	БК
225			н/о	A-153	2015	Бифенил/ПХБ
226	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>benzenivorans</i>	Ch3-2	2013	Бифенил/ПХБ
227			<i>genuculata</i>	Ch3-4	2013	Бифенил/ПХБ
228			<i>monteilii</i>	Ch1-C3	2013	Бифенил/ПХБ
229			<i>monteilii</i>	Ch1-C7	2013	Бифенил/ПХБ
230			<i>monteilii</i>	Ch2-1	2013	Бифенил/ПХБ
231			<i>plecoglossicida</i>	Ch3-9	2013	Бифенил/ПХБ
232			<i>plecoglossicida</i>	Ch6-5	2013	Бифенил/ПХБ
233			<i>plecoglossicida</i>	Ch6-7	2013	Бифенил/ПХБ
234			<i>japonica</i>	A1-69	2015	БК
235			<i>japonica</i>	B1-169	2015	БК
236			<i>japonica</i>	B5-168	2015	БК
237			<i>alcaligenes</i>	A4-72	2015	БК
238			<i>alcaligenes</i>	A5-68	2015	БК
239			<i>alcaligenes</i>	F5-70	2015	БК
240			<i>alcaligenes</i>	B5-170	2015	БК
241			<i>xanthomarina</i>	B3-162	2015	БК
242			<i>xanthomarina</i>	B3-163	2015	БК
243			<i>xanthomarina</i>	B5-172	2015	БК
244			<i>taiwanensis</i>	B3-166	2015	БК
245			<i>taiwanensis</i>	B4-172	2015	БК
246		н/о	R6-411	2013	Бифенил/ПХБ	
247		н/о	A-134	2015	Бифенил/ПХБ	
248	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>wratislaviensis</i>	Ch6-511	2013	Бифенил/ПХБ
249			<i>wratislaviensis</i>	CH625 (=ВКМ Ac-2631D)	2013	Бифенил/ПХБ
250			<i>wratislaviensis</i>	CH628, КХ034163	2013	Бифенил/ПХБ
251			<i>opacus</i>	R6-511	2013	Бифенил/ПХБ
252			<i>erythropolis</i>	R14-3	2013	Бифенил/ПХБ

1	2	3	4	5	6	7
Штаммы, выделенные из образцов почв ООПТ «Осинская лесная дача»						
253	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Bosea</i>	<i>thiooxidans</i>	WD5p	2014	Бифенил
254			н/о	WD26	2014	ХБК
255			н/о	WD8p	2014	Бифенил
256			н/о	WD22.1	2014	ХБК
257	<i>Bacteroidetes, Flavobacteriia</i>	<i>Chryseobacterium</i>	н/о	WD101	2014	ХБК
258			н/о	WD29	2014	ХБК
259			н/о	WD34.1	2014	ХБК
260			н/о	WD43	2014	ХБК
261	<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>basilensis</i>	WD4p	2014	Бифенил/ПХБ
262			н/о	WD10.1	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ
263			н/о	WD19p	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ
264			н/о	WD1p	2014	Бифенил
265			н/о	WD32	2014	Бифенил/ПХБ
266			н/о	WD7p	2014	Бифенил
267			н/о	WD37	2014	Бифенил/ПХБ
268			н/о	WD41.1	2014	Бифенил/ПХБ, ХБК
269	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Kocuria</i>	<i>rosea</i>	WD24	2014	Бифенил/ПХБ
270			<i>rhizophila</i>	WD25	2014	Бифенил/ПХБ
271			н/о	WD28	2014	Бифенил
272			н/о	WD10p	2014	Бифенил/ПХБ, ХБК
273	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Mezorhizobium</i>	н/о	WD13p	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ
274			н/о	WD26	2014	ХБК
275			н/о	WD12.1	2014	Бифенил/ПХБ, ХБК
276			н/о	WD14.1	2014	Бифенил/ПХБ
277	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>yanoikuyae</i>	WD100	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ
278			н/о	WD1p	2014	Бифенил/ПХБ
279			н/о	WD21.1	2014	Бифенил
280			н/о	WD21.1	2014	Бифенил/ПХБ
281			н/о	WD23	2014	ХБК
282			н/о	WD36	2014	ХБК

1	2	3	4	5	6	7	
283	<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	н/о	E6	2017	Бифенил	
284			н/о	E7	2017	Бифенил	
285			н/о	E8	2017	Бифенил	
286			н/о	E9	2017	Бифенил	
287			н/о	E10	2017	Бифенил/ПХБ	
288			н/о	E17	2017	Бифенил/ПХБ	
289			н/о	E18	2017	Бифенил/ПХБ	
290			н/о	E19	2017	Бифенил	
291			н/о	E33	2017	Бифенил	
292			н/о	E37	2017	Бифенил/ПХБ	
293	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Terrabacter</i>	<i>carboxydivorans</i>	WD16p	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ	
294				н/о	WD21.3	2014	Бифенил/ПХБ
295				н/о	WD11p	2014	ХБК
296				н/о	WD12p	2014	ХБК, Бифенил/ПХБ
297				н/о	WD14p	2014	Бифенил/ПХБ
298				н/о	WD15p	2014	Бифенил/ПХБ
299				н/о	WD16.1	2014	Бифенил/ПХБ
300				н/о	WD30	2014	ХБК
301				н/о	WD38	2014	ХБК
Штаммы, выделенные из образцов почв с территорий Республики Бурятия							
302	<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	н/о	SSE4a	2010	Бифенил	
303			н/о	SKE3	2010	Бифенил	
304			н/о	SKE2a	2010	Бифенил	
305	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Halomonas</i>	н/о	SBE14	2010	Бифенил/ПХБ	
306	<i>Actinobacteria, Actinomycetia</i>	<i>Isoptricola</i>	н/о	SSE3a	2010	Бифенил/ПХБ	
307			н/о	SSE2	2010	Бифенил/ПХБ	
308			н/о	SSE2a	2010	Бифенил	
309	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	SBE14a	2010	Бифенил	
310			н/о	SKE2	2010	Бифенил/ПХБ	

1	2	3	4	5	6	7
311	<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	н/о	SKE1	2010	Бифенил/ПХБ
312			н/о	SKE11	2010	Бифенил
313			н/о	SKE4	2010	Бифенил/ПХБ

*названия таксономических единиц приведены в соответствии с классификацией, представленной в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy>) на 10.02.2022, **н/о – видовую принадлежность штамма не определяли

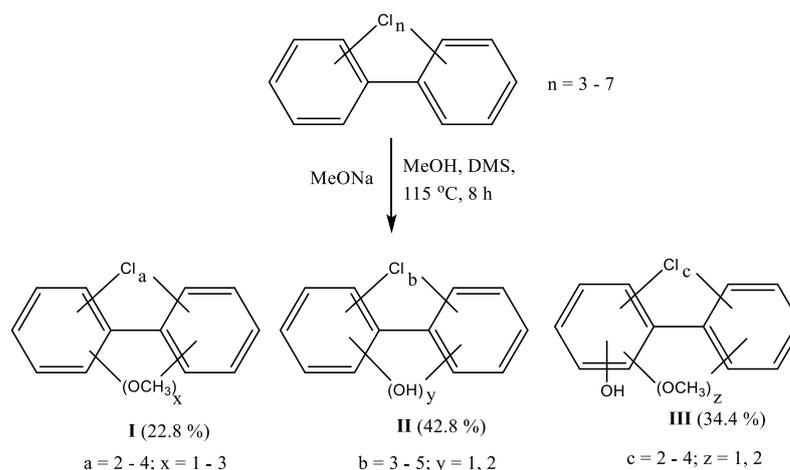


Рисунок 81 – Схема синтеза смеси **GM** в результате реакции смеси ПХБ марки «Совол» с **MeONa** в среде **MeOH** и **DMCO**: I – метокси-ПХБ, II – гидрокси-ПХБ, III - метокси(гидрокси)-ПХБ (Егорова и др., 2019).

Таблица 39 – **Качественный состав смеси GM***

Исходные ПХБ	Продукт	Шифр продукта (шифр на рис.)	Число изомеров
ПХБ-Cl ₃	ПХБ-Cl ₂ (OCH ₃)	1 (I)	2
ПХБ-Cl ₄	ПХБ-Cl ₂ (OCH ₃) ₂	2 (I)	11
	ПХБ-Cl ₃ (OCH ₃)	3 (I)	8
	ПХБ-Cl ₃ (OH)	4 (II)	8
	ПХБ-Cl ₂ (OCH ₃)(OH)	5 (III)	3
ПХБ-Cl ₅	ПХБ-Cl ₂ (OCH ₃) ₃	6 (I)	4
	ПХБ-Cl ₃ (OCH ₃) ₂	7 (I)	4
	ПХБ-Cl ₄ (OCH ₃)	8 (I)	1
	ПХБ-Cl ₃ (OH) ₂	9 (II)	7
	ПХБ-Cl ₄ (OH)	10 (II)	15
	ПХБ-Cl ₂ (OCH ₃) ₂ (OH)	11 (III)	5
	ПХБ-Cl ₃ (OCH ₃)(OH)	12 (III)	20
ПХБ-Cl ₆	ПХБ-Cl ₄ (OH) ₂	13 (II)	12
	ПХБ-Cl ₅ (OH)	14 (II)	2
	ПХБ-Cl ₃ (OCH ₃) ₂ (OH)	15 (III)	6
	ПХБ-Cl ₄ (OCH ₃)(OH)	16 (III)	13

* Смесь получена экспериментально в «ИОС УрО РАН» (Егорова и др., 2019)

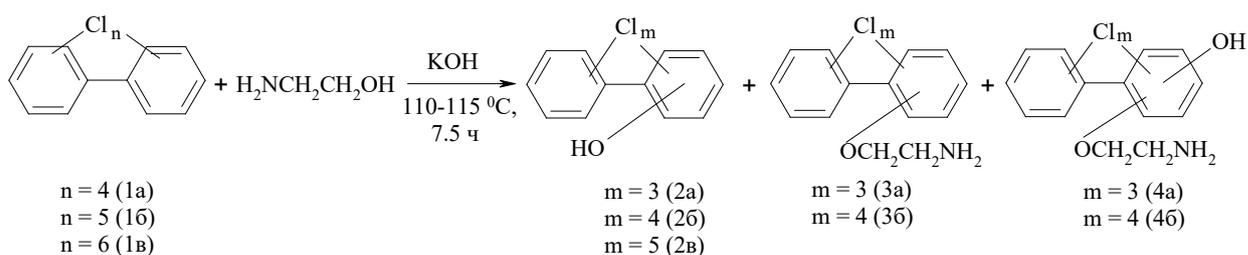


Рисунок 82 – Схема получения смеси ГА в результате реакции смеси ПХБ марки Совол с 2-аминоэтанолом: 1 –ПХБ, 2 – гидроксипХБ, 3 -аминоэтокси-ПХБ, 4 – гидроксипаминоэтокси-ПХБ

Таблица 40 – Данные ГХ-МС и оценка относительного содержания компонентов в смеси ГА*

Шифр соед.	Брутто-формула	Молекуляр- ный ион, m/z	Характерис- тичный ион, m/z	Содержа- ние, %
1а	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	290	292	16.2
1б	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	324	326	1.7
2а	C ₁₂ H ₆ Cl ₃ OH	272	272	2.9
2б	C ₁₂ H ₅ Cl ₄ OH	306	308	56.0
2в	C ₁₂ H ₄ Cl ₅ OH	340	342	4.1
3а	C ₁₂ H ₆ Cl ₃ (OCH ₂ CH ₂ NH ₂)	315	279	4.3
3б	C ₁₂ H ₅ Cl ₄ (OCH ₂ CH ₂ NH ₂)	349	313	10.7
4а	C ₁₂ H ₅ Cl ₃ (OCH ₂ CH ₂ NH ₂)(OH)	331	295	2.7
4б	C ₁₂ H ₄ Cl ₄ (OCH ₂ CH ₂ NH ₂)(OH)	365	329	0.7

* Смесь получена экспериментально в «ИОС УрО РАН» (Горбунова и др., 2014)

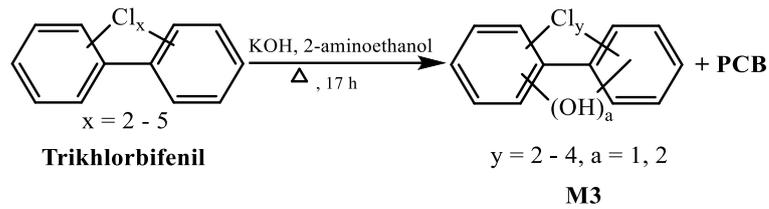


Рисунок 83 – Получение смеси М3 в результате гидроксилирования смеси Трихлорбифенил (Gorbunova *et al.*, 2021)

Таблица 41 – Относительная количественная оценка содержания компонентов смеси М3*

Соединение	Молекулярная масса, Да	Содержание, %**
Дихлорбифенилы ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2$)	222	12.8
Трихлорбифенилы ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3$)	256	7.7
Гидрокси-дихлорбифенилы ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{OH}$)	238	48.6
Гидрокси-трихлорбифенилы ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_3\text{OH}$)	272	30.9

* Смесь получена экспериментально в «ИОС УрО РАН» (Gorbunova *et al.*, 2021); ** расчет по методу внутренней нормализации по площадям пиков

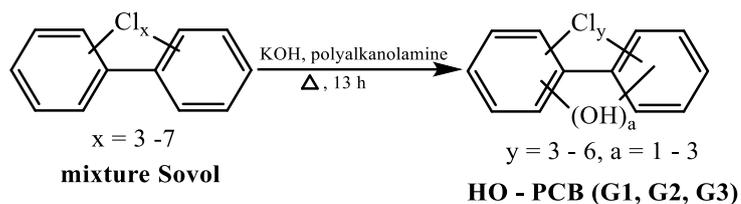


Рисунок 84 – Получение смесей G в результате взаимодействия смеси ПХБ марки Совол с КОН в среде полиалканоламинов (Горбунова и др., 2019)

Таблица 42 – Состав смесей G, полученных на основе коммерческой смеси ПХБ марки Совол *

№ № п./п.	Полученные соединения	Относительное содержание соединений в смесях, %		
		G1	G2	G3
	ПХБ			
1	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3$	0.8	0.2	0.2
2	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_4$	3.4	13.6	11.2
3	$\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_5$	–	2.8	1.3
4	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_6$	–	0.2	0.1
Всего ПХБ		4.2	16.8	12.8
	НО-ПХБ			
5	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_3\text{OH}$	16.8	4.7	7.1
6	$\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_4\text{OH}$	46.4	57.3	60.0
7	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_5\text{OH}$	0.6	11.7	10.6
8	$\text{C}_{12}\text{H}_3\text{Cl}_6\text{OH}$	–	0.1	–
9	$\text{C}_{12}\text{H}_5\text{Cl}_3(\text{OH})_2$	14.4	0.7	2.3
10	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_4(\text{OH})_2$	14.6	8.7	7.2
12	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_3(\text{OH})_3$	3.0	–	–
Всего НО-ПХБ		95.8	83.2	87.2

* Смесь получена экспериментально в «ИОС УрО РАН» (Горбунова и др., 2019, Egorova *et al.*, 2020)

Фрагмент копии уведомления о результатах проведения государственной экологической экспертизы микробиологического препарата «Полихлорокс»*

УВЕДОМЛЕНИЕ
О РЕЗУЛЬТАТАХ ПРОВЕДЕНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

№	наименование проекта	заказчик экспертизы	дата и № приказа об утверждении	результат
1.	Новая технология и оборудование «Система сбора и обезвреживания свалочного газа в высокотемпературных факельных установках»	ООО «ЭКОКОМ»	29.10.2019 №101-Э	отрицательное заключение
2.	Организация движения поездов на Московском центральном кольце с 4-минутным интервалом в час пик» титул «Строительство пункта отстоя и уборки электропоездов, пункта явки и отдыха локомотивных бригад на ст. Белокаменная 7 этап»	ДКРС-Москва ОАО «РЖД»	08.07.2019 092-Э	отрицательное заключение

№	наименование проекта	заказчик экспертизы	дата и № приказа об утверждении	результат
388.	Микробиологический препарат «Полихлорокс» ТУ 9291-001-13787869-2013	ООО «Эмульсионные технологии»	12.03.2015 023-Э	положительное заключение
389.	Проектная документация «Реконструкция газораспределительной сети. Газопровод высокого давления в районе КРП-15 г. Балашиха Московской области	ГУП МО «Мособлгаз» «Балашиха межрайгаз»	27.02.2015 022-Э	отрицательное заключение
390.	Проект технической документации проведения летных испытаний комплекса «128» на космодроме «Плесецк»	ОАО «ГРЦ Макеева»	19.02.2015 016-Э	положительное заключение
391.	Нутривант марки: 18-18-18+2MgO, 18-18-18+3MgO, 18-18-18+4MgO	Представительство БВО Коммерческая компания «Нутритех Систем Инк.»	11.02.2015 015-Э	положительное заключение

* ООО «Эмульсионные технологии» (<http://eco-emt.ru>, <https://гражданская-позиция.рф>) (дата обращения 01.02.2022)