

Кириянова Татьяна Денисовна

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

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2025

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

Научный руководитель

Егорова Дарья Олеговна, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научным вопросам «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии техногенных экосистем «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Коршунова Татьяна Юрьевна – доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Уфимского института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, заведующая лабораторией биотехнологий Уфимского института биологии.

Соляникова Инна Петровна – доктор биологических наук, профессор, руководитель регионального микробиологического центра Белгородского государственного национального исследовательского университета, профессор кафедры биологии Института фармации, химии и биологии Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» (410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13).

Защита состоится «14» ноября 2025 г. в _____ на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permisc.ru>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время проблема очистки окружающей среды от токсичных и устойчивых соединений, образовавшихся в результате промышленной деятельности человека, приобретает все большую актуальность. Полихлорированные бифенилы (ПХБ) принадлежат к числу наиболее распространенных и экологически значимых загрязнителей биосферы (Reddy *et al.*, 2019; Devi *et al.*, 2020). Согласно Стокгольмской конвенции «О стойких органических загрязнителях» (2001 г.), ПХБ запрещены к производству и применению как особо опасные для животных и человека соединения, а их запасы должны быть уничтожены (<http://chm.pops.int>). Россия приняла на себя обязательства по выполнению положений Стокгольмской конвенции в 2011 г., согласно Федерального закона № 164-ФЗ от 27.06.2011. По различным подсчетам в мире было произведено более 1,5 млн. т ПХБ, в том числе 180 тыс. т на территории России, из них более 30 % попало в природные объекты.

Основной путь трансформации ПХБ в окружающей среде связан с микробной деструкцией (Agulló *et al.*, 2019; Negret-Bolagay *et al.*, 2021). Исследование механизмов микробной трансформации этих соединений имеет важное значение для разработки методов биоремедиации почв и донных отложений, загрязненных ПХБ. Оценка биохимических и генетических особенностей микроорганизмов, способных разлагать ПХБ, является ключевым шагом для создания эффективных биопрепаратов для очистки окружающей среды. В последние десятилетия активно разрабатываются новые технологии, основанные на применении микроорганизмов для детоксикации загрязненных территорий (Mizukami-Murata *et al.*, 2016; Negret-Bolagay *et al.*, 2021; Valizadeh *et al.*, 2021; Šrédlová, Cajthaml, 2022).

В результате воздействия абиотических процессов и биотических факторов на молекулы ПХБ в окружающей среде, происходит формирование гидроксилированных ПХБ (НО-ПХБ), признанных в настоящее время вторичными поллютантами (Tehrani, Van Aken, 2014; Luo *et al.*, 2016; Goto *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Внедрение только одной гидрокси-группы в молекулу ПХБ приводит к четырехкратному увеличению числа возможных соединений (с 209 конгенов ПХБ до 839 моноНО-ПХБ). В отличие от исходных соединений, НО-ПХБ дольше сохраняются в окружающей среде, что обусловлено их низкой летучестью (Sun *et al.*, 2016). С одной стороны – НО-ПХБ более токсичны чем ПХБ, с другой – более доступны для микробной деградации за счет увеличенной гидрофильности (Tehrani, Van Aken, 2014; Mizukami-Murata *et al.*, 2016). Анализ территорий, загрязненных ПХБ, выявил присутствие значимых доз НО-ПХБ (Saktrakulkla *et al.*, 2022). В связи с этим, для обеспечения эффективной ремедиации требуются бактериальные штаммы с высоким потенциалом разрушения хлорированных и гидроксилированных бифенилов.

Ключевую роль в процессах биodeградации ПХБ и НО-ПХБ играет фермент бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA), катализирующий первый этап аэробной бактериальной трансформации данных соединений (Elangovan *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Моделирование структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) имеет важное значение для понимания механизмов действия фермента и его взаимодействия с различными субстратами (Baig, Manickam, 2010; Cao *et al.*, 2011). Структурные исследования BphA1 позволяют предсказать его активность и направленность действия на разные конгены ПХБ и НО-ПХБ, что открывает возможности для модификации фермента и создания штаммов микроорганизмов с высоким биоремедиационным потенциалом (Zhao *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

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

Основные задачи исследования:

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

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

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

4. Провести полногеномный анализ штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus opacus* CN628 (ВКМ Ас-3029) с целью идентификации генов/ферментов, обуславливающих деградацию бифенила, хлор- и гидроксизамещенных бифенилов, и разработать теоретическую модель пространственной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деградации бифенила.

Научная новизна. Получены новые сведения о сукцессионных процессах, протекающих в аэробных бактериальных сообществах, выделенных из антропогенно загрязненных почв г. Перми и г. Чапаевска, при воздействии коммерческой смеси ПХБ марки Совол и незамещенного бифенила. Установлено, что в составе бактериальных сообществ, сформированных под действием Совола, присутствуют представители классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Chitinophagia*. Смена селективного фактора на бифенил привела к снижению биоразнообразия в исследуемых бактериальных ассоциациях. Штаммы-деструкторы бифенила, выделенные из стабильных бифенил-деградирующих ассоциаций, принадлежат классам *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Actinomycetia*. Следует отметить, что способность к разложению бифенила для представителей родов *Bosea* (класс *Alphaproteobacteria*) и *Pseudoxanthomonas* (класс *Gammaproteobacteria*) описана впервые.

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

Впервые проведен полногеномный анализ штамма *Rhodococcus opacus* CN628 (ВКМ Ас-3029) – проявляющего высокую деградативную активность к хлорированным и гидроксированным бифенилам, а также к их коммерческим и экспериментальным смесям. Выявлены гены/ферменты, участвующие в окислении бифенила и его производных. Разработаны и проанализированы три модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*BphA1*) штамма *R. opacus* CN628. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего структурного и биохимического изучения бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *R. opacus* CN628.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведённое исследование расширяет современные научные представления о микробной деструкции хлор- и гидроксизамещенных бифенилов и вносит вклад в развитие экологически ориентированных биотехнологий. Проведён комплексный анализ функционально-генетических особенностей новых штаммов-деструкторов, выделенных в результате селективного культивирования из

длительно загрязненных почв. Экспериментально обоснована деградационная активность исследованных штаммов по отношению к хлорированным и гидроксированным бифенилам, что позволило определить наиболее перспективные штаммы для практического применения в задачах биоремедиации. Штаммы *Achromobacter* sp. PNB6, *Brevibacterium* sp. PNB5, *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5, *Rhodococcus opacus* CH628, *Stenotrophomonas* sp. PNS6 депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов под номерами В-3791, Ас-3018, Ас-3022, В-3792, Ас-3029 и В-3793 соответственно.

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

Дополнительную научную значимость представляет создание в рамках исследования трёхмерных моделей ключевого фермента биодеструкции замещенных бифенилов – α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), что позволяет углублённо анализировать структурно-функциональные характеристики BphA1 и закладывает основу для последующих *in silico*-экспериментов по модификации ферментативной активности.

Полученные результаты используются в лекционном курсе «Экотехнологии в природопользовании» ФГАОУ ВО «ПГНИУ» (г. Пермь).

Основные положения, выносимые на защиту:

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

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

3. Штаммы-деструкторы бифенила родов *Achromobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* и *Rhodococcus* эффективно разлагают моно(хлор/гидрокси)- и дихлорбифенилы (> 90 %). Наиболее перспективным является штамм *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029), осуществляющий разложение индивидуальных (моно-тетра)-замещенных хлор/гидроксибифенилов, а также их коммерческих и экспериментальных смесей (эффективность деструкции 97,8–100 % в течение 2–14 сут).

4. Штамм *Rhodococcus opacus* CH628 (ВКМ Ас-3029) содержит гены/ферменты, обуславливающие трансформацию хлор- и гидрокси-замещенных бифенилов по классическому окислительному пути разложения бифенила. Созданные 3D-модели

α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы – ключевого фермента деградации бифенила, позволили провести анализ активного центра и структуры молекулы фермента.

Апробация работы и публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе 7 статей в журналах, входящих в международные базы цитирования Web of Science, Scopus, Белый список (Уровни 1–3), 1 статья в журнале списка ВАК, 1 статья в журнале РИНЦ. Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия», Пермь, 2019; VII Международной научно-практической конференции «Global Science and Innovations 2019: Central Asia», Нур-Султан, Казахстан, 2019; 24-й и 28-й Пущинской школе-конференции «Биология – наука XXI века», Пущино, 2020, 2025; IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков «OpenBio», Новосибирск, 2022; IX Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», Пущино, 2023.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицу, 48 рисунков и 2 схемы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 317 литературных источников, в том числе 15 отечественных и 302 зарубежных.

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

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

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

Благодарности

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

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среды и условия культивирования. Выделение и культивирование микроорганизмов-деструкторов осуществляли на минеральной среде K1 (Зайцев, Карасевич, 1981). Для описания морфологии штаммы культивировали на среде Luria-Bertany (LB) (Маниатис и соавт., 1984). Для получения плотной среды вносили 1,5 % агара («Difco», США). В работе использованы минеральные соли производства ЗАО «НПО Экрос» и ЗАО «НПК Криохром» (Россия) и органические компоненты сред производства «Sigma-Aldrich» (США, Германия).

Периодическое культивирование осуществляли в среде K1 в условиях аэрирования на термостатируемой круговой качалке Environmental Shaker-Incubator ES 20/60 («BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28 °С с внесением бифенила в качестве источника углерода (1 г/л). Плотность культуры контролировали каждые 24 ч на спектрофотометре BioSpec-mini («Shimadzu», Япония), при длине волны 600 нм.

Коммерческие соединения. В работе использовали аналитически чистые химические реактивы: моногидроксифенилы, моно- и дигидроксibenзойные кислоты, катехол, моноклорбензойные кислоты, моноклорбифенилы и 2,4'-дихлорбифенил производства «Sigma-Aldrich» (Германия), бифенил – «ACROS-organics» (США), Трихлорбифенил (ОСТ 6-01-24-85, Россия), Совол (ОСТ 06-01-24-75, Россия).

Соединения, синтезированные для целей настоящего исследования. Синтез конгенов хлорбифенилов и смесей гидроксилированных хлорбифенилов произведен в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН д.х.н. Горбуновой Т.И. (Таблица 1).

Таблица 1 – Соединения и смеси, синтезированные для настоящего исследования

ПХБ / смесь ПХБ	Смесь НО-ПХБ	Основные группы соединений в смеси, %			Ссылка
		ПХБ	НО-ПХБ	(НО) ₂ -ПХБ	
3,4-диХБ	Р	1,68	98,42	–	Горбунова и соавт., 2019
2,4,5-триХБ	М1	–	100	–	Gorbunova <i>et al.</i> , 2021
2,4,6-триХБ	М2	–	100	–	Gorbunova <i>et al.</i> , 2021
2,5,3',4'-тетраХБ	Т	–	67,49	32,51	Kir'yanova <i>et al.</i> , 2023
Трихлорбифенил	М3	20,5	79,5	–	Gorbunova <i>et al.</i> , 2021
Совол	G1	4	64	32	Egorova <i>et al.</i> , 2020
	G2	15	75	10	
	G3	13	78	9	

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



Рисунок 1 – Схема селекции бактериальных ассоциаций

Биоразнообразие оценивали на морфологическом и генетическом уровнях. Морфологическое описание колоний и клеток проводили согласно (Нетрусов и соавт., 2005). В один морфотип объединяли колонии, идентичные по всем описываемым критериям.

Выделение и описание индивидуальных штаммов. Из бактериальных ассоциаций PN2-S и PN2-B путем культивирования на агаризованной среде K1 в парах бифенила, были выделены индивидуальные штаммы бактерий-деструкторов. Чистоту культур контролировали по однородности колоний при высеве на агаризованную среду LB.

Коллекционный штамм-деструктор стойких органических загрязнителей. В работе использован штамм *Rhodococcus opacus* CH628 (VKM Ac-3029), проявляющий деградативную активность в отношении дихлордифенилтрихлорэтана и гексахлорциклогексана, выделенный из почв ОАО «СВЗХ» (Егорова и соавт., 2017; Egorova *et al.*, 2017).

Молекулярно-генетические методы. *Тотальную ДНК* из бактериальных ассоциаций и штаммов выделяли стандартными методами (Ausbel *et al.*, 1995). Для анализа состава бактериальных ассоциаций использовали метод *денатурирующего градиентного геле-электрофореза (ДГГЭ)*: амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, проводили с применением праймеров: 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост на 5'-конце, и 518R в термоциклере My Cycler («Bio-Rad», США) (Muyzer *et al.*, 1993); ДГГЭ фрагментов гена 16S рРНК выполняли в 6 % (в/об) полиакриламидном геле, содержащем линейный денатурирующий химический градиент от 30 до 60 %, где 100 % составляет 7М мочевины и 40 % формамид, в течение 16 ч при 45 V и 60 °C на Dcode™ Universal Mutation System («Bio-Rad», США). Гели окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) 15 мин и документировали в системе Gel Doc XR в проходящем УФ-свете («Bio-Rad», США). Анализ ДГГЭ-профилей осуществляли путем детекции полос в геле, используя алгоритм поиска полос пакета программ Quantity One версия 4.6 («Bio-Rad», США). Полученные ДГГЭ-профили были проанализированы с помощью индекса Шеннона-Уивера и коэффициента выравнивания. *Генетическое типирование бактерий-деструкторов* осуществляли методом ВОХ-ПЦР по стандартной методике (Versalovic *et al.*, 1994). *Определение последовательности генов 16S рРНК*, полученных из ДНК ассоциаций методом ДГГЭ и амплифицированных на матрице ДНК штаммов бактерий с универсальными праймерами (Tirola *et al.*, 2002), осуществляли на приборе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США), с применением реактивов Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v 3.1 («Applied Biosystems», США) и анализировали с использованием программы CLUSTAL X 1.83. Поиск гомологичных последовательностей произведен по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>). *Амплификацию генов benA и bphA1* проводили с классическими праймерами и согласно протоколов (Baldwin *et al.*, 2003; Baggi *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2008) на приборе MyCycler («BioRad», США), размер ожидаемого фрагмента около 500 п.н. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1 % агарозном геле в 1x Трис-боратном буфере («Thermo Scientific», Литва) при напряжении 10 V/см и визуализировали в проходящем УФ-свете в системе Gel Doc XR™ («Bio-Rad», США) после окрашивания в растворе бромистого этидия. Нуклеотидную последовательность определяли как описано выше. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и bphA1 депонировали в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *Анализ штаммов на наличие плазмидной ДНК* выполняли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II («Bio-Rad», США), согласно протоколам производителя. В качестве маркера молекулярных масс для оценки размера внехромосомальной ДНК использовали «DNA Size Markers – Yeast Chromosomal» («Bio-Rad», США). *Полногеномное секвенирование* штамма *R. opacus* CH628 проводили на приборе Illumina HiSeq 1500 (США) на базе ЗАО «Геноаналитика» (Москва, Россия). *Биоинформатический анализ* генома штамма осуществляли с применением программ/сервисов SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades>),

PATRIC 3.6.6. (<https://patricbrc.org>), RAST (<https://rast.nmpdr.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Полный геном штамма CH628 депонирован в базу данных NCBI под номером JBLZMV000000000. Поиск функциональных генов, участвующих в метаболизме бифенила, осуществляли с использованием автоматического аннотирования полного генома штамма CH628 в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>). Анализ метаболических путей на основании выявленных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием базы данных KEGG (<http://www.genome.jp>) и сервиса RAST (<https://rast.nmpdr.org>).

Моделирование α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1). Первичную структуру BphA1 штамма *R. opacus* CH628 получали на основании нуклеотидной последовательности гена *bphA1*_{CH628} (GenBank MW070532) с использованием программы MEGA X (<https://www.megasoftware.net>). Уровень сходства с гомологичными последовательностями, выявленными в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), визуализировали в MEGA X (<https://www.megasoftware.net>). Для построения вторичной и третичной структуры BphA1_{CH628} использовали программы MODELLER версии 10.4 (<https://salilab.org/modeller>), AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta>). Поиск шаблонов осуществляли с помощью NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ограничивая зону поиска базами данных Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) и UniProt (<https://www.uniprot.org/>), применяя для выравнивания SWISSMODEL. Определение качества белковой модели осуществляли с использованием программ PyMOL версии 2.5.4 (<https://pymol.org/>), ERRAT (Colovos, Yeates, 1993), VERIFY 3D (Lüthy *et al.*, 1992), PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>), WHATCHECK (<https://swift.cmbi.umcn.nl/gv/whatcheck/index.html>), ENDscript (<https://endscript.ibcp.fr/ESPript/ENDscript/>). Для поиска и анализа области активного центра BphA1_{CH628} использовали программу CASTp (Tian *et al.*, 2018).

Эксперименты по деградации хлор- и гидроксизамещенных бифенилов и их смесей. Основные этапы эксперимента представлены на рисунке 2.

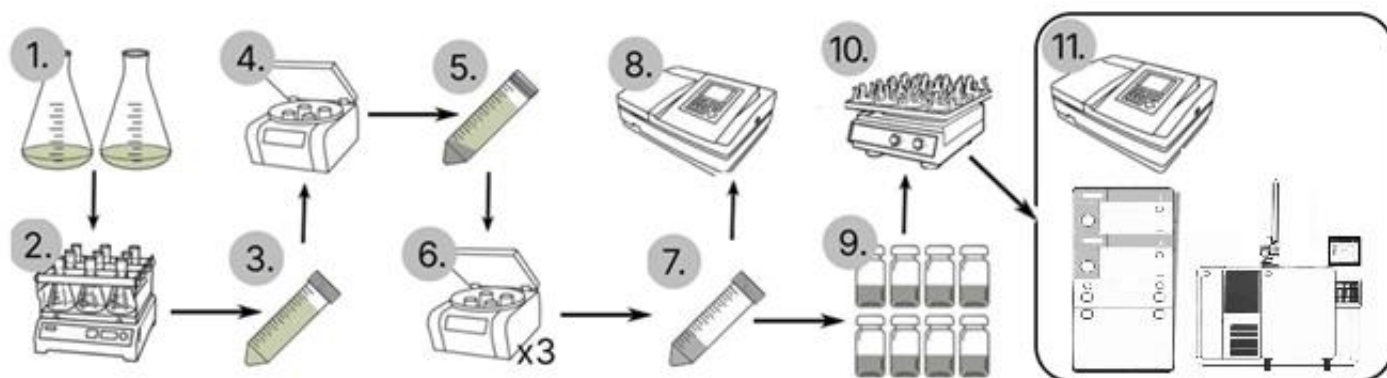


Рисунок 2 – Этапы эксперимента по анализу деградативной активности штаммов: 1, 2 – периодическое культивирование штамма/ассоциации в среде K1 с внесением бифенила (1 г/л) до середины логарифмической фазы при +28 °C с аэрацией на круговом шейкере Environmental Shaker-Incubator ES 20/60 («BioSan», Латвия); 3–6 – концентрирование бактериальной культуры, клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием на центрифуге K3 («Sartorius», Германия); 7 – бактериальную культуру ресуспендировали в минеральной среде K1 до ОП₆₀₀=2,0; 8 – оптическую плотность контролировали на спектрофотометр BioСpec-mini («Shimadzu», Япония); 9 – бактериальную культуру (990 мкл) помещали в стерильные флаконы с тефлоновыми крышками и вносили субстрат (ПХБ, НО-ПХБ, коммерческие и экспериментальные смеси, концентрации указаны в последующих разделах); 10 – флаконы инкубировали на шейкере Environmental Shaker-Incubator ES 20/60 («BioSan», Латвия) 200 об/мин при 28 °C, пробы отбирали в зависимости от схемы эксперимента на 0, 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сутки; 11 – культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием (центрифуга

miniSpin, «Eppendorf», Германия), наличие субстрата и метаболитов определяли спектрофотометрически, а также с использованием методов ВЭЖХ и ГХ-МС согласно методик описанных (Egorova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021).

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

Аналитические методы. Количественный и качественный анализ ПХБ и НО-ХБ в культуральной жидкости осуществляли методом газовой хроматографии с использованием масс-селективного детектора (ГХ-МС) на приборе Agilent GC 7890A MSD 5975C inert XL EI/CI («Agilent Technology», США) согласно (Egorova *et al.*, 2020; Gorbunova *et al.*, 2021). Культуральную жидкость предварительно экстрагировали смесью конц. H_2SO_4 –12,5 %-ный ДДС-На-гексан (1:10:25) в течение 60 мин при 30 °С, скорость перемешивания 200 об/мин (Plotnikova *et al.*, 2012). Наличие в культуральной жидкости хлор-, гидрокси- и хлоргидроксибензойных кислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20A («Shimadzu», Япония) с колонкой Discovery C18 (150 x 4,6 мм или 250 x 4,6 мм) («Supelco», «Sigma-Aldrich», США) и УФ-детектором при 205 нм. Анализ проводили в системе ацетонитрил-0,1 %-ый H_3PO_4 (70:30). Идентификация - с помощью сравнения времени удержания на колонке исследуемых и стандартных соединений. Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений (Egorova *et al.*, 2010). Образование продуктов *мета*-расщепления ароматического кольца (хлор/гидрокси)бифенилов – 2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК) анализировали в надосадочной жидкости на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при $\lambda_{\text{макс}}$ 390–440 нм. Динамику дегалогенирования субстратов контролировали спектрофотометрически по реакции с 5 %-ным азотнокислым серебром.

Расчет кинетических параметров роста штамма и утилизации субстратов. Удельную скорость роста бактериальных штаммов/ассоциаций, рассчитывали по формуле:

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

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

Эффективность деструкции субстрата (1), удельную скорость деструкции субстрата (2), скорость деструкции 2,5,3',4'-тетрахлорбифенила и смеси Т(3) рассчитывали согласно:

$$Д(\%) = 100 - ((C_t \times 100) / C_0) \quad (1)$$

$$V_{\text{уд}} = (\text{Ln}C_0 - \text{Ln}C_t) / (t_i - t_0) \quad (2)$$

$$V = (C_0 - C_t) / ((t_i - t_0) \cdot C_{\text{клет}}) \quad (3)$$

где C_t – концентрация субстрата в конечный момент времени; C_0 – концентрация субстрата в начальный момент времени, t_i – конечный момент времени, t_0 – начальный момент времени, $C_{\text{клет}}$ – концентрация клеток штамма.

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

Статистические методы. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0. При обработке результатов вычисляли среднее арифметическое, средне квадратичное отклонение, достоверность результата, корреляцию Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ассоциации аэробных бактерий, полученные в результате культивирования на (хлор)ароматических соединений, и их биodeградативный потенциал. В результате накопительного культивирования с использованием в качестве селективного фактора смеси ПХБ марки Совол из почв, отобранных на техногенно загрязненных территориях г. Пермь и г. Чапаевск, получено шесть бактериальных смешанных культур (таблица 2).

Таблица 2 – Плотность популяции и биоразнообразие бактериальных ассоциаций после культивирования с Соволом как селективным фактором

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

Оценка биоразнообразия на морфологическом и генетическом уровнях показала, что наиболее высокие показатели характерны для смешанных культур PN1 и CHN1. Кластерный анализ на основании ДГГЭ-профилей исследуемых ассоциаций показал, что Совол оказывал вторичное действие на формирование сообществ. На дендрограмме сообщества из почв г. Перми (PN-культуры) и г. Чапаевска (CHN-культуры) формировали два самостоятельных кластера (уровень сходства между ними – 20 %), внутри которых уровень сходства составлял 25–56 %. На основании анализа 23 амплифицированных последовательностей генов 16S рРНК установлено, что в составе селекционированных сообществ присутствуют бактерии классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Chitinophagia*.

Смена селективного фактора и источника углерода с Совола на бифенил привела к снижению биоразнообразия в селекционированных ассоциациях (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели плотности, биоразнообразия и скорости роста бактериальных ассоциаций, при культивировании в среде K1 с внесением бифенила

Бактериальная ассоциация	Доминирующие морфотипы, шт.	Плотность популяции, КОЕ/мл	Удельная скорость роста, сут ⁻¹
PN1-B	2	$4,2 \times 10^4$	0,304
PN2-B	6	$1,5 \times 10^4$	0,516
CHN1-B	2	$5,0 \times 10^4$	0,222
CHN2-B	2	$3,2 \times 10^3$	0,309
CHN3-B	2	$6,0 \times 10^3$	0,230
CHN4-B	3	$4,5 \times 10^3$	0,284

Установлено, что ассоциация PN2-B характеризуется наиболее высокими значениями биоразнообразия и скорости роста среди исследуемых сообществ. В результате чего ассоциация PN2-B была отобрана для более подробного изучения биodeградативного потенциала.

Установлено, что ассоциация PN2-B за 2 сут осуществляет 100 %-ное разложение моноклорбифенилов (таблица 4). При разложении 3-ХБ и 4-ХБ отмечена отрицательная динамика изменения концентрации основного метаболита – хлорбензойной кислоты, что свидетельствует о его дальнейшей трансформации. Анализ количественных показателей, а также спектра образующихся соединений показал, что повышение степени хлорирования

бифенила приводит к увеличению времени и снижению эффективности деструкции, при этом трансформация субстратов наиболее вероятно протекает по классическому пути аэробной бактериальной деструкции бифенила.

Таблица 4 – Эффективность деструкции хлорбифенилов ассоциацией PN2-B

Субстрат	2-ХБ	3-ХБ	4-ХБ	2,4'-диХБ	Трихлор-бифенил	Совол
Концентрация, мг/л	94,5	94,5	94,5	22,3	13,8	13,8
Деструкция, %	100	100	100	86,2	38,4	50,9
Время, сут	2	2	2	2	3	3
ГОФДК, о.е.	0,334	0,682	0,211	1,411	н.д.	н.д.
ХБК, мг/л	74,5	6,4*	4,6**	0,2	+	+
Ионы хлора, мг/л	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	1,4	0,9

Примечание. * через 18 ч деструкции 19,7 мг/л, ** через 18 ч деструкции 7,1 мг/л, + только качественное определение, н.о. – не определяли, н.д. – не обнаружено

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

Штаммы-деструкторы бифенила, изолированные из ассоциаций. Из бактериальных ассоциаций PN2-S (название штаммов PNS) и PN2-B (название штаммов PNB) выделено 15 аэробных штаммов, способных использовать бифенил (1 г/л) как единственный источник углерода и энергии (рис. 3). Ростовые показатели штаммов PNS1, PNS5, PNS6 и PNB6 сопоставимы или превосходят аналогичные показатели известных штаммов-деструкторов ПХБ (Egorova *et al.*, 2013, Blanco-Moreno *et al.*, 2017, Horvatova *et al.*, 2018).

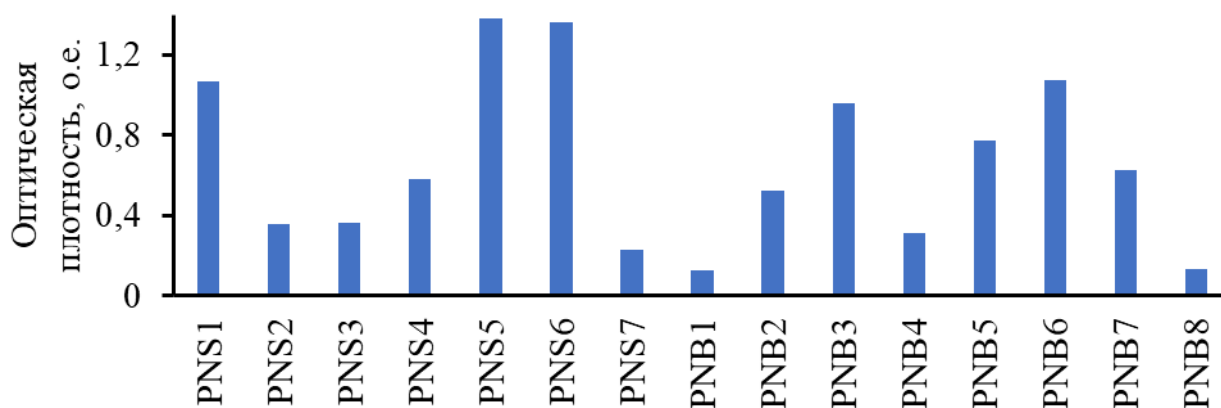


Рисунок 3 – Максимальная оптическая плотность культуры штаммов в среде K1 с внесением бифенила как источника углерода

Методом BOX-ПЦР было установлено, что штаммы PNS2, PNS7 и PNB2 формируют одну геномную группу. Также одинаковые ДНК-профили выявлены у штаммов PNB3 и PNB8. Внутри данных геномных групп выявлено 100 %-ное сходство гена 16S рРНК. Филогенетический анализ, проведенный на основании нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показал, что 9 штаммов принадлежат филуму *Proteobacteria* (классы *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria*), а 4 штамма — к филуму *Actinobacteria* (рис. 4). Штаммы *Micrococcus* sp. PNS1, *Ochrobactrum* sp. PNS5, *Stenotrophomonas* sp. PNS6, *Brevibacterium* sp. PNB5 и *Achromobacter* sp. PNB6 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами Ас-3022, В-3792, В-3793, Ас-3018 и В-3791 соответственно. Способность к разложению бифенила для представителей родов *Bosea* и *Pseudoxanthomonas* описана впервые.

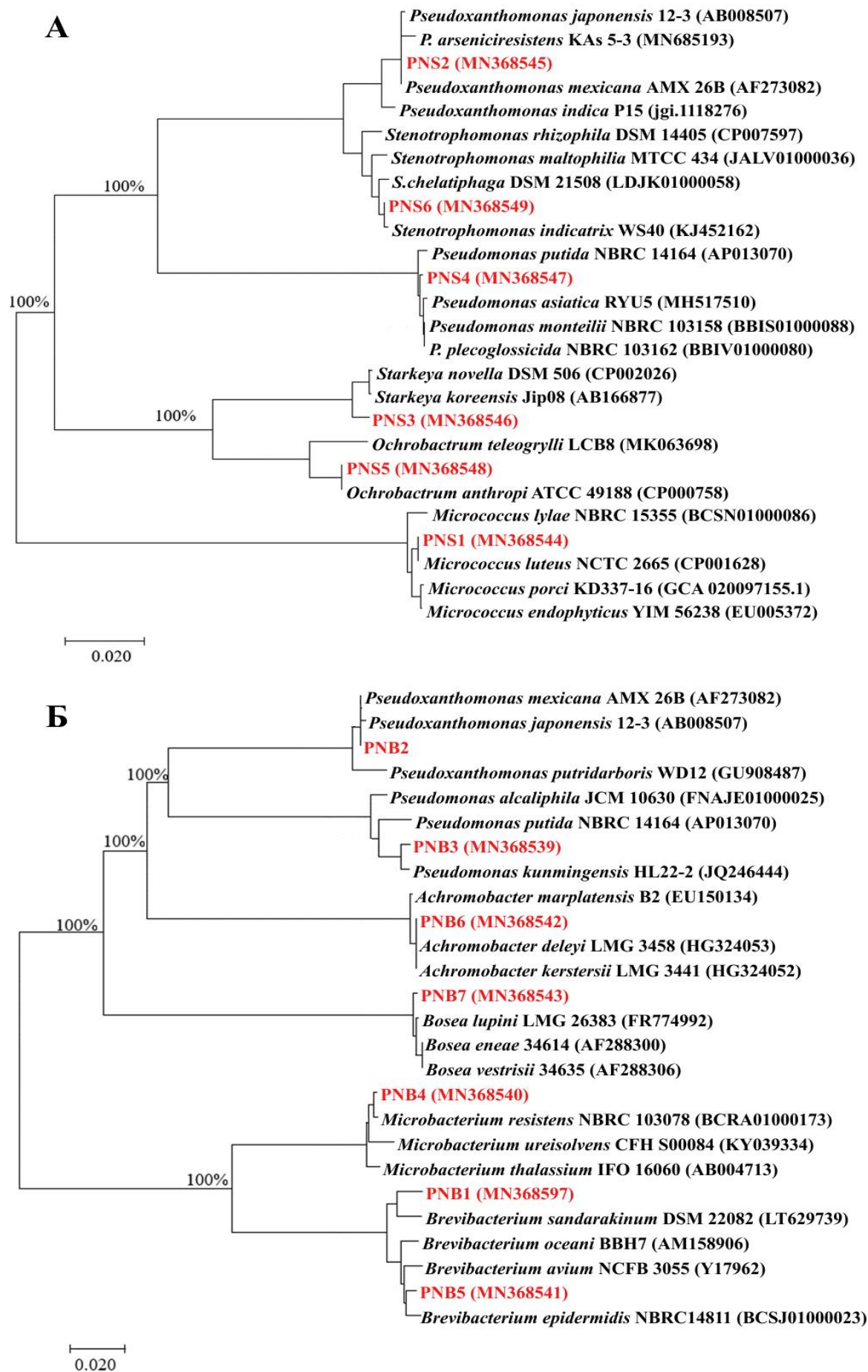


Рисунок 4 – Филогенетическое положение штаммов, выделенных из ассоциаций PN2-S (А) и PN2-B (Б). Дерево построено на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом neighbor-joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев). В скобках указаны номера нуклеотидных последовательностей в GenBank.

Исследование способности бактериальных штаммов трансформировать хлор- и гидрокси-замещенные бифенилы.

Моно-замещённые бифенилы. Установлено, что все исследованные штаммы осуществляют разложение моноклорбифенилов (таблица 5).

Таблица 5 – Разложение моноклорбифенилов (94,5 мг/л) индивидуальными штаммами

Штамм	Деструкция, %			ХБК, мг/л			ГОФДК, о.е		
	2-ХБ	3-ХБ	4-ХБ	2-ХБ	3-ХБ	4-ХБ	2-ХБ	3-ХБ	4-ХБ
PNB1	76,7±0,1	74,3±0,2	58,6±0,1	17,3±0,1*	62,7±0,2	43,8±0,4*	0	0	0,243
PNB3	57,3±0,2	67,8±0,3	87,6±0,2	18,4±0,3	55,9±0,1	47,5±0,5	0	0	0,221
PNB4	32,3±0,2	85,6±0,2	100	3,5±0,2*	71,6±0,2	63,7±0,3	0	0	0,225
PNB5	17,7±0,1	100	100	3,2±0,1	20,2±0,1*	5,3±0,2*	0	0	0,226
PNB6	48,9±0,3	98,3±0,3	80,9±0,3	2,9±0,2	68,9±0,1	58,0±0,1	0	0	0,237
PNB7	18,5±0,2	40,8±0,2	58,8±0,2	1,9±0,1*	33,4±0,3	48,1±0,2	0	0	0
PNS1	80,8±0,1	51,1±0,3	60,8±0,2	0	7,7±0,1*	5,1±0,1*	0	0	0
PNS2	22,6±0,1	36,2±0,3	96,7±0,3	0,8±0,1	3,4±0,2*	12,6±0,2	0	0	0,431
PNS3	80,9±0,2	82,6±0,2	97,8±0,5	0	13,3±0,6	72,1±0,2	0	0	0
PNS4	100	75,5±0,3	65,6±0,2	0	59,1±0,3	12,2±0,2*	0,393	0	0,263
PNS5	96,7±0,1	64,7±0,2	73,8±0,2	4,4±0,2	17,7±0,2*	48,1±0,1	0	0	0,231
PNS6	49,2±0,2	74,3±0,1	18,8±0,2	0	51,5±0,5*	1,3±0,3*	0	0	0
CH628	99,7±0,2	н.о.	96,9±0,2	0,5±0,1	н.о.	0,11±0,03	0	0	0

Примечание. * Концентрация ХБК через 48 ч культивирования ниже, чем через 18 ч культивирования, н.о. – не определяли

Эффективность деструкции варьировала в пределах 17,7–100 %, в качестве основного метаболита зафиксированы соответствующие хлорбензойные кислоты (ХБК), при этом накопление в среде ГОФДК отмечено только при разложении 4-ХБ, за исключением деструкции 2-ХБ штаммом *Pseudomonas* sp. PNS4.

На основании анализа метаболического профиля можно заключить, что представленные штаммы-деструкторы осуществляют разложение моноклорбифенилов по классическому пути бактериальной трансформации бифенила, а бифенил 2,3-диоксигеназа данных штаммов окисляет незамещенное кольцо молекулы моноклорированных бифенилов (рис. 5).

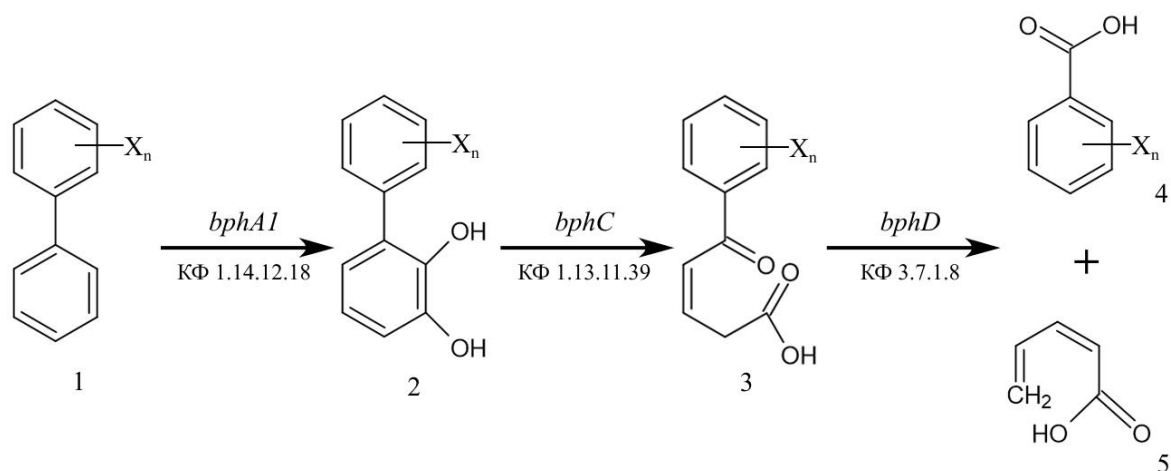


Рисунок 5 – Схема метаболического пути аэробной бактериальной деструкции замещенных бифенилов. X – заместитель (хлор- или гидрокси-группа), n – количество заместителей, 1 – замещенный бифенил, 2 – 2,3-дигидрокси-замещенный бифенил, 3 – ГОФДК, 4 – ХБК/НО-БК, 5 – пентадиеновая кислота

Установлено, что эффективность деструкции моноклорбифенилов зависит от расположения гидрокси-группы в молекуле бифенила (рис. 6). В случае, когда гидрокси-группа расположена у 3 углеродного атома молекулы бифенила, наибольшую активность проявляли

штаммы PNB5 и PNS1 (деструкция 96–98 %), а при разложении 4-гидроксибифенила штаммы PNB7 и PNS6 (деструкция 90–98 %). Анализ удельной скорости деструкции моно-замещенных бифенилов показал, что исследованные штаммы, за исключением штаммов *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *Achromobacter* sp. PNB6, осуществляют трансформацию моногидроксилированных бифенилов в 1,8–65,9 раза быстрее, чем монохлорированных бифенилов.

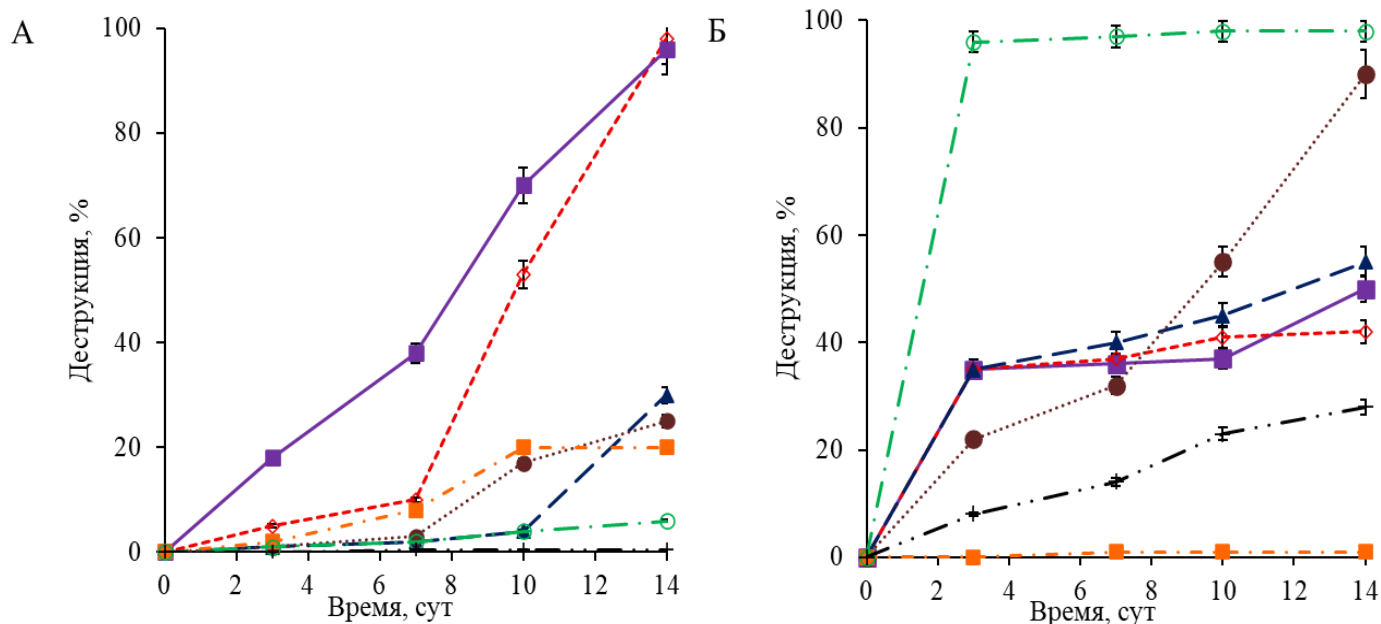


Рисунок 6 – Динамика деструкции 3-гидрокси- (А) и 4-гидрокси- (Б) бифенилов (0,5 г/л) штаммами *Achromobacter* sp. PNB6 (—■—), *Bosea* sp. PNB7 (—○—), *Brevibacterium* sp. PNB5 (—■—), *Micrococcus* sp. PNS1 (—◇—), *Ochrobactrum* sp. PNS5 (—+—), *Pseudomonas* sp. PNB3 (—▲—), *Stenotrophomonas* sp. PNS6 (—●—)

Качественный анализ метаболитов показал, что разложение моногидроксилированных бифенилов исследуемыми штаммами протекает по классическому пути окисления бифенила (рис. 5).

Ди-замещённые бифенилы. В результате скрининга установлено, что наиболее эффективно 2,4'-дихлорбифенил (2,4'-диХБ) разлагал штамм *R. opacus* CH628 (деструкция - 99,2 %), тогда как у остальных штаммов данный показатель составлял 15,7–78,6 %, что ниже, чем при разложении монозамещенных бифенилов (рис. 7).

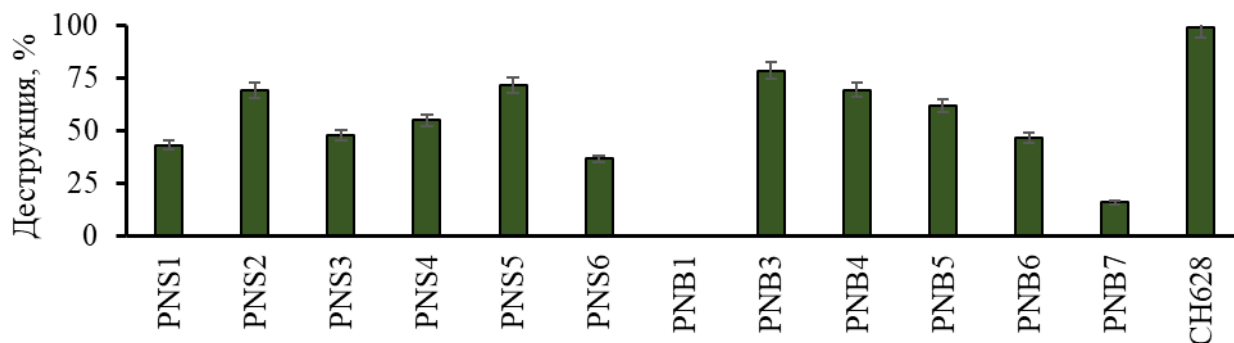


Рисунок 7 – Эффективность деструкции 2,4'-диХБ (0,1 г/л) исследуемыми штаммами

Анализ метаболитов показал, что у большинства представленных штаммов происходит окисление *орто*-хлорированного кольца молекулы 2,4'-диХБ с образованием 4-ХБК как основного метаболита. Исключение составили штамм *Achromobacter* PNB6, осуществлявший окисление *пара*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ с образованием 2-ХБК, и штаммы *Bosea* sp. PNB7, *Ochrobactrum* sp. PNS5 и *R. opacus* CH628, проявлявшие окислительную активность к обоим кольцам в молекуле 2,4'-диХБ.

Для дальнейшего исследования эффективности деструкции различных хлор- и гидроксизамещенных бифенилов был выбран штамм *R. oracis* CH628. Установлено, что штамм CH628 осуществляет 100 %-ю деструкцию 3,4-диХБ за 7 сут, а смеси Р, содержащую моногидроксимонохлорбифенилы (таблица 1), за 10 сут (рис. 8 А, Б). Учитывая, что основными метаболитами являются (хлор/гидрокси)бензойные кислоты, можно предположить что трансформация субстратов происходит как показано на рисунке 5.

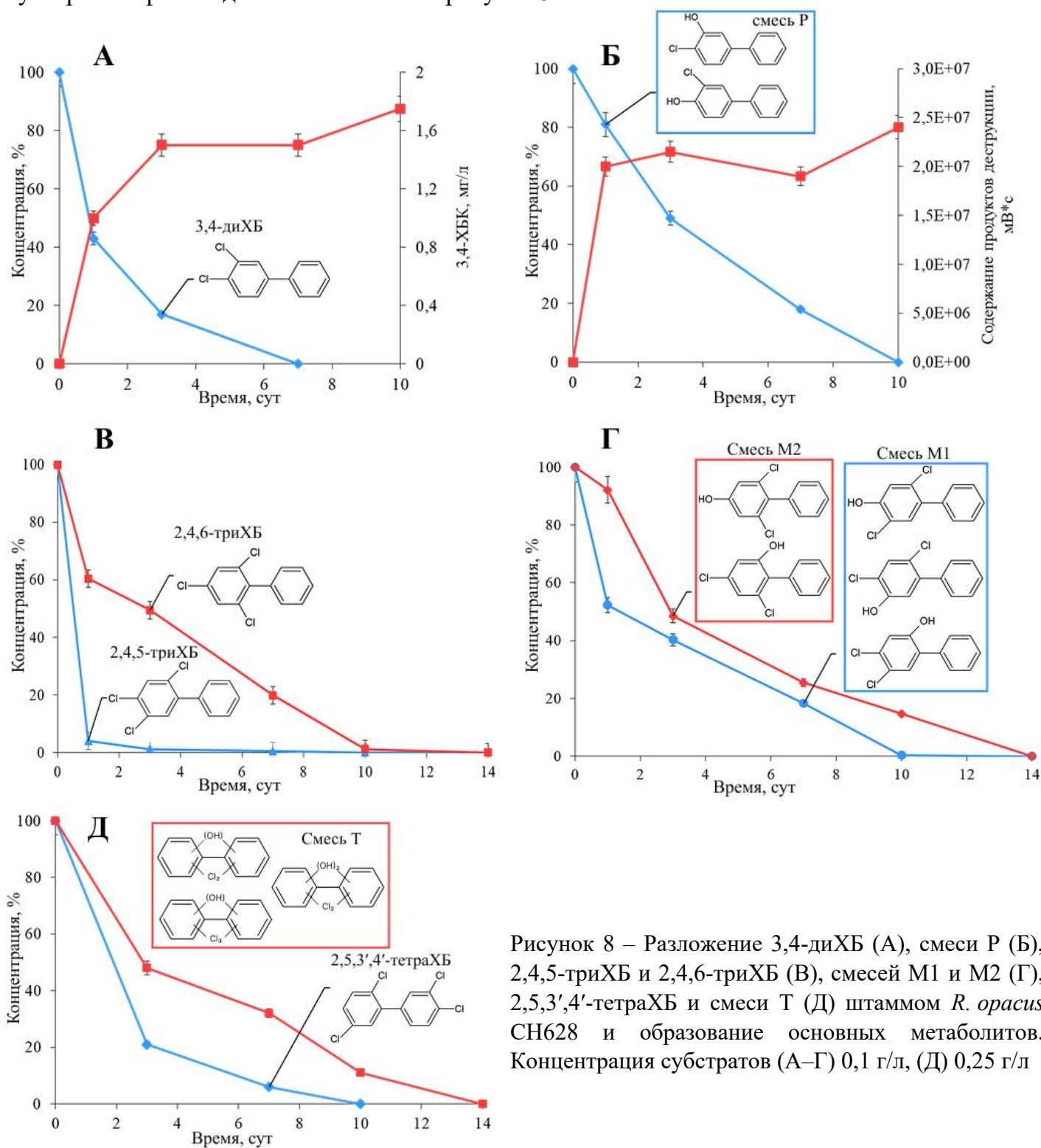


Рисунок 8 – Разложение 3,4-диХБ (А), смеси Р (Б), 2,4,5-триХБ и 2,4,6-триХБ (В), смесей М1 и М2 (Г), 2,5,3',4'-тетраХБ и смеси Т (Д) штаммом *R. oracis* CH628 и образование основных метаболитов. Концентрация субстратов (А–Г) 0,1 г/л, (Д) 0,25 г/л

Три-замещённые бифенилы. *R. oracis* CH628 осуществляет 100 %-ю деструкцию 2,4,5-триХБ за 7 сут, а 2,4,6-триХБ и смесями М1 и М2 (таблица 1) – за 14 сут (рис. 8 В, Г). Методом ВЭЖХ установлено, что основными метаболитами являются (хлор/гидрокси)бензойные кислоты, что свидетельствует о разложении три-замещенных бифенилов по метаболическому пути, представленному на рисунке 5.

Тетра-замещённые бифенилы. Установлено, что штамм *R. oracis* CH628 осуществляет разложение 2,5,3',4'-тетраХБ за 10 дней, тогда как разрушение смеси Т (таблица 1) занимает 14 дней (рис. 8 Д). Расчёты показали, что эффективность разрушения 2,5,3',4'-тетраХБ на 1 г клеток штамма CH628 составила 90 мг ПХБ/день, а для смеси гидроксипроизводных 2,5,3',4'-тетраХБ этот показатель равен 56 мг ПХБ/день. При этом удельная скорость деструкции компонентов смеси Т составила: для гидрокси-трихлорбифенилов – 0,303 день⁻¹, для гидрокси-дихлорбифенилов – 0,309 день⁻¹ и для дигидрокси-дихлорбифенилов – 0,725 день⁻¹. Данные, полученные при анализе образующихся метаболитов, не позволили определить по какому кольцу молекулы 2,5,3',4'-тетраХБ происходит первичное окисление.

Разложение коммерческих смесей ПХБ и полученных на их основе смесей гидрохлорбифенилов. Установлено, что штамм *R. oracis* CH628 осуществляет 100 %-ю деструкцию Трихлорбифенила за 10 сут ($V_{уд} = 0,921$ сут⁻¹), Совола – за 14 сут ($V_{уд} = 0,273$ сут⁻¹) (рис. 9 А,Б). Увеличение времени деструкции вероятно обусловлено преобладанием в составе Совола пентахлорированных бифенилов (Kirichenko *et al.*, 2000). Эффективность деструкции смесей НО-ПХБ штаммом CH628 составила 95,5–100 % за 14 сут (рис. 9 В,Г). Анализ метаболитов показал, что штамм CH628 осуществляет разложение (хлор/гидрокси)бензойных кислот, что свидетельствует о перспективности использования данного штамма в качестве основы для биопрепаратов, направленных на разложение ПХБ и НО-ПХБ.

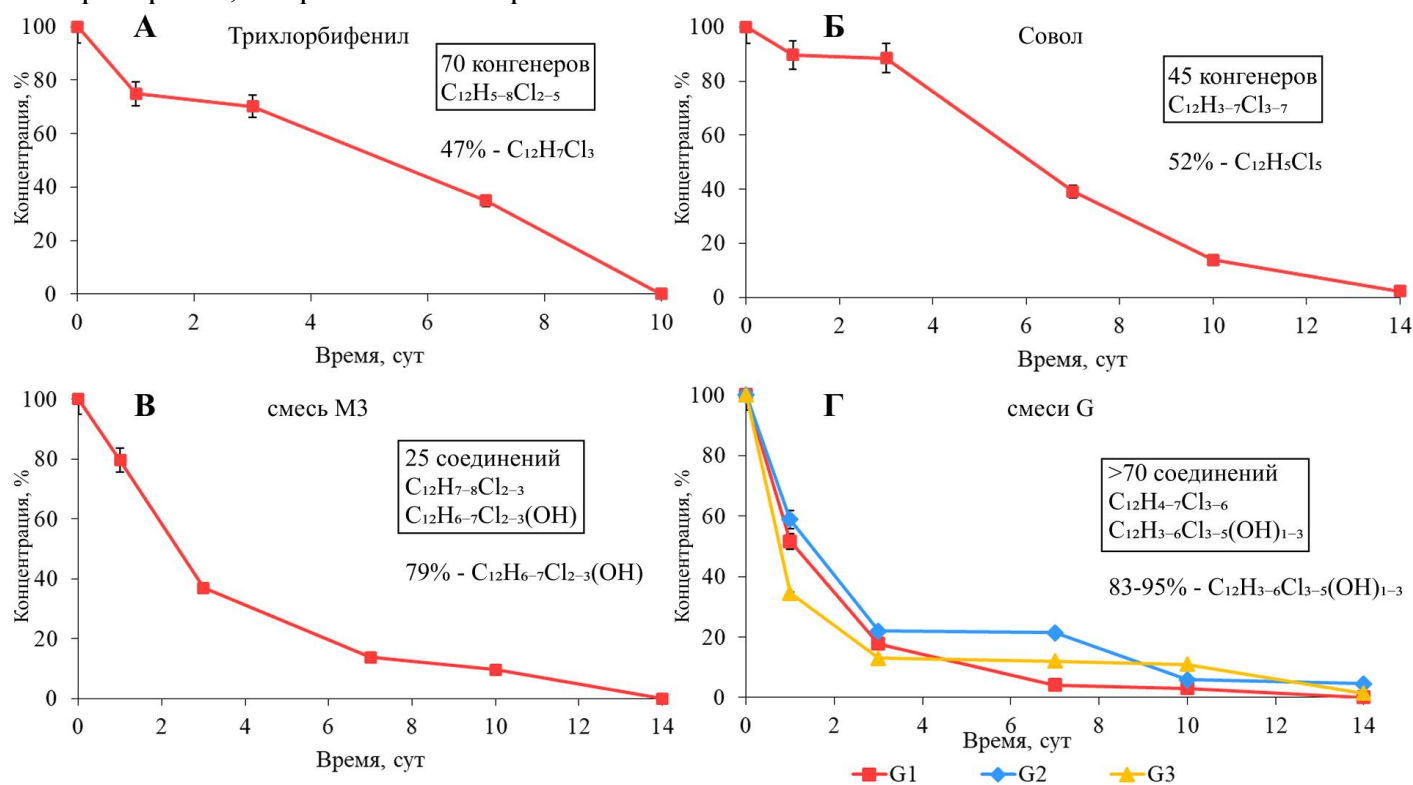


Рисунок 9 – Разложение коммерческих смесей ПХБ (0,6 г/л) и полученных на их основе смесей гидрохлорированных производных ПХБ (0,1 г/л) штаммом *R. oracis* CH628

Молекулярно-генетические основы бактериальной деструкции хлор- и гидроксибифенилов.

Внехромосомные элементы. Известно, что гены, обуславливающие деструкцию ПХБ у аэробных бактериальных штаммов, могут располагаться как на хромосоме, так и на внехромосомных элементах бактериального генома (Bhatt *et al.*, 2021). Методом пульс-электрофореза установлено, что в штамме *Ochrobactrum* sp. PNS5 присутствует внехромосомная ДНК размером около 1600 т.п.н., в штамме *Micrococcus* sp. PNS1 обнаружена плазмида размером около 50 т.п.н., в штамме *Pseudomonas* sp. PNS3 – плазмида размером 30 т.п.н.. Сопоставление размера выявленных плазмид с известными Д-плазмидами позволяет

предположить, что гены деструкции бифенила у данных штаммов могут иметь плазмидную локализацию (Fukuda *et al.*, 1998; Pieper, 2005).

Анализ генов, кодирующих бифенил- и бензоат-диоксигеназы, у индивидуальных штаммов. Результаты, полученные при анализе метаболического профиля штаммов, выделенных из ассоциаций PN2-S и PN2-B, при деструкции замещенных бифенилов, позволили предположить что разложение данных соединений происходит по «верхнему» бифенильному пути (рис. 5), при этом ключевым ферментом является бифенил 2,3-диоксигеназа. Установлено, что семь штаммов содержат ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы (рис. 10). Анализ нуклеотидных последовательностей выявленных генов показал, что гены *bphA1* у исследуемых в настоящей работе штаммов, формируют отдельную ветвь на филогенетическом дереве (рис. 10), а уровень сходства с *bphA1* штаммов, изолированных ранее из территориально близких эконисш составил 82,32–99,76 % (Шумкова и соавт., 2015; Воронина и соавт., 2019).

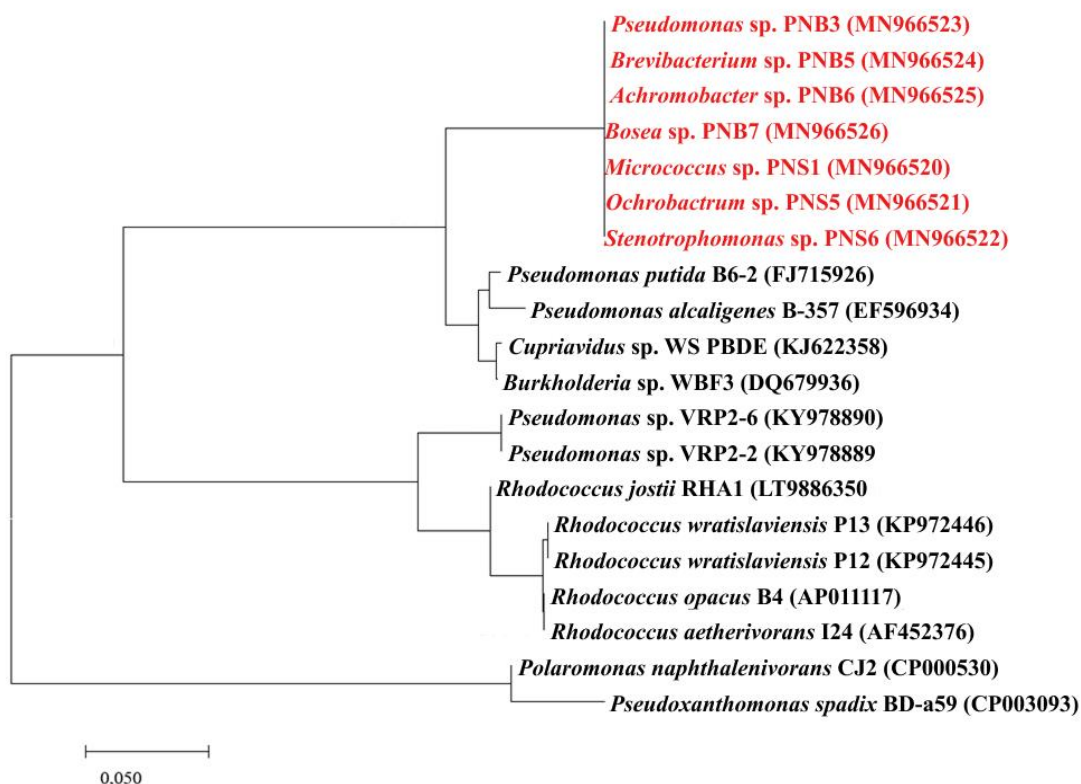


Рисунок 10 – Дерево сходства генов, кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов. Статистическая достоверность порядка ветвления > 98 % («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

Так как среди промежуточных соединений биodeградации моногидроксибифенилов был выявлен катехол, который может быть образован из гидроксibenзойных кислот под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы, проведен скрининг исследуемых штаммов на наличие гена *benA*, кодирующего α -субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы. Установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. PNB3 содержит ген *benA*, который располагается в одном кластере на филогенетическом дереве с геном *benA* известного штамма-деструктора ароматических соединений *Pseudomonas putida* KT2440 (van Duuren *et al.*, 2011; Kahlon, 2016).

Анализ генома штамма *Rhodococcus opacus* CH628. На основании анализа биodeградативного потенциала для более подробного изучения на генетическом уровне был отобран штамм *Rhodococcus opacus* CH628. Нуклеотидная последовательность генома штамма *R. opacus* CH628 полученная с использованием методов NGS-секвенирования размещена в международной базе данных NCBI под номером JBLZMV000000000. На основании анализа

полногеномной последовательности с использованием средней идентичности нуклеотидов (ANI) установлено, что геном штамма CH628 на 99,321 % идентичен геному типового штамма *Rhodococcus opacus* DSM 43205 (GenBank X80630) с перекрытием генома на 88,3 %. По данным RAST размер генома штамма *R. opacus* CH628 составляет 8229 т.п.н., содержание GC – 67,2 %, 203 гена обуславливают метаболизм ароматических соединений. Ключевыми ферментами окислительной трансформации замещенных бифенилов являются диоксигеназы. В результате автоматического аннотирования генома штамма CH628 выявлено 49 генов, кодирующих диоксигеназы, а анализ с помощью Sequence Set Browser (NCBI) позволил выявить пять ферментов класса диоксигеназ, наиболее вероятно участвующие в разложении бифенила. С использованием алгоритмов сервиса RAST установлены гены, кодирующие α - и β -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1, BphA2) (номер генов в системе RAST: *bphA1* – 4673, *bphA2* – 4670, контиг – 36) и бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназу (BphC) (номер генов *bphC* в системе RAST – 1695 и 2466).

Моделирование белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. opacus* CH628. В результате дедуктивной трансляции с использованием алгоритмов программы MEGA X на основе нуклеотидной последовательности гена *bphA1*_{CH628} (MW070532) и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что BphA1_{CH628} располагается в «ветви» нафталиновых диоксигеназ и характеризуется высоким уровнем сходства (93,7 %) с α -субъединицей нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A) (рис. 11).

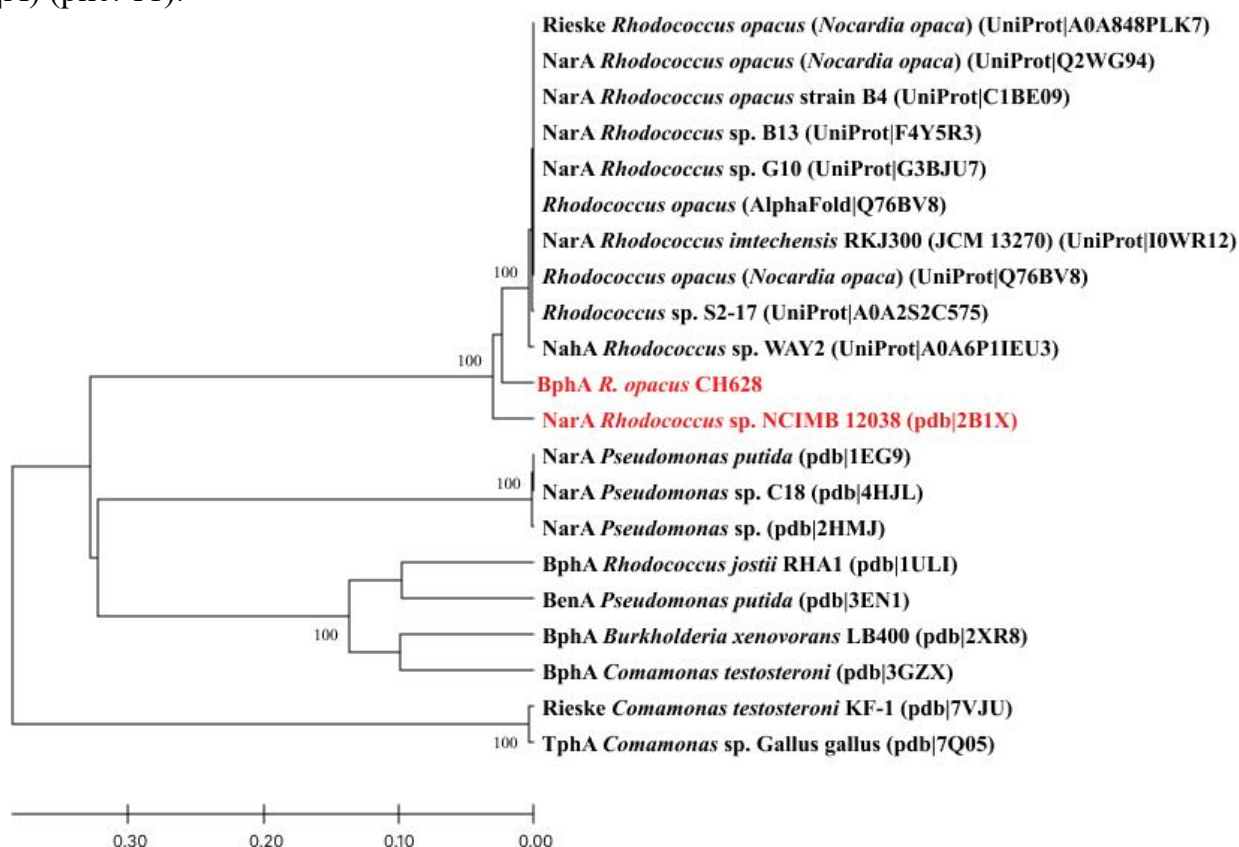


Рисунок 11 – Филогенетическое дерево последовательности BphA1 штамма *R. opacus* CH628 построенное с использованием метода Neighbor-Joining. Масштаб соответствует 1 аминокислотной замене на 100 аминокислотных остатков. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления («bootstrap»-анализ 1000 альтернативных деревьев)

С использованием программ MODELLER (принцип построения – по шаблону), AlphaFold и trRosetta (принцип построения – без шаблона, используются разные алгоритмы прогнозирования структуры) получена вторичная структура BphA1_{CH628} (таблица 6).

Таблица 6 – Характеристики вторичной и третичной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штамма CH628

Элемент структуры	BphA1(M)	BphA1(AF)	BphA1(TR)
α -спирали	11	13	13
π -спирали	5	5	6
строгие α -витки	2	3	3
β -складчатости	20	20	17
строгие β -витки	10	10	12
Объём, e^3	49,40	50,41	48,60
Площадь, e^2	18,66	19,26	21,01
Количество АК	401	401	401

Применение алгоритма построения «по шаблону» (MODELLER) привело к созданию модели BphA1(M) отличающейся меньшим количеством α -спиралей и наименьшей площадью молекулы, тогда как объем характеризуется средним значением, между показателями объема для BphA1(AF) и BphA1(TR). Модель BphA1(TR) обладает наименьшим объемом при наибольшей площади молекулы, содержит большее количество π -спиралей и β -витков.

Третичная структура BphA1_{CH628} была визуализирована и предварительно проанализирована с использованием программы PyMOL, на основе полученных моделей. Для наглядного сравнения 3D-модели BphA1(M), BphA1(AF) и BphA1(TR) были выровнены относительно друг друга (рис. 12 А). Из рисунка 12 А видно, что петлевые области BphA1_{CH628}, особенно на периферии, имеют заметные различия между моделями. Модель BphA1(TR) демонстрирует больше отклонений от структуры BphA1(M) и BphA1(AF) в вытянутых петлях. Вероятно данная модель характеризуется менее стабильной структурой. Данное предположение подтвердилось при оценке качества моделей с использованием программ ERRAT, VERIFY3D и PROCHECK.

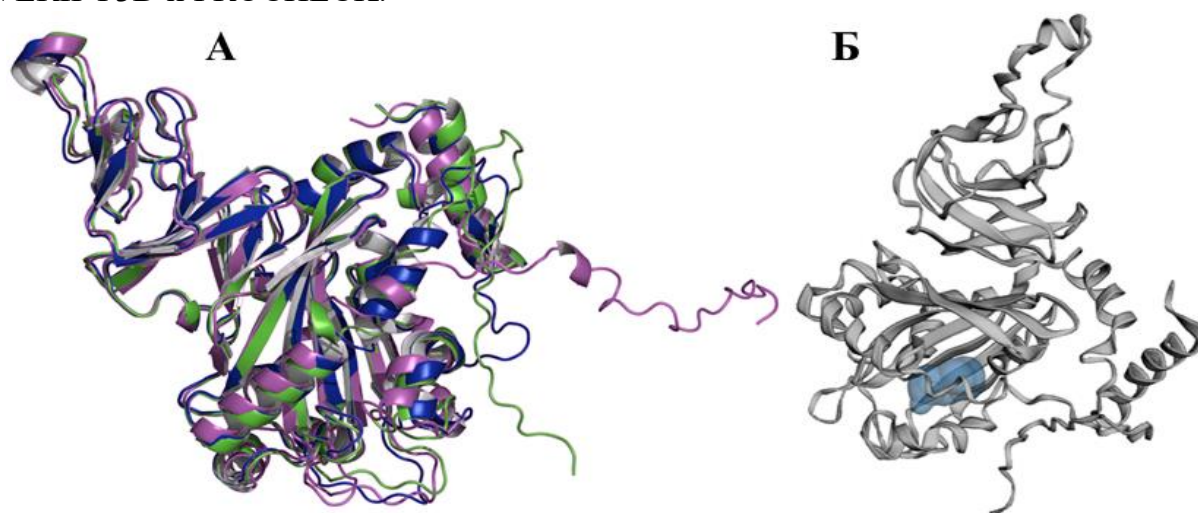


Рисунок 12 – Модели BphA1_{CH628}, выровненные относительно друг друга (А) (BphA1(M) – синий, BphA1(AF) – зелёный, BphA1(TR) – розовый) и модель BphA1_{CH628} с визуализацией области активного центра (синий цвет) (Б).

С использованием алгоритмов программы CASTp на основе модели BphA1_{CH628}(AF) выявлен активный центр, в который входят Asn209, Phe210, Asp213, Ala214, His216, Thr217, His221, Met 224, Ala230, Phe236, Ala237, Ile254, Phe293, His295, Phe307, Met309, Thr361, Leu362, Ala369 (рис. 12Б). Анализ аминокислот активного центра BphA1_{CH628} выявил сходство по ключевым аминокислотным остаткам с активными центрами нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 и бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *Rhodococcus jostii* RHA1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Из полученных в ходе селекции штаммов наиболее перспективными оказались культуры, продемонстрировавшие высокую степень деструкции моно- и ди-замещенных хлор- и гидроксифенилов. Установлено, что эффективность деградации достигала 100 % по ряду соединений. Выраженную активность к широкому спектру ПХБ/НО-ПХБ проявлял штамм *Rhodococcus opacus* СН628, способный к трансформации как индивидуальных конгенов ПХБ и НО-ПХБ, так и коммерческих смесей (Совол, Трихлорбифенил) и их производных. Метаболизм всех исследованных штаммов следовал классическому пути окисления бифенила.

Анализ генетических основ деградационного потенциала показал, что ключевой фермент бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA), катализирующий первичную атаку на замещённый бифенил, кодируется у исследованных штаммов генами, формирующими отдельную ветвь на филогенетическом дереве. Уровень сходства этих последовательностей с генами известных штаммов-деструкторов варьировал от 82,32 % до 99,76 %. На основе полногеномного секвенирования штамма *R. opacus* СН628 были идентифицированы гены и ферменты, участвующие в окислении бифенила и его производных. В результате применения биоинформатических методов была разработана теоретическая модель пространственной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA_{CH628}). Выявлено значительное структурное сходство между BphA_{CH628} и нафталин диоксигеназой NarA1 (*Rhodococcus* sp. NCIMB12038), что подтверждает деградативный потенциал штамма *R. opacus* СН628 в отношении широкого спектра ароматических ксенобиотиков.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. В результате полногеномного анализа штамма-деструктора ПХБ *R. opacus* CH628 выявлена группа из 203 генов, кодирующих ферменты метаболизма ароматических соединений. Установлены гены/ферменты, детерминирующие деструкцию хлор- и гидроксифенилов по классическому пути аэробного бактериального окисления, в том числе ключевой фермент – бифенил 2,3-диоксигеназа. Созданы 3D-модели α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*BphA1*_{CH628}) выявившие значительное сходство исследуемого фермента с нафталин диоксигеназой (*NarA1*) штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. Анализ активного центра показал ключевые каталитические аминокислоты — His216, His221 и Asp372, отвечающие за координацию ионов железа и взаимодействие фермента с субстратом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз:

1. Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., **Kir'yanova T.D.**, Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. 2020. V. 400. Article 123328. (WoS, SCOPUS Q1, IF 12,5, Белый список, уровень 1)

2. Gorbunova T.I., Egorova D.O., Pervova M.G., **Kyrianova T.D.**, Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus*-strains // Journal of Hazardous Materials. 2021. V. 409. Article 124471. (WoS, SCOPUS Q1, IF 12,5, Белый список, уровень 1)

3. Gorbunova T.I., Egorova D.O., Pervova M.G., **Kir'yanova T.D.**, Plotnikova E.G. Degradability of commercial mixtures of polychlorobiphenyls by three *Rhodococcus*-strains // Archives of Microbiology. 2022. V. 204. Article 534. (WoS, SCOPUS Q2, IF 2,6, Белый список, уровень 3)

4. Egorova D., **Kyr'yanova T.**, Pyankova A., Anan'ina L., Plotnikova E. Selective pressure of biphenyl/polychlorinated biphenyls on the formation of aerobic bacterial associations and their biodegradative potential // *Folia Microbiologica*. 2021. V. 66. P. 659–676 (WoS, SCOPUS Q3, IF 2,5, Белый список, уровень 3)
5. Егорова Д. О., Горбунова Т. И., **Кирьянова Т. Д.**, Первова М. Г., Плотникова Е. Г. Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов рода *Rhodococcus* и особенности их деградативной активности к хлорированным- и гидроксированным бифенилам при различных температурах // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Т. 57, № 6. С. 571–582. (WoS, SCOPUS Q3, IF 1,575, Белый список, уровень 2)
6. **Кирьянова Т.Д.**, Егорова Д.О. Особенности разложения моно-гидроксифенилов аэробными штаммами, изолированными из бактериальных ассоциаций-деструкторов ароматических поллютантов // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки*. 2024. Т. 66, № 6. С. 459–475. (WoS, SCOPUS Q4, IF 0,96, Белый список, уровень 2)
7. **Кирьянова Т.Д.** Моделирование белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. wratislaviensis* CH628 // *Вестник Пермского университета. Сер. Биология*. 2025. Вып. 1. С. 32–42. (БАК, РИНЦ, IF 0,5)

Публикации в других журналах и сборниках:

8. **Kir'yanova T.D.**, Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G. Bacterial degradation of PCB 70 and its hydroxy derivatives is an environmentally friendly way to destroy POPs // *BIO Web of Conferences*. 2023. V. 57. Article 09002. (WoS, SCOPUS, без квартиля, IF 0,2)
9. Егорова Д. О., Шестакова Е. А., **Кирьянова Т.Д.**, Пьянкова А. А. Бактериальная ассоциация -деструктор стойких органических загрязнителей (полихлорированных бифенилов) // *Актуальная биотехнология*. 2019. № 3(30). С. 484–487. (РИНЦ)
10. **Кирьянова Т.Д.**, Егорова Д.О. Новые штаммы-деструкторы монохлорированных бифенилов // *Материалы XI Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019»*. Пермь. 2019. С. 33–34.
11. Егорова Д.О., **Кирьянова Т.Д.** Поиск плазмид биodeградации в штаммах аэробных бактерий // *Материалы VII международной научно-практической конференции «Global science and innovations 2019: Central Asia»*. Сер. Биологические науки. Нур-Султан. 2019. №2(3). С. 98–100.
12. **Кирьянова Т.Д.**, Пьянкова А.А., Егорова Д.О. Скрининг генов ароматических диоксигеназ у штаммов из ассоциации-деструктора хлорбифенилов // *Материалы 24-ой Пущинской школы-конференции с международным участием «Биология – наука XXI века»*. Пущино, 2020. С. 337.
13. **Кирьянова Т.Д.**, Егорова Д.О. Сравнительное моделирование белковой структуры BphA1 штамма *Rhodococcus wratislaviensis* Ch628 с помощью Modeller // *Сборник тезисов IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков*. АНО «Иннов. Центр Кольцово. Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. С. 23–24.
14. **Кирьянова Т.Д.**, Егорова Д.О. Биodeградативный потенциал штаммов-деструкторов хлорбифенилов к моно-гидроксированному бифенилу // *Сборник тезисов IX Всероссийской Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»* М.: ООО «ГЕОС», 2023. С. 98–100.
15. **Кирьянова Т.Д.** Анализ полногеномной нуклеотидной последовательности штамма CH628, деструктора ароматических соединений // *Сборник тезисов 28-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века»*. Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2025. С. 46–47.

Кириянова Татьяна Денисовна

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

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 09.09.2025

Формат 60×90/16. Усл. печ.л. 1.

Тираж 100 экз. Заказ

Набор компьютерный.

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