

На правах рукописи

ВОРОНИНА Анна Олеговна

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

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пермь – 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии “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 (“ИЭГМ УрО РАН”), Пермь.

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Плотникова Елена Генриховна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, директор Регионального микробиологического центра ФГАОУ ВО “Белгородского государственного национального исследовательского университета” (НИУ “БелГУ”)

Соляникова Инна Петровна,

кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО “Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера” Министерства здравоохранения Российской Федерации

Годовалов Анатолий Петрович

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6).

Защита диссертации состоится _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 999.219.02 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук и Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: +7 (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии Министерства науки и высшего образования РФ (<http://vak.minobrnauki.gov.ru>) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке “ИЭГМ УрО РАН” и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<http://permsc.ru>).

Автореферат разослан “___” _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема загрязнения окружающей среды трудноразлагаемыми токсичными органическими соединениями, поступающими в окружающую среду в результате работы промышленных предприятий, на сегодняшний день остается актуальной и привлекает все большее внимание исследователей, занимающихся вопросами экологии. К таким соединениям относятся бифенил и его хлорированные производные – полихлорированные бифенилы (ПХБ). Бифенил, являясь компонентом нефти, каменного угля и природного газа, вызывает масштабное загрязнение окружающей среды, а также широко используется в химической промышленности для синтеза многих органических соединений (Nam *et al.*, 2014). ПХБ отнесены Программой ООН по окружающей среде (ЮНЕП) к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ) (<http://chm.pops.int>). Благодаря исключительной устойчивости к физическим и химическим воздействиям в XX веке ПХБ широко использовались в различных отраслях промышленности, наибольшее применение получили в качестве компонентов, входящих в диэлектрические жидкости (в трансформаторах, конденсаторах), смазочно-охлаждающие жидкости (СОЖ), в лакокрасочные изделия, изоляционные материалы (Pieper, Seeger, 2008; Zhao *et al.*, 2016; Васильев, 2017). Несмотря на запрет промышленного выпуска и использования ПХБ (Стокгольмская конвенция, 2001 г.), до сих пор остается актуальной проблема их утилизации и восстановления загрязненных территорий (Васильева, Стрижакова, 2007; Sharma *et al.*, 2018; Elangovan *et al.*, 2019). Бифенил и ПХБ негативно влияют на иммунную, нервную, репродуктивную и эндокринную системы человека, а продолжительное воздействие на организм данными токсикантами может вызвать серьезные заболевания (Murugan *et al.*, 2018; Berghuis, Roze, 2019). Бифенил ввиду меньшей токсичности по сравнению с его хлорпроизводными может использоваться в качестве модельного соединения при изучении биологических процессов разложения ПХБ (Шумкова и др., 2015; Hu *et al.*, 2015). В последние годы все более интенсивно разрабатываются и внедряются новые технологии для детоксикации и очистки загрязненных территорий с использованием биологического потенциала микроорганизмов (Sharma *et al.*, 2018). Известны и хорошо охарактеризованы грамположительные и грамотрицательные бактерии, способные к утилизации или частичной трансформации бифенила и ПХБ (Рыбкина и др., 2003; Gonçalves *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011; Плотникова и др., 2013; Шумкова и др., 2014; Kim *et al.*, 2018). Поиск и изучение активных бактерий-деструкторов, перспективных для использования в биотехнологиях восстановления и мониторинга загрязненных территорий (в т.ч. бифенилом/ПХБ), является актуальной задачей (Sharma *et al.*, 2018).

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

Цель настоящей работы – исследование разнообразия ключевых генов деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*-генов) в микробных сообществах

техногеннозагрязненных экосистем, выделение и характеристика активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ.

Основные задачи исследования

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

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

3. Исследование биодegradационных свойств выделенных бактерий-деструкторов.

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

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

Теоретическое и практическое значение работы. Исследование бактериальных генов (*bphA1*), ответственных за разложение токсичных (хлор)ароматических соединений – бифенила, полихлорированных бифенилов, выявленных на территориях ряда географически удаленных промышленных регионов РФ, и полученные новые данные о разнообразии *bphA1*-генов, расширяют представление о микробиологическом составе техногеннозагрязненных экотопов и важной роли некультивируемых бактерий в деградации моно(поли)ароматических соединений и их хлорпроизводных. Результаты исследования также позволяют оценить вклад бактерий-деструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в процесс разложения (хлор)ароматических соединений, в том числе бифенила и ПХБ, и восстановление загрязненных территорий РФ. Клонированные нуклеотидные последовательности *bphA1*-генов, а также последовательности генов 16S рРНК и *bphA1*-генов выделенных активных штаммов-деструкторов депонированы в общедоступную международную базу данных GenBank. Изолированные и охарактеризованные бактерии-деструкторы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* могут быть использованы при создании биотехнологий, направленных на мониторинг и восстановление загрязненных (хлор)ароматическими соединениями территорий.

Основные положения, выносимые на защиту

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

2. Бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ, выделенные из загрязненных почв территории предприятия ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ” (г. Пермь), относятся к роду *Pseudomonas*. В исследуемых псевдомонадах выявлены *bphA1*-гены, гомологичные генам активных деструкторов бифенила/ПХБ. Штамм *Pseudomonas* sp. VRP2-6 эффективно разлагает моно- и дихлорированные бифенилы: 2-ХБ и 4-ХБ в концентрации 250 мг/л (97,1 % и 82,3 % за 24 часа, соответственно); 2,4'-диХБ – 44,6 мг/л (20,0 % за 24 часа).

3. Грамположительные бактерии-деструкторы бифенила/ПХБ, выделенные из загрязненных почв, водоемов Пермского края и Самарской области, идентифицированы как представители рода *Rhodococcus*; в исследуемых штаммах детектировано наличие *bphA1*-генов, проведен их филогенетический анализ. Штаммы *Rhodococcus* spp. KBV16 и VR31-1 характеризуются способностью разлагать хлорированные бифенилы: 2-ХБ, 4-ХБ в концентрации 96 мг/л (100 % за 3 часа) и 2,4'-диХБ – 44,6 мг/л (54,3 % за 24 часа).

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы для исследований были отобраны с техногеннозагрязненных территорий ряда географически удаленных регионов РФ, включающих порт г. Анадырь (Чукотский АО); ПАО “Уралкалий” (г. Березники, Пермский край); ОАО “Пермский завод смазок и смазочно-охлаждающих жидкостей” (г. Пермь); АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь); река Чапаевка, протекающая по территории ОАО “Средне-Волжского завода химикатов” (г. Чапаевск, Самарская область); торговый порт г. Евпатория (п-ова Крым); Феодосийское предприятие по обеспечению нефтепродуктами (г. Феодосия, п-ов Крым); а также с перевала Кыртыкауш (высота 3242 м) (республика Кабардино-Балкария), в период с 2008 по 2016 гг.

Органические загрязнители в исследуемых образцах (почвах/грунтах, промышленных стоках, донных отложениях) определяли в хлороформенных экстрактах проб с использованием хромато-масс-спектрометра “Agilent GC7890A MS5975C Inert XL EI/CI” (“Agilent Technology”, США). Определение содержания катионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} осуществляли методом водной вытяжки (приготовленной согласно ГОСТу 26423-85) с последующей детекцией на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 (“Shimadzu”, Япония).

Среды и условия культивирования. Для получения накопительных культур (НК), выделения штаммов-деструкторов и изучения их биодеграционных свойств была использована минеральная среда К1 (Зайцев и Карасевич, 1981). Накопительное культивирование и выделение бактерий-деструкторов из образцов донных отложений Анадырского залива осуществляли на минеральной среде следующего состава (г/л): NaCl – 20,0; MgCl_2 – 3,0; MgSO_4 – 2,0; KCl – 1,0; CaCl_2 – 0,5; FeSO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0. В качестве ростового субстрата в среду вносили бифенил (“ACROS Organics”, США) в концентрации 1 г/л. Культивирование проводили при температуре $+28 \pm 1^\circ\text{C}$ (для образцов донных отложений Анадырского залива: $+10 \pm 2^\circ\text{C}$).

Клонирование и изучение генов деструкции бифенила/ПХБ

Выделение тотальной ДНК из исследуемых образцов и НК проводили с использованием коммерческого набора реактивов Fast DNA spin kit for soil (“MP Biomedicals”, США).

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) выполняли в присутствии красителя Sybr Green I (“Синтол”, Россия) и 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (“Thermo Scientific”, США) на приборе “CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems” (“Bio-Rad Laboratories”, США) с использованием наборов праймеров к генам 16S рРНК: Eub338 и Eub518 (Fierer *et al.*, 2005) и к генам, кодирующим α -субъединицу гидроксимирующей диоксигеназы (PAH-RHD $_{\alpha}$): PAH-RHD $_{\alpha}$ GPF и PAH-RHD $_{\alpha}$ GPR; PAH-RHD $_{\alpha}$ GNF и PAH-RHD $_{\alpha}$ GNR (Cébron *et al.*, 2008).

Денатурирующий градиентный гель электрофорез (ДГГЭ). Разгонку амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК в химическом денатурирующем градиенте проводили в течение 10,3 часа при 130 V и 60°C на приборе Dcode™ Universal Mutation System (“Bio-Rad Laboratories”, США) согласно протоколу (Muyzer *et al.*, 1993).

Клонирование фрагментов *bphA1*-генов. Амплификацию *bphA1*-генов на матрице тотальной ДНК образцов и накопительных культур проводили с использованием праймеров: BPHD-f3 и BPHD-r1, *bphA1*-f450 и *bphA1*-r900, как описано в работах (Iwai *et al.*, 2010; Шумкова и др., 2015). ПЦР-фрагменты *bphA1*-генов клонировали в клетках *E. coli* JM109 в составе вектора pTZ57 R/T (“Thermo Scientific”, США). Трансформацию компетентных клеток *E. coli* JM109 проводили с использованием коммерческого набора реактивов фирмы “Thermo Scientific” (США) согласно инструкции производителя. С ДНК-матрицы отобранных рекомбинантных клонов осуществляли амплификацию фрагментов *bphA1*-генов (Iwai *et al.*, 2010; Шумкова и др., 2015). ПДРФ-анализ полученных ампликонов осуществляли с использованием эндонуклеазы *HhaI* (“Fermentas”, Литва) согласно инструкции производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов *bphA1*-генов проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystems”, США) в Научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественнонаучного института при ПГНИУ. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ: Sequence Scanner v 1.0. и MEGA X (<http://www.megasoftware.net>), сравнивая с гомологичными нуклеотидными последовательностями из баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов *bphA1*-генов депонированы в базу данных GenBank под номерами: MF084200.1, MF084201.1, MF084202.1, MF084203.1, MF084204.1, MN099028.1, MN099029.1, MN099030.1, MN099031.1, MN099032.1, MN099033.1, MN099034.1, MN099035.1, MN153170.1, MN153172.1, MN153173.1, MN153171.1, MN153169.1.

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

Выделение и изучение активных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ

Выделение микроорганизмов осуществляли методом накопительного культивирования на среде K1 с бифенилом (1 г/л) в качестве ростового субстрата с последующим высевом суспензии на агаризованную (15 г/л агара) среду K1 (бифенил добавляли в перевернутую чашку Петри).

Изучение морфологических и физиолого-биохимических характеристик бактерий-деструкторов проводили по стандартным методикам (Методы общей бактериологии, 1983).

Определение ростовых характеристик. Рост бактериальных культур оценивался на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония), определяя оптическую плотность при длине волны 600 нм в кюветах с длиной оптического пути 1,0 см.

Анализ деструкции хлорированных бифенилов бактериальными штаммами. Отмытые в среде K1 клетки бактерий-деструкторов (1 мл, $OP_{600} = 2,0$) переносили во флаконы с тифлоновыми крышками, добавляя один из субстратов: моноХБ (2-ХБ, 4-ХБ) до конечной концентрации 94,2 мг/л или 250 мг/л, диХБ (2,4'-ХБ) – 44,6 мг/л. Инкубировали на шейкере при $+28 \pm 1^\circ\text{C}$. Детекцию хлорбифенилов в экстрактах среды культивирования осуществляли на газовом хромато-масс-спектрометре “Agilent GC7890A MS5975C Inert XL EI/CI” (“Agilent Technology”, США). Накопление хлорбензойных кислот в среде культивирования регистрировали методом ВЭЖХ на хроматографе (“LKB Bromma”, Швеция) с колонкой (RP-18 250 x 4,6 мм; Alltech, с диаметром частиц 10 мкм) согласно протоколу (Maltseva *et al.*, 1999).

Выделение ДНК из чистых культур бактерий осуществляли методом “щелочного лизиса” с использованием 0,05М NaOH.

ДНК-типирование. ВОХ-ПЦР (полимеразную цепную реакцию повторяющихся Вох-элементов) проводили согласно методу (Versalovic *et al.*, 1994). Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле в 1х буфере TBE в течение 2 часов при напряженности электрического поля 5,7 В/см.

Плазмидную ДНК в клетках бактерий-деструкторов выявляли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II (“Bio-Rad Laboratories”, США) как описано (Егорова и др., 2013).

Аmplификацию генов 16S рРНК и функциональных генов (*benA*, *bphA1*) проводили с ДНК-матриц бактерий-деструкторов с использованием следующих пар праймеров: 27F и 1492R (Lane, 1991); *benA*-f3 и *benA*-r1 (Baggi *et al.*, 2008); BPHD-f3 и BPHD-r1 (Iwai *et al.*, 2010); *bphA1*-f450 и *bphA1*-r900 (Шумкова и др., 2015), на амплификаторе My Cyclor (“Bio-Rad Laboratories”, США).

Определение нуклеотидных последовательностей генов бактерий-деструкторов и анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых *bphA1*-генов с последующим построением филогенетических деревьев осуществляли, как описано выше. Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК анализировали с использованием программ: Sequence Scanner v 1.0. и MEGA X (<http://www.megasoftware.net>), поиск гомологичных последовательностей осуществляли в международной базе данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>). Нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и *bphA1* исследуемых штаммов-деструкторов депонированы в базу данных GenBank под номерами: KY971637.1/KY978889.1, KY977422.1/KY978890.1, MN078966.1/MN037960.1, MN094599.1/MN037963.1, MT317124.1/MN037957.1, MT317178.1/MN037958.1, MT317307.1/MN037959.1, MN079075.1/MN037961.1, MN080146.1/MN037962.1.

Статистическая обработка результатов. Повторность опытов трехкратная. Полученные данные обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 8 (<https://www.graphpad.com/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Методом клонирования создана библиотека фрагментов *bphA1*-генов, кодирующих активный центр БДО, бактерий-деструкторов, входящих в состав исследуемого микробного сообщества прибрежной зоны порта Анадырь. ПДРФ-анализ 64 рекомбинантных клонов с использованием эндонуклеазы *HhaI* выявил три типа амплифицированных участков *bphA1*-генов (3 геномогруппы). У представителя каждой геномогруппы определены нуклеотидные последовательности и проведен филогенетический анализ. Показано, что с исследуемой ДНК-матрицы преимущественно амплифицировались гены бактерий порядка *Actinomycetales* (~ 91 % от общего количества рекомбинантных клонов).

Клон 9b (I геномогруппа, ~ 58 % от общего количества рекомбинантных клонов) содержал последовательность, сходную с генами α -субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо бактерий рода *Rhodococcus*. Для нуклеотидной последовательности клона 8i (II геномогруппа, ~ 33 % от общего количества рекомбинантных клонов) наибольшее сходство наблюдалось с генами α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*) представителей родов *Janibacter* и *Terrabacter*. Клон 5b (III геномогруппа, ~ 9 % от общего количества) имел нуклеотидную последовательность, на 68,9 % сходную с геном α -субъединицы ароматической диоксигеназы некультивируемой морской бактерии (рисунок 1). Следовательно, гены, выявленные в бактериальной ассоциации донных отложений района порта Анадырь, детерминируют ферменты, специфичные к ароматическим соединениям (в т.ч. бифенилу, ПХБ). Можно предположить, что в исследуемом микробном сообществе основная роль в деструкции ароматических соединений принадлежит трем типам бактериальных генов, в том числе генам *bphA1*.

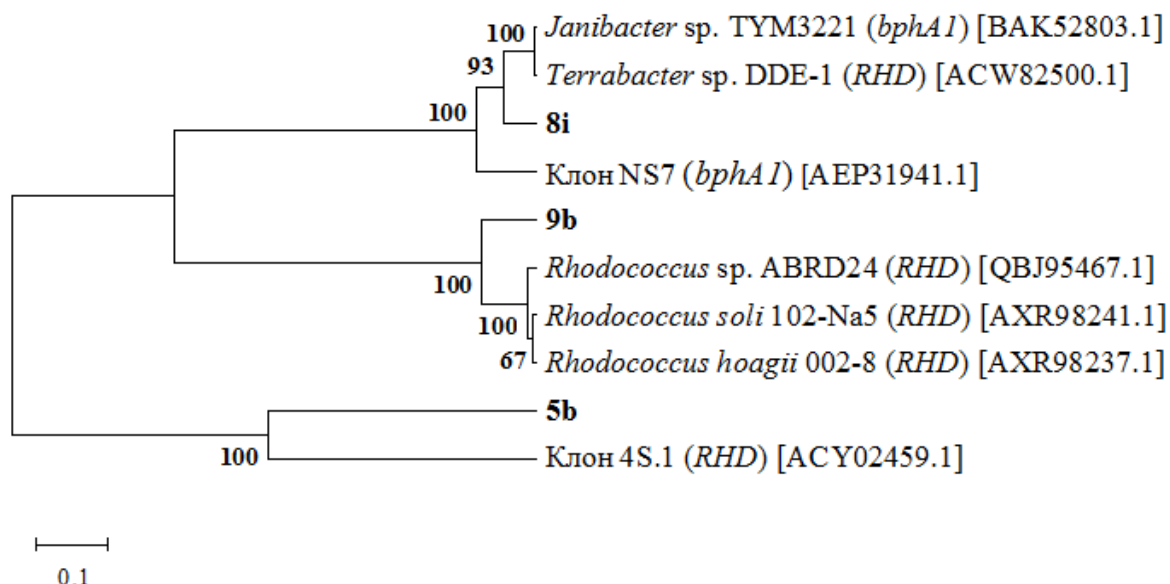


Рисунок 1 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”- анализа.

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

Методом ПЦР-РВ с тотальной ДНК образца поверхностного слоя шламохранилища БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” проведен скрининг бактериальных генов. Гены 16S рРНК присутствовали в исследуемом образце в количестве $1,31 \times 10^{11}$ ($\pm 1,28 \times 10^8$) копий гена на 1 г образца. Количество копий РАН-RHD α -генов ароматических диоксигеназ грамотрицательных бактерий составило $3,8 \times 10^7$ ($\pm 5,7 \times 10^7$) на 1 г образца. Доля бактерий, способных к деградации ПАУ, бифенил/ПХБ (представленная соотношением количества копий гена РАН-RHD α к количеству копий гена 16S рРНК), в исследуемом микробном сообществе довольно высока и составляет около 10^{-4} . Для дальнейшего исследования разнообразия *bphA1*-генов и определения наличия бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ в микробном сообществе поверхностного слоя шламохранилища проведены эксперименты по клонированию генов, кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы.

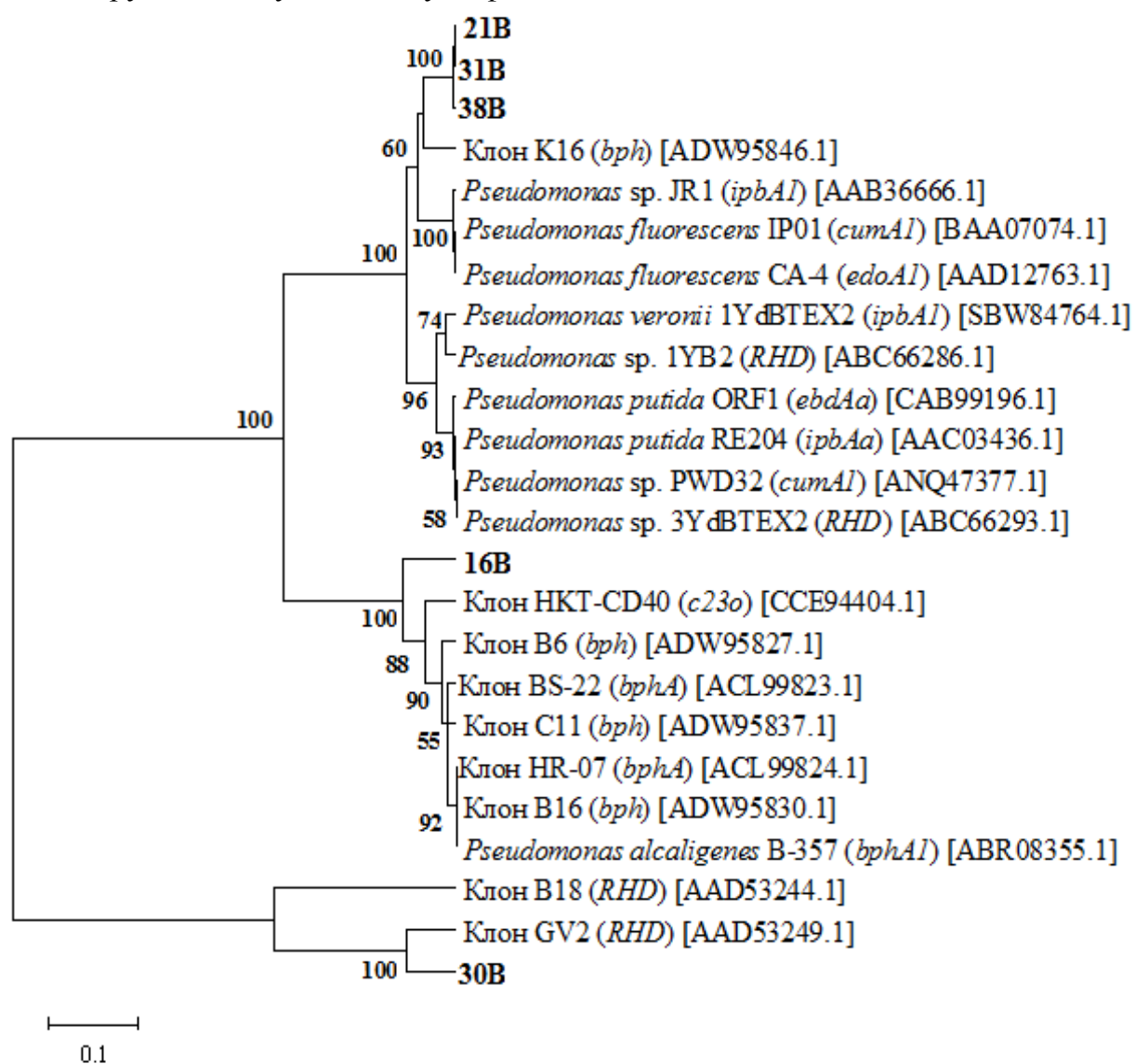


Рисунок 2 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”- анализа.

В результате клонирования отобрано 33 рекомбинантных клон (характеризующихся наличием фрагментов *bphA1*-генов, кодирующих активный центр БДО), которые были отнесены к 5 геномогруппам. Дальнейший анализ осуществляли с представителями каждой геномогруппы. В исследуемом микробном сообществе были выявлены нуклеотидные последовательности, имеющие наибольший уровень сходства с таковыми некультивируемых бактериальных клонов, в частности 85,5–86,7 % – с геном бифенил диоксигеназы (*bph*) и 86,1–86,3 % – с геном катехол 2,3-диоксигеназы. Анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых клонов выявил наибольшее сходство с генами бактерий рода *Pseudomonas* (~ 80 % анализируемых последовательностей).

Секвенированный фрагмент ДНК клон 16В (I геномогруппа, ~ 5 % от общего количества рекомбинантных клонов) имел 85,5–86,7 % сходства с генами бифенил диоксигеназ (*bph*) некультивируемых бактерий (Koubek *et al.*, 2013; Uhlik *et al.*, 2009). Наиболее высокий процент сходства (85,9 %) наблюдался с геном α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*) штамма-деструктора бифенила/ПХБ – *Pseudomonas alcaligenes* B-357 (Vézina *et al.*, 2008). Последовательности исследуемых фрагментов ДНК клонов 21В (III геномогруппа, ~ 5 % от общего количества рекомбинантных клонов), 31В (V, ~ 70 %) и 38В (II, ~ 15 %) имеют наибольший процент сходства с геном α -субъединицы кумол диоксигеназы (*cumA1*) штамма *Pseudomonas* sp. PWD32 (~ 81,2 %). Клон 30В (IV геномогруппа, ~ 5 %) имеет наибольший, но относительно не высокий процент сходства (< 80 %) с генами некультивируемых бактерий GV2 и B18 (рисунок 2). Наличие в микробном сообществе шламохранилища предприятия БКПРУ-3 ПАО “Уралкалий” генов различных гидроксилирующих диоксигеназ может указывать на то, что в данном сайте присутствуют бактерии-деструкторы не только бифенила, но и других ароматических соединений.

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

В образце грунта, отобранного вблизи солеотвала БКПРУ-3 с использованием метода ПЦР-РВ обнаружено наличие копий бактериальных генов 16S рНК в количестве $6,6 \times 10^{10}$ ($\pm 8,87 \times 10^7$) на 1 г образца. Количество копий РАН-RHD $_{\alpha}$ -генов диоксигеназ грамотрицательных бактерий составило $2,83 \times 10^9$ ($\pm 5,21 \times 10^8$) на 1 г образца. Присутствие генов гидроксилирующих диоксигеназ грамположительных бактерий не обнаружено.

Методом ДГГЭ установлено, что исследуемое микробное сообщество характеризуется таксономическим разнообразием, филогенетический анализ показал присутствие некультивируемых бактерии родов *Acidobacterium* (99 % сходства), *Sphingobacterium* (97 % сходства) и класса *Verrucomicrobia* (уровень сходства 99 %). Также обнаружено присутствие генов 16S рНК, имеющих большой процент сходства (100 %) с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* DSM 44107^T.

В результате клонирования создана библиотека *bphA1*-генов бактерий-деструкторов исследуемого микробного сообщества. Для последующего анализа отобраны рекомбинантные клоны в количестве 73. При выявлении сходства и различий между клонированными участками гена *bphA1* проведен ПДРФ-анализ полученных ампликонов. По результатам гидролиза ДНК эндонуклеазой рестрикции *HhaI* исследуемые клоны разделили на 9 геномогрупп. У представителей каждой геномогруппы определили нуклеотидные последовательности участков *bphA1*-генов и провели филогенетический анализ. Результаты исследований показали, что в микробном сообществе почвы вблизи солеотвала присутствуют бактерии-деструкторы, содержащие

гены, имеющие наибольшее сходство с генами α -субъединиц 5 типов диоксигеназ: бифенил 2,3-диоксигеназы (*bphA1*), изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (*ipbA1*), бензотрифторид 2,3-диоксигеназы (*btfA1*), бензол диоксигеназы (*bnzA1*) и толуол диоксигеназы (*terpA*) бактерий рода *Rhodococcus* (~ 97 % от общего количества рекомбинантных клонов) и некультивируемых бактерий (рисунок 3). Полученные результаты согласуются с данными ДГГЭ (см. выше). По результатам анализа филогенетического дерева, построенного с использованием транслированных аминокислотных последовательностей *bphA1*-генов, наблюдалось сходство большей части исследуемых клонов, расположенных на одной ветви, в то время как клоны 18b (VII геномгруппа, ~ 3 % от общего количества рекомбинантных клонов) и 35a (V геномгруппа, ~ 3 %) являются представителями других таксонов и расположены на соседних ветвях.

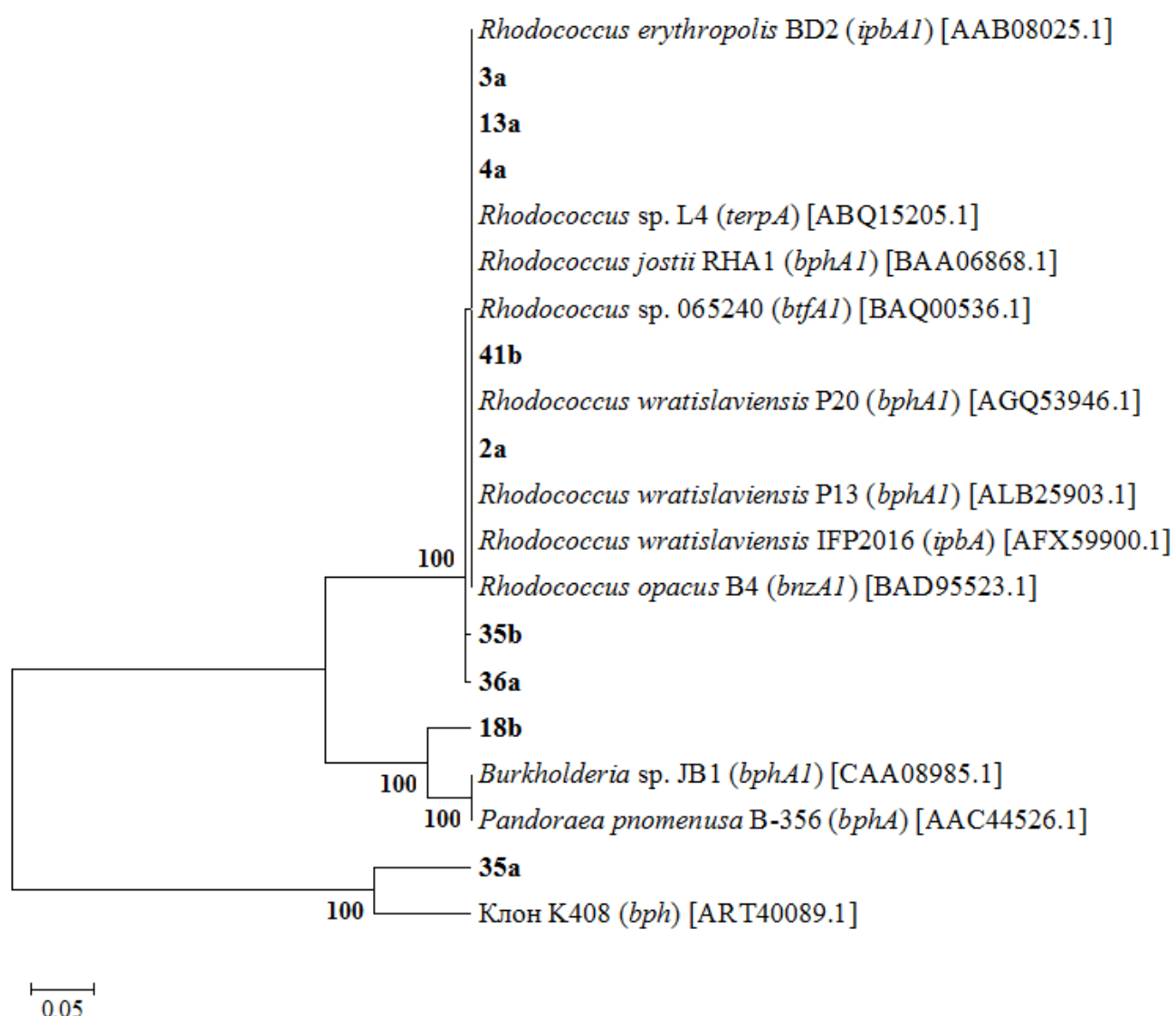


Рисунок 3 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”- анализа.

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

С использованием ПЦР-РВ в тотальной ДНК, выделенной из почвы, отобранной на территории завода ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ”, выявлено наличие бактериальных генов 16S рРНК в количестве $1,05 \times 10^{11}$ ($\pm 1,59 \times 10^8$) копий гена на 1 г почвы, обнаружено значительное количество копий РАН-RHD $_{\alpha}$ -генов диоксигеназ ($2,41 \times 10^8$ ($\pm 3,57 \times 10^7$) на 1 г почвы) грамотрицательных бактерий. Соотношение количества копий гена РАН-RHD $_{\alpha}$ к количеству копий гена 16S рРНК в исследуемом микробном сообществе составляло около 10^{-3} .

При помощи клонирования была создана библиотека фрагментов *bphA1*-генов (активный центр фермента БДО), состоящая из 72 рекомбинантных клонов. На основании ПДРФ-анализа выявлено 4 геномгруппы, далее определены нуклеотидные последовательности и проведен сравнительный анализ представителей каждой геномгруппы.

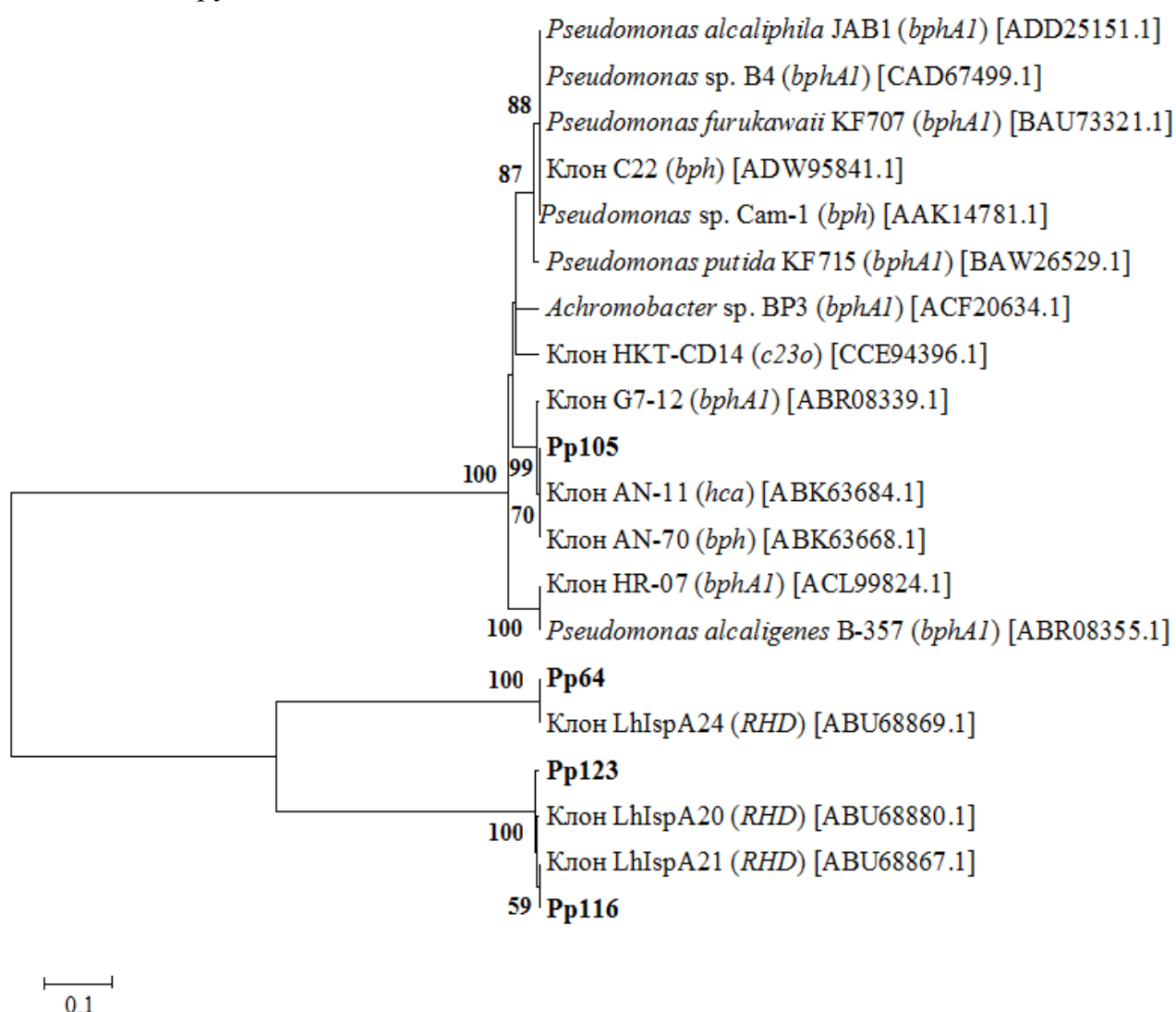


Рисунок 4 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”- анализа.

Большинство клонированных фрагментов ДНК, составляющих 80 % от общего количества полученных рекомбинантных клонов, имели высокий процент сходства (97,8–99,5 %) с генами, кодирующими α -субъединицы диоксигеназ некультивируемых бактерий из почвы, длительное время загрязненной ПХБ (Cárcer *et al.*, 2007). Секвенированный фрагмент ДНК клона Pp105 (IV геномогруппа, ~ 11 % от общего количества рекомбинантных клонов) имел высокий процент сходства (98,4–99,3 %) с генами α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназ (ген *bphA1*) некультивируемых бактерий (Vezina *et al.*, 2008) и 91 % с подобными генами бактерий рода *Pseudomonas* (*P. putida* KF715, *Pseudomonas* sp. Cam1, *P. alcaliphila* JAB1, *P. pseudoalcaligenes* KF707) (рисунок 4). Наличие в выделенных образцах ДНК нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы псевдомонад, указывает на присутствие в исследуемом микробном сообществе бактерий-деструкторов бифенила, с большой вероятностью – бактерий рода *Pseudomonas*.

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

Методом накопительного культивирования с образцом сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” (г. Пермь) была получена ассоциация микроорганизмов (SIB), способная использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии (активный бактериальный рост на среде K1 с бифенилом: ОП₆₀₀ 0,5 ± 0,2 о.е.). Из исследуемой бактериальной ассоциации (накопительной культуры) выделена тотальная ДНК. Скрининг тотальной ДНК с праймерами (Iwai *et al.*, 2010) на наличие нуклеотидных последовательностей (генов-*bphA1*), кодирующих α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, показал наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины (~ 500 п.н.). На основании полученных результатов нами было сделано предположение, что в исследуемом микробном сообществе сточных вод предприятия АО “Сибур-Химпром” присутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений, в том числе и бифенила.

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

При помощи клонирования создана библиотека фрагментов *bphA1*-генов (активный центр БДО) бактерий микробного сообщества донных отложений р. Чапаевки (Самарская область), включающая 88 клонов. Методом ПДРФ-анализа выявлены 2 геномогруппы *bphA1*-генов и проанализированы нуклеотидные последовательности клонов каждой геномогруппы (рисунок 5).

При филогенетическом анализе клонов Ch9 (геномогруппа I, ~ 8 % от общего количества рекомбинантных клонов) и Ch14 (геномогруппа II, ~ 92 %) обнаружено высокое сходство (98,9–99,2 %) с генами (*bphA1*) α -субъединиц бифенил 2,3-диоксигеназы (БДО, бензол/толуол подсемейство ДО (Б/Т ДО)) некультивируемых бактериальных клонов, а также с *bphA1*-подобными генами других Б/Т ДО штаммов рода *Rhodococcus*. Выявлено высокое процентное сходство (99,2–98,1 %) *bphA1*-генов исследуемых клонов с генами бензотрифторид ДО (*btfA1*), толуол ДО (*terpA*) и 1,2-дигидробензол-1,2-диол дегидрогеназы (*bnzB*) (рисунок 5).

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

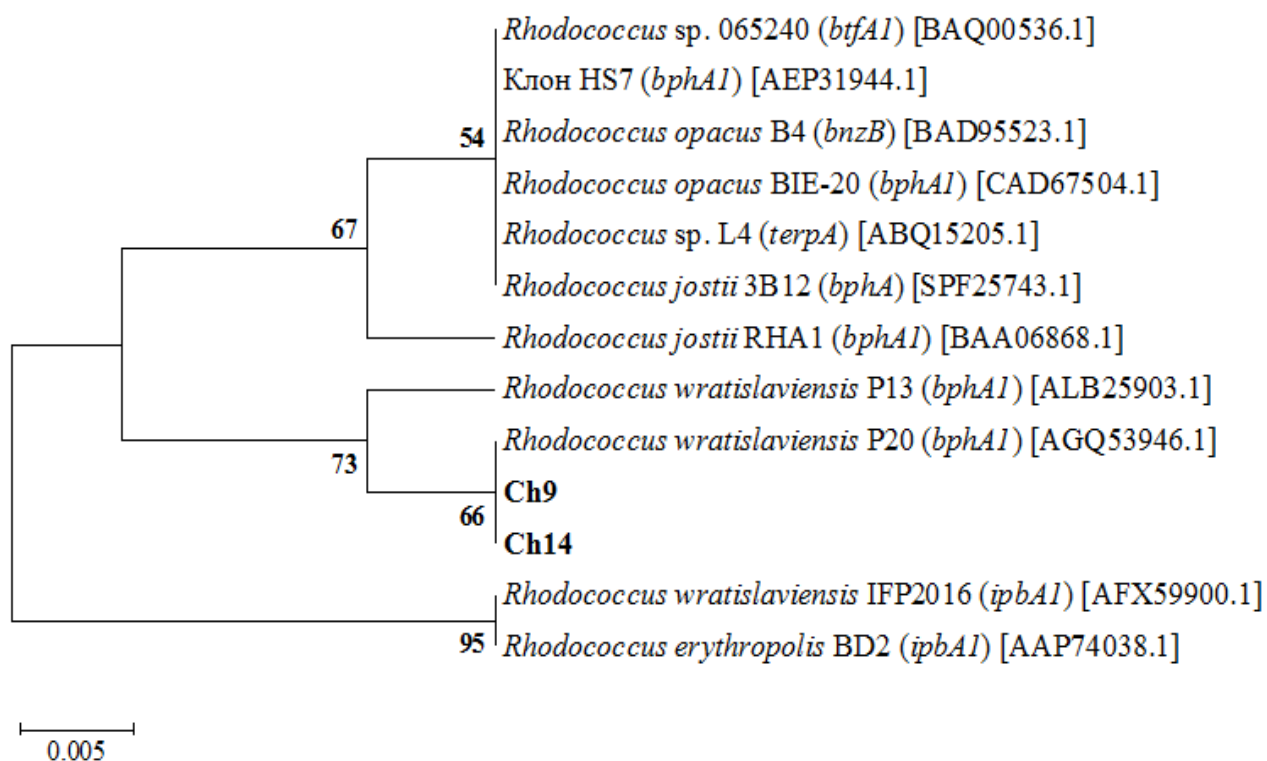


Рисунок 5 – Положение *bphA1*-генов исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”- анализа.

Скрининг *bphA1*-генов в загрязненных экосистемах полуострова Крым

Методом накопительного культивирования на бифениле получены две микробные ассоциации, обозначенные как EV (образец донных отложений порта г. Евпатория) и ФЕО (образец почвы с территории Феодосийского предприятия по обеспечению нефтепродуктами, г. Феодосия). С матриц ДНК, выделенных из накопительных культур, была проведена амплификация *bphA1*-генов (Iwai *et al.*, 2010), в результате которой получены ПЦР-продукты ожидаемой длины (~ 500 п.н.). Секвенирование и дальнейший анализ амплифицированных *bphA1*-генов с тотальной ДНК накопительной культуры образца почвы с территории нефтебазы г. Феодосия выявил высокую гомологию (100 %) с аналогичными генами некультивируемого бактериального клона HR-07 (FJ532315.1) (метагеномный анализ ПХБ-загрязненной почвы с территории свалки (Чехия) (Uhlik *et al.*, 2009)) и высокий процент сходства (99,78 %) с типовым штаммом *Pseudomonas alcaligenes* В-357^T (EF596934.1), который является активным деструктором бифенила и 4-хлорбифенила (Vézina *et al.*, 2008). Можно предположить, что в исследуемом микробном сообществе присутствуют деструкторы бифенила рода *Pseudomonas*. В то же время, нуклеотидная последовательность ампликона, полученная с тотальной ДНК образца донных отложений порта г. Евпатория, имела невысокую гомологию с генами, кодирующими α -субъединицы диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо, следующих штаммов: 72,6 % сходства с аэробным грамположительным штаммом *Conexibacter woesei* DSM 14684 (класс *Actinobacteria*) (Pukall *et al.*, 2010) и 71,9 % – со штаммом-деструктором *Pigmentiphaga* sp. Н8, который относится к семейству *Alcaligenaceae* (Chen *et al.*, 2018). Таким образом, в результате

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

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

При постановке накопительного культивирования с образцом почвы с перевала Кыртыкауш на минеральной среде K1 с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии бактериальный рост не наблюдался. Кроме того, в ходе дальнейшего исследования методом ПЦР установлено, что в тотальной ДНК исследуемого образца отсутствуют гены деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*-гены). Из вышеизложенного следует, что в микробном сообществе почвы с перевала Кыртыкауш, вероятно, отсутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений (бифенила/ПХБ). Химический анализ (метод хромато-масс-спектрометрии) не выявил ароматических загрязнителей в исследуемом образце почвы. Полученные данные указывают на то, что перевал Кыртыкауш на сегодняшний день является экологически чистой территорией.

Бактерии-деструкторы рода *Pseudomonas*

Из микробного сообщества техногеннозагрязненной почвы (территория ОАО “Пермский завод смазок и СОЖ”) выделено 2 активных штамма-деструктора бифенила, обозначенных VRP2-2 и VRP2-6. Штаммы характеризовались активным ростом на бифениле (ОП₆₀₀ 0,4–0,7 о.е.) и, следовательно, способностью эффективно использовать в качестве ростового субстрата незамещенный бифенил.

Сравнение BOX-ПЦР фингерпринтов показало, что штаммы VRP2-2 и VRP2-6 отличаются друг от друга на молекулярно-генетическом уровне (рисунок 6). На основе анализа гена 16S рРНК штаммы VRP2-2 и VRP2-6 отнесены к роду *Pseudomonas* и имеют наибольшее сходство с типовыми штаммами *P. alcaligenes* NBRC 14159^T (100 % сходства) и *P. taiwanensis* BCRC 17751^T (99 % сходства), соответственно.

При анализе экстрахромосомальной ДНК (метод пульс-электрофореза) в клетках штамма VRP2-6 обнаружена плазмида размером около 280 т.п.н. В штамме VRP2-2 плазмидной ДНК выявлено не было (рисунок 7).

При изучении биodeградационных свойств установлено, что штаммы VRP2-2 и VRP2-6 используют в качестве единственного источника углерода и энергии не только бифенил, а также моноароматические углеводороды: *орто*-фталевую, бензойную кислоты. Штамм VRP2-6 активно рос на *пара*-оксибензойной, протокатеховой, салициловой кислотах, в то время как штамм VRP2-2 не утилизировал эти соединения, но осуществлял трансформацию протокатеховой кислоты. Штаммы не были способны к росту на нафталине, фенантрене, феноле, толуоле (таблица 1).

На основании проведенных исследований можно предположить, что деградация бифенила штаммами VRP2-2 и VRP2-6 осуществляется по классическому пути через образование пентадиеновой и бензойной кислот, с последующим разложением бензойной кислоты (Pieper, Seeger, 2008). Результаты ПЦР-анализа показали, что в геноме обоих штаммов присутствует ген *benA* (~ 520 п.н.), кодирующий малую субъединицу бензоат 1,2-диоксигеназы – ключевого фермента разложения бензоата у бактерий, что может указывать на присутствие метаболического пути разложения бензоата через образование ключевого интермедиата – пирокатехина (Ridi *et al.*, 2018)

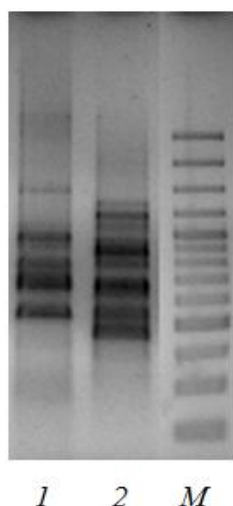


Рисунок 6 – **ВОХ-ПЦР-профили штаммов VRP2-2 (1) и VRP2-6 (2).** *M* – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

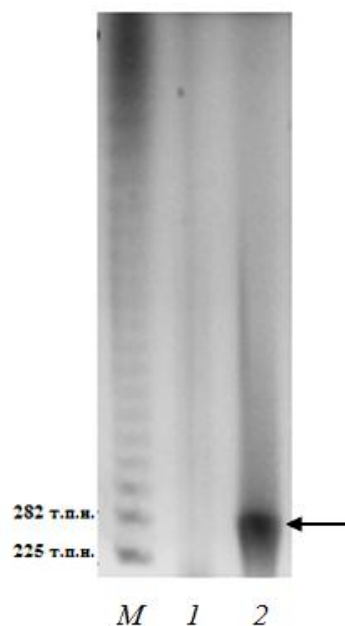


Рисунок 7 – **Электрофореграмма плазмидных ДНК исследуемых штаммов, выращенных на среде К1 с бифенилом.** *M* – маркер молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США); 1 – штамм VRP2-2; 2 – штамм VRP2-6.

Таблица 1 – **Рост штаммов *Pseudomonas* spp. VRP2-2 и VRP2-6 на ароматических соединениях**

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

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

Характер роста штамма VRP2-6 на ПОБК и ПКК (таблица 1) позволяет предположить, что штамм VRP2-6 способен также осуществлять разложение бензоата по пути деструкции этих соединений (<https://www.genome.jp>).

При культивировании в жидкой среде на бифениле штамм VRP2-6 демонстрировал более высокие ростовые показатели (скорость роста, прирост биомассы), чем штамм VRP2-2 (рисунок 8), и был проверен на способность осуществлять разложение хлорированных бифенилов (таблица 2).

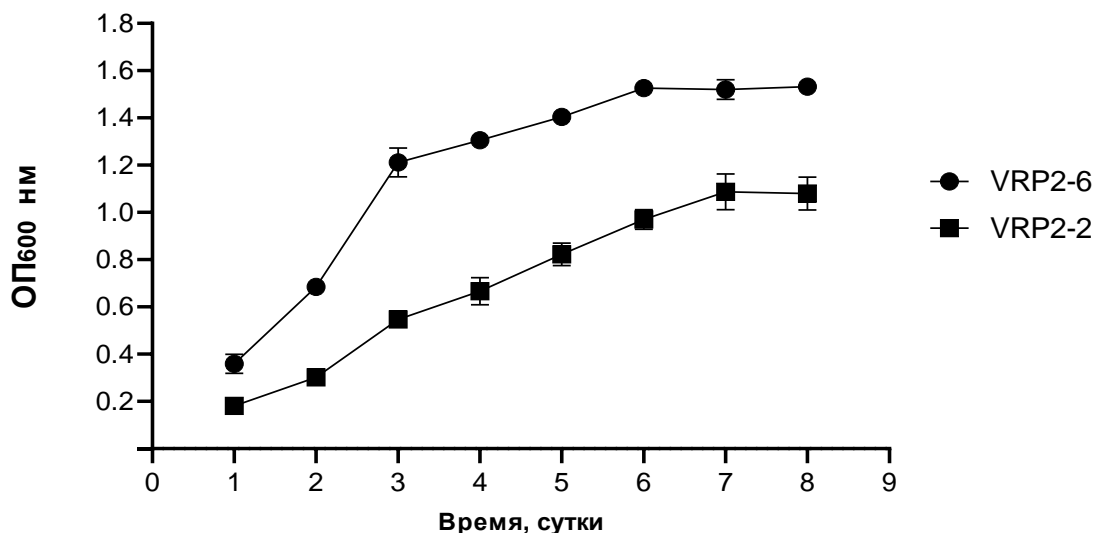


Рисунок 8 – Рост штаммов *Pseudomonas* sp. VRP2-2 и *Pseudomonas* sp. VRP2-6 на бифениле (1 г/л).

Показано, что штамм VRP2-6 эффективно утилизирует *ortho*- и *para*-моноХБ в высокой концентрации (250 мг/л), окисляя нехлорированное кольцо молекулы ХБ (таблица 2). При культивировании на 2-ХБ и 4-ХБ уже к 3 часам количество хлорбифенилов в среде уменьшалось в 4,9 и 4,3 раза, соответственно. За 24 часа инкубации 2-ХБ был практически полностью утилизирован (97,1 % от теорет. возможного), а разложение 4-ХБ осуществлено на 82,3 %. В среде не обнаружены промежуточные продукты метаболизма – 2-гидроксо-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК), что может указывать на высокую активность ферментных систем деструкции моноХБ у штамма VRP2-6 (Maltseva *et al.*, 1999). В исследуемые периоды времени в среде зарегистрированы хлорбензойные кислоты в количестве 2,0–3,5 мг/л (таблица 2). Наличие таких небольших количеств ХБК (не более 2 % от теорет. возможного), может указывать на последующее разложение клетками штамма этих хлорсодержащих метаболитов. Разложение штаммом VRP2-6 дихлорированного бифенила (2,4'-диХБ) осуществлялось менее активно, чем монохлорбифенилов. Так к 24 часам количество субстрата в среде культивирования составляло 80 % от теорет. возможного (таблица 2). Было зарегистрировано накопление продукта *meta*-расщепления дихлорбифенила – 3,8-Cl ГОФДК с $\lambda_{\max} = 395/396$ нм, что указывает на 2,3-диоксигенирование *para*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ (Maltseva *et al.*, 1999). Кроме того, в среде культивирования происходило накопление небольшого количества 4-ХБК, что может свидетельствовать о трансформации 2,4'-диХБ по пути предпочтительного 2,3-диоксигенирования *ortho*-хлорированного кольца (Maltseva *et al.*, 1999). Таким образом, БДО штамма VRP2-6 может осуществлять окисление как *ortho*-, так и *para*-замещенного кольца молекулы 2,4'-диХБ.

Таблица 2 – Деструкция хлорбифенилов штаммом *Pseudomonas* sp. VRP2-6

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

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

Методом ПЦР установлено наличие у штаммов VRP2-2 и VRP2-6 гена *bphA1*, кодирующего α -субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы. Данный факт подтверждает, что в разложении бифенила/ПХБ участвуют ферменты, кодируемые кластером *bph*-генов классического “верхнего” пути деструкции бифенила, осуществляющие конверсию бифенила до бензойной кислоты (Pieper, Seeger, 2008). Филогенетический анализ секвенированных фрагментов гена *bphA1* штаммов VRP2-2 и VRP2-6 показал их идентичность и наибольшее сходство (на уровне 89,8–97,3 %) с генами α -субъединицы БДО деструкторов бифенила/ПХБ рода *Pseudomonas*. Наиболее близкими (уровни сходства 97,3 и 97,1 %, соответственно) по *bphA1*-генам являются деструкторы бифенила *P. putida* В6-2 (Li *et al.*, 2009) и *Pseudomonas* sp. В3В (Kahl, Hofer, 2003). Высокий процент сходства (около 90 %) *bphA1*-гены исследуемых штаммов имели с подобными генами хорошо охарактеризованных штаммов – *P. furukawaii* KF707 и *P. putida* KF715, которые являются высокоактивными деструкторами хлорированных бифенилов/ПХБ (Suenaga *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2018).

Бактерии-деструкторы рода *Rhodococcus*

С загрязненных территорий Пермского края и Самарской области выделено 7 штаммов бактерий (обозначенных КВВ16, ВВЛ12-2, FXO1, FXO2, VR31-1, VR33 и VR43-1), у которых зарегистрирован активный рост на бифениле (ОП₆₀₀ 0,7–1,0 о.е.). На основании анализа гена 16S рНК штаммы были отнесены к роду *Rhodococcus*: штамм ВВЛ12-2 имел высокое сходство (99,73 %) с типовым штаммом вида *R. jostii*, остальные штаммы имели 100 % сходство с типовым штаммом вида *R. wratislaviensis*. Установлено, что преимущественно все исследуемые штаммы (КВВ16, FXO1, FXO2, VR31-1, VR33, VR43-1) характеризовались наличием двух плазмид размером

~ 400 т.п.н. и ~ 450 т.п.н., а в клетках штамма BBL12-2 обнаружена плаزمида размером ~ 650 т.п.н. (рисунок 9).

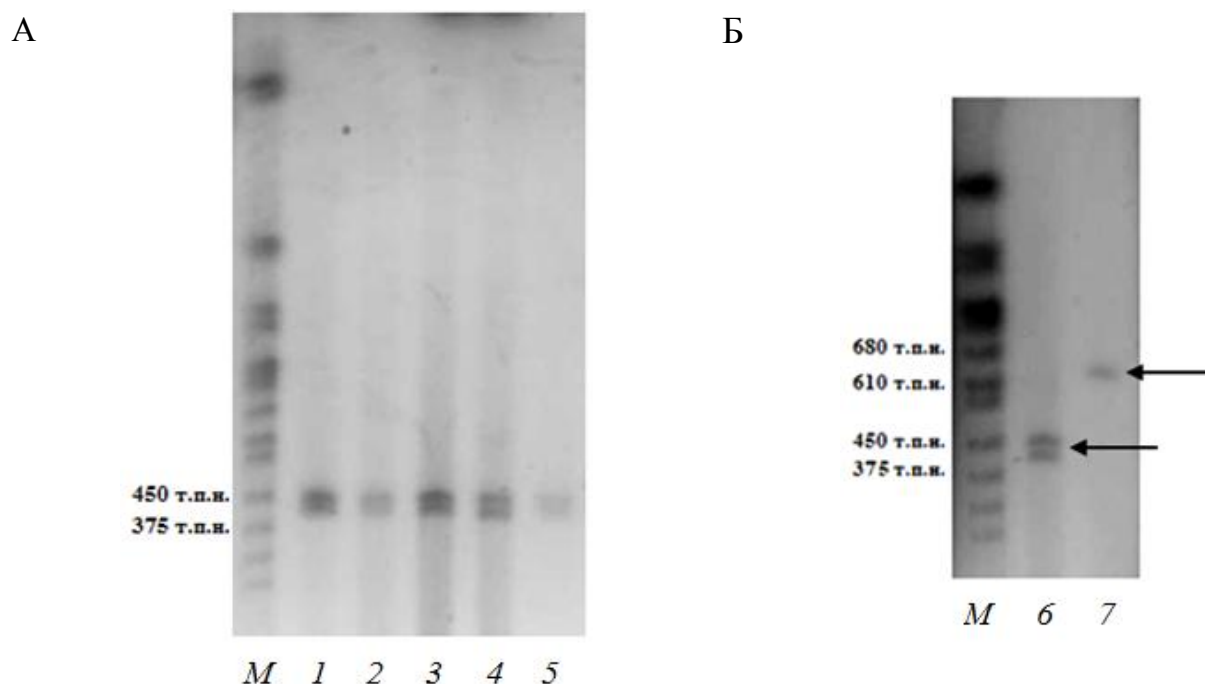


Рисунок 9 – Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов рода *Rhodococcus*, выращенных на среде К1 с бифенилом (А, Б). М – маркер молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США); 1 – штамм VR31-1; 2 – штамм VR33; 3 – штамм VR43-1; 4 – штамм FXO1; 5 – штамм FXO2; 6 – штамм KBB16; 7 – штамм BBL12-2.

Таблица 3 – Рост штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* в жидкой минеральной среде К1 на ароматических соединениях

Субстрат	Штамм						
	KBB16	BBL12-2	FXO1	FXO2	VR31-1	VR33	VR43-1
Бифенил	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Нафталин	+++	++	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+++	+++	+++
орто-Фталева кислота	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
пара-Оксибензой- ная кислота	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Протокатехо- вая кислота	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+	++	+++	+++	+++
Бензойная кислота	+++	+++	+++ (т.о.с.)	+++ (т.о.с.)	+++	+++	+++

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

Таблица 4 – Деструкция хлорбифенилов штаммами *Rhodococcus* sp. КВВ16 и VR31-1

Штамм	Субстрат	Время инкубации (ч)	Содержание субстрата		Продукт деструкции				
			мг/л	%*	ГОФДК		ХБК	мг/л	%*
					$\lambda_{\max, \text{нм}}$	ОП, ед.			
КВВ16	2-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	392	0,336		0,49 ± 0,02	0,62
		3	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2-ХБК	1,05 ± 0,03	1,34
		24	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		1,05 ± 0,05	1,34
	4-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,22 ± 0,04	0,28
		3	н.д.	н.д.	416	0,298	4-ХБК	0,50 ± 0,03	0,63
		24	н.д.	н.д.	424	0,357		0,51 ± 0,04	0,65
	2,4'-ХБ	0	44,60 ± 0,01	100,00	396	0,340		0,007 ± 0,002	0,02
		3	36,38 ± 0,02	81,56	396	0,472	2-ХБК	0,009 ± 0,005	0,03
		24	20,37 ± 0,03	45,67	396	1,046		н.д.	н.д.
VR31-1	2-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	389	0,318		н.д.	н.д.
		3	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	2-ХБК	0,96 ± 0,03	1,22
		24	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.		1,01 ± 0,05	1,29
	4-ХБ	0	94,20 ± 0,01	100,00	н.д.	н.д.		0,31 ± 0,02	0,39
		3	н.д.	н.д.	411	0,317	4-ХБК	0,46 ± 0,05	0,58
		24	н.д.	н.д.	416	0,376		0,51 ± 0,02	0,65
	2,4'-ХБ	0	44,60 ± 0,01	100,00	396	0,340		0,015 ± 0,004	0,047
		3	40,20 ± 0,02	90,13	396	0,636	4-ХБК	0,024 ± 0,002	0,075
		24	36,68 ± 0,01	82,24	396	1,074		0,031 ± 0,002	0,099

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

Помимо способности поддерживать эффективный рост на среде с добавлением бифенила, в качестве единственного источника углерода и энергии, штаммы рода *Rhodococcus* демонстрировали хороший рост на других полиароматических и моноароматических субстратах (таблица 3). Анализируя полученные данные, можно сделать предположение, что деструкция бифенила исследуемыми штаммами осуществляется с образованием пентадиеновой и бензойной кислот. Все штаммы продемонстрировали активный рост на бензойной кислоте. Активный рост штаммов KBB16, BBL12-2, VR31-1, VR33 и VR43-1 на *para*-оксибензойной и протокатеховой кислотах (таблица 3) может указывать на способность данных штаммов осуществлять разложение бензойной кислоты не только по классическому пути с образованием пирокатехина, но и пути деструкции ПОБК и ПКК. (<https://www.genome.jp>).

Штаммы *Rhodococcus* sp. KBB16 и *Rhodococcus* sp. VR31-1, выделенные из разных экотопов (грунт около солеотвала, г. Березники, Пермский край и донные отложения реки Чапаевки, Самарская область) и имеющие различие на молекулярно-генетическом уровне (по BOX-ПЦР профилям), проверили на способность разлагать хлорированные бифенилы. В ходе эксперимента показано, что штаммы эффективно осуществляют деструкцию *ortho*- и *para*-моноХБ в концентрации 96 мг/л, окисляя нехлорированное кольцо молекулы ХБ (таблица 4). При культивировании штаммов на 2-ХБ и 4-ХБ уже к 3 часам инкубации субстраты были полностью утилизированы. Следует отметить, что в среде культивирования с 2-ХБ и 4-ХБ были детектированы соответствующие хлорбензойные кислоты в количестве 0,22-1,05 мг/л (таблица 4). Наличие таких небольших количеств ХБК может указывать на последующее разложение клетками штаммов KBB16 и VR31-1 этих хлорсодержащих метаболитов. Разложение штаммами KBB16 и VR31-1 дихлорированного бифенила (2,4'-диХБ) осуществлялось менее активно, чем монохлорбифенилов. Так, к 24 часам количество субстрата в среде культивирования штамма VR31-1 составляло 82,24 % от теорет. возможного. Штамм KBB16 характеризовался большей активностью по отношению к дихлорированному бифенилу: остаточное количество 2,4'-диХБ в среде культивирования к 24 часам составляло 45,67 % от теорет. возможного. Для исследуемых штаммов KBB16 и VR31-1 зарегистрировано накопление продукта *meta*-расщепления дихлорбифенила – 3,8-Cl ГОФДК ($\lambda_{\max} = 396$ нм), количество которого увеличивалось в процессе инкубации и достигало наибольших значений к 24 часам (таблица 4) это указывает на то, что БДО обоих штаммов осуществляет 2,3-диоксигенирование *para*-хлорированного кольца 2,4'-диХБ (Maltseva *et al.*, 1999). В среде культивирования штамма VR31-1 также происходило накопление небольшого количества 4-ХБК (0,031 г/л – через 24 часа), что может свидетельствовать о трансформации 2,4'-диХБ по пути 2,3-диоксигенирования *ortho*-хлорированного кольца (Maltseva *et al.*, 1999). Таким образом, БДО штамма VR31-1 может осуществлять окисление как *para*-, так и *ortho*-замещенного кольца молекулы 2,4'-диХБ.

Скрининг *bphA1*-генов показал наличие ПЦР-продукта ожидаемого размера (около 500 п.н.) у 7 исследуемых штаммов-деструкторов. Анализ нуклеотидных последовательностей участков генов *bphA1*, кодирующих кластер Риске, штаммов VR31-1, VR33 и VR43-1 (выделены из донных отложений реки Чапаевки): показал 100 %-ное сходство с генами α -субъединиц БДО штаммов *R. wratislaviensis* P13 и P20, и изопропилбензол ДО штамма *R. erythropolis* BD2. Штаммы *R. wratislaviensis* P13, P20 были выделены из почвы, загрязненной хлорорганическими соединениями (территория предприятия ОАО “Галоген”, г. Пермь) и являются активными деструкторами бифенила

и хлорированных бифенилов (Шумкова и др., 2015). Меньший процент сходства (99,7 %) был получен при сравнении участков *bphA1*-генов исследуемых штаммов с генами *btfA*, *bnzB* и *terpA* представителей *R. wratislaviensis*. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *bphA1*, кодирующих активный центр α -субъединицы БДО, штаммов КВВ16, BBL12-2, FXO1 и FXO2, выделенных с территории Пермского края, имели наибольший процент сходства с генами, кодирующими α -субъединицу БДО, некультивируемых бактерий (99,33 %) и штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ (сходство 100–99,11 %) рода *Rhodococcus*.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

5. Установлено, что семь штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ рода *Rhodococcus*, изолированных из экотопов Пермского края и Самарской области, имели наибольшее сходство с *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T (100 %, ген 16S рНК), а штамм BBL12-2 – с *R. jostii* DSM 44719^T (99,7 %, ген 16S рНК). Филогенетический анализ *bphA1*-генов штаммов рода *Rhodococcus* выявил высокий уровень сходства (до 100 %) с гомологичными генами представителей этого рода, в том числе с *bphA1*-генами активного деструктора ПХБ *R. jostii* RHA1 (99,1 %). Большинство исследуемых штаммов характеризовались наличием плазмид размером около 400 т.п.н. и 450 т.п.н., штамм BBL12-2 содержал плазмиду размером около 650 т.п.н.

6. Показано, что деструкторы бифенила утилизировали 2- и 4-моноклорбифенилы: *Pseudomonas* sp. VRP2-6 в концентрации 250 мг/л (97,1 % и 82,3 % за 24 часа, соответственно) и штаммы рода *Rhodococcus* в концентрации 96 мг/л (100 % за 3 часа). *Pseudomonas* sp. VRP2-6 и *Rhodococcus* sp. КВВ16 способны разлагать 2,4'-дихлорбифенил в концентрации 44,6 мг/л (20,0 % и 54,3 % за 24 часа,

соответственно), осуществляя окисление как *para*-, так и *орто*-замещенного кольца молекулы дихлорбифенила. Активность штаммов по отношению к хлорированным бифенилам указывает на перспективность их использования в биотехнологических целях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Шумкова, Е.С. Разнообразие ключевых генов деструкции бифенила в микробном сообществе прибрежных донных отложений Анадырского залива / Е.С. Шумкова, А.О. Воронина, Н.В. Кузнецова, Е.Г. Плотникова // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 7. – С. 841–846 (Scopus, Web of Science).
2. Ястребова, О.В. Микробное сообщество техногеннозагрязненного грунта района солеразработок (г. Березники) / О.В. Ястребова, А.О. Воронина, Л.Н. Ананьина, Е.С. Корсакова, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2018. – №. 2. – С. 188-194.
3. Воронина, А.О. Разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе техногеннозагрязненной почвы и выделение новых бактерий рода *Pseudomonas*–деструкторов бифенила/хлорбифенилов / А.О. Воронина, Д.О. Егорова, Е.С. Корсакова, Е.Г. Плотникова // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – №. 4. – С. 438-449 (Scopus, Web of Science).
4. Воронина, А.О. Деструктор бифенила *Rhodococcus* sp. VR43-1: выделение, молекулярно-биологическая характеристика / А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2019. – №. 1. – С. 48-55.

Публикации в других журналах и сборниках

1. Воронина, А.О. Исследование ключевых генов деструкции бифенила бактерий донных отложений, отобранных в районе порта г. Анадырь / А.О. Воронина, Н.В. Кузнецова, Е.С. Шумкова, Е.Г. Плотникова // V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых “Симбиоз – Россия 2012”. – Тверь. – 2012. – С. 220-222.
2. Воронина, А.О. Разнообразие ключевых генов деструкции бифенила (*bphA1*), в микробном сообществе прибрежной зоны Берингова моря / А.О. Воронина, Е.С. Шумкова, Е.Г. Плотникова // 17-я Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пушкино. – 2013. – С. 185-186.
3. Шумкова, Е.С. Подбор и тестирование праймеров для детекции генов α - субъединицы бифенил-2,3-диоксигеназы бактерий, выделенных из загрязненных почв / Е.С. Шумкова, А.О. Воронина, Н.В. Кузнецова, Е.Г. Плотникова // Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи “Экотоксикология – 2013”. – Тула. – 2013. – С. 67.
4. Воронина, А.О. Изучение *bph*-генов бактерий-деструкторов бифенила из техногеннозагрязненной почвы / А.О. Воронина, Е.С. Шумкова // VII Всероссийский конгресс молодых биологов “Симбиоз – Россия 2014. – Екатеринбург. – 2014. – С. 175-177.
5. Воронина, А.О. Бактерии-деструкторы бифенила из микробного сообщества донных отложений, загрязненных токсичными хлорароматическими соединениями / А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск, приуроченный к Пермскому научному форуму. – Пермь. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 584-586.

6. Корсакова, Е.С. Поиск генов деградации стойких органических загрязнителей районов промышленной соледобычи с целью обнаружения активных бактерий-деструкторов / Е.С. Корсакова, А.В. Шипова, А.О. Воронина // 21-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пушино. – 2016. – С. 24-25.

7. Воронина, А.О. Поиск генов деструкции бифенила в микробном сообществе района солеразработок г. Березники / А.О. Воронина, А.А. Пьянкова, Е.С. Корсакова // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения”. – Пермь. – 2016. – С. 18-19.

8. Воронина, А.О. Разнообразие ключевых генов деструкции бифенила в микробном сообществе района солеразработок (г. Березники, Пермский край) / А.О. Воронина, А.А. Пьянкова, Е.С. Корсакова, Е.Г. Плотникова // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Биодиагностика состояние природных и природно-техногенных систем”. – Киров. – 2016. – С. 320-323.

9. Корсакова, Е.С. Разнообразие генов деградации ароматических соединений в микробном сообществе района промышленных солеразработок (Пермский край) / Е.С. Корсакова, А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // IX Международный конгресс “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. – Москва. – 2017. – Т.2. – С. 475-476.

10. Воронина, А.О. Разнообразие ключевых генов деструкции бифенила в микробном сообществе техногеннозагрязненной почвы (г. Пермь) / А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // XII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Экология родного края: проблемы и пути их решения”. – Киров. – 2017. – Т.2. – С. 333-335.

11. Воронина, А.О. Штаммы-деструкторы бифенила рода *Pseudomonas*, выделенные из техногеннозагрязненных почв г. Перми / А.О. Воронина, Е.Г. Плотникова // 21-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пушино. – 2017. – С. 34-35.

12. Воронина, А.О. Гены деструкции ароматических соединений в микробном сообществе почвы, загрязненной отходами калийного производства (г. Березники, Пермский край) / А.О. Воронина, Е.С. Корсакова, Л.Н. Ананьина, Е.Г. Плотникова // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов “Симбиоз – Россия 2017”. – Казань. – 2017. – С. 73-74.

Воронина Анна Олеговна

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

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать Формат 60×90/16.

Усл. печ. л. 1. Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный

Отпечатано в “ИЭГМ УрО РАН”
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13