

УДК 579.222:577.217

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ α -СУБЪЕДИНИЦЫ БИФЕНИЛ ДИОКСИГЕНАЗЫ ШТАММОВ РОДА *RHODOCOCCLUS* И ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКЦИИ ХЛОРИРОВАННЫХ- И ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

© 2021 г. Д. О. Егорова^{1,*}, Т. И. Горбунова², Т. Д. Кирьянова²,
М. Г. Первова², Е. Г. Плотникова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620108 Россия

*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

На основе моделирования белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) (КФ 1.14.12.18), ключевого фермента деструкции бифенила и полихлорбифенилов (ПХБ), установлено, что BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7(=ВКМ Ас-2623D) имела наибольший уровень сходства с классическими бифенилдиоксигеназами (БДО) штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*, структура BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* СН628 – с нафталин диоксигеназой штаммов рода *Rhodococcus*. Структура BphA1 *Rhodococcus ruber* P25(=ИЭГМ 896) была уникальной, так как не было выявлено белковых молекул с высоким уровнем сходства. Показано, что все исследуемые штаммы, несмотря на различия в строении BphA1, осуществляли диоксигенирование незамещенного цикла в молекулах 3,4-дихлорбифенила (ПХБ 12) монохлорированных и моногидрокси-монохлорированных бифенилов (смесь Р). Уровень деструкции ПХБ 12 и смеси Р составил 95.4–100% при 30°C за 10 сут при начальной концентрации 0.1 г/л. Установлено, что изменение температуры (10–50°C) оказывало наибольшее влияние на активность штамма *R. ruber* P25 (снижение в 3.1–3.9 раза). Штаммы *R. wratislaviensis* СН628 и *R. wratislaviensis* КТ112-7 эффективно разлагали ПХБ 12 в пределах 20–40 и 10–30°C соответственно, при уровне деструкции 93.2–100%.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, бифенил диоксигеназа, 3,4-дихлорбифенил, гидроксифенил, температура, деструкция

DOI: 10.31857/S0555109921060027

Ремедиация объектов окружающей среды (грунтов, воды и воздуха) с помощью бактериальных штаммов, обладающих способностью к деградации токсикантов, является актуальной задачей современных биотехнологий. Из-за высокой сорбционной способности наиболее проблемным объектом для микробиологической очистки (восстановления) является почва [1]. В то же время, именно почвогрунт является благоприятной средой обитания бактериальных сообществ, среди которых имеются потенциальные штаммы-деструкторы, адаптированные к определенным классам загрязняющих почву веществ и материалов. Особо пристальное внимание разработчиков новых биотехнологий приковано к проблемам ремедиации природных объектов после их

загрязнения стойкими органическими загрязнителями (СОЗ), основную часть которых составляют соединения хлорароматической природы (<http://www.pops.int>). Наибольший вклад в эту группу хлораренов вносят полихлорбифенилы (ПХБ), значительная доля которых (около 40% от всех произведенных ПХБ) аккумулирована в окружающей среде из-за неправильного обращения с этими материалами [2]. Установленная высокая токсичность ПХБ и их опасность для сложившихся биот подкрепляется длительными периодами полураспада этих хлораренов, достигающих в случае высокохлорированных соединений нескольких десятков лет [3].

Находясь в природных объектах, ПХБ в зависимости от климатических условий могут подвергать-

МЕТОДИКА

ся различным окислительным процессам, трансформируясь в первичные продукты окисления – гидроксипроизводные (ПХБ-ОН) [4]. Соединения ПХБ-ОН, обладая более высокой гидрофильностью по сравнению с исходными ПХБ, являются и более доступными для микробов: бактерий, грибов. Но даже самые развитые биотехнологические методы и подходы не могут дать однозначных схем превращений всех ПХБ, попавших в природу, и предположить четкие направления бактериальной деструкции ПХБ и ПХБ-ОН по причине сложного состава технических ПХБ. Таким образом, для более глубокого понимания процессов трансформации ПХБ в окружающей среде, необходимы комплексные исследования, сочетающие методы химической модификации ПХБ в ПХБ-ОН и микробной деструкции данных соединений.

Первичная атака молекулы ПХБ и ПХБ-ОН путем внедрения в молекулу двух гидроксильных групп осуществляется ферментом бифенил-2,3-диоксигеназой (BphA, БДО, КФ 1.14.12.18) [5]. BphA входит в семейство гидрокселирующих диоксигеназ и состоит из трех α -больших (BphA1) и трех β -малых (BphA2) субъединиц, ферредоксина (BphA3) и ферредоксин-оксидоредуктазы (BphA4). За распознавание конгенов ПХБ и связывание с ними отвечает α -субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы [6]. В связи с этим особый интерес при изучении возможности разложения ПХБ и ПХБ-ОН аэробными бактериями представляет структура α -субъединицы данного фермента у активных штаммов-деструкторов.

Восстановление территорий, загрязненных ПХБ, осложняется нестабильными температурными условиями в течение вегетационного сезона. Известно, что выход температуры окружающей среды за рамки оптимального диапазона культивирования бактериальных штаммов негативно сказывается на их биодegradативном потенциале [8]. Разложение ПХБ осуществляется психрофильными, мезофильными и термофильными штаммами [8–12]. Температура, при которых описанные штаммы проявляли окислительную активность по отношению ПХБ, составляет 4–60°C. Однако, наиболее высокие показатели отмечены при температурах близких к 30°C [8–11]. Сведения о разложении ПХБ в неоптимальных условиях ограничены.

Цель работы – моделирование первичной, вторичной и третичной структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов *Rhodococcus ruber* P25, *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 и *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, а также анализ их способности к деструкции 3,4-дихлорбифенила и его химически модифицированных производных при различных температурах.

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штаммы рода *Rhodococcus*, использованные в настоящем исследовании, выделены ранее из почв на территории России, загрязненных хлорароматическими соединениями. Штамм *Rhodococcus ruber* P25 выделен из почв в г. Пермь (Россия), депонирован в Коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (=ИЭГМ 896) [13, 14], *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 – из почв г. Чапаевска (Россия) [15, 16], *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 – из почв г. Березники (Россия), депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (=ВКМ Ас-2623D) [17, 18]. Культивирование штаммов проводили в минеральной среде К1 [19] с внесением бифенила в качестве источника углерода (конечная концентрация 0.5 г/л). Оптимальную температуру и пределы сохранения жизнеспособности штаммов определяли при культивировании в диапазоне температур 4–60°C [13].

Ресурсы для моделирования структуры BphA1. Нуклеотидную последовательность α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH628 получили при анализе результатов полногеномного секвенирования и депонировали в международную базу данных GenBank под номерами MW070531 и MW070532, соответственно. Для штамма *R. ruber* P25 использована нуклеотидная последовательность гена *bphA1*, депонированная ранее в GenBank под номером KP985699.1 [20]. Первичную, вторичную и третичную структуру α -субъединицы БДО моделировали на основе нуклеотидной последовательности гена *bphA1* с применением известных моделей ферментов класса диоксигеназ с использованием программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net>), SwissDock (<https://www.swissdock.ch>), SwissModel (<https://www.swissmodel.expasy.org>), UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>).

Синтез ПХБ 12. Для исследования использовали 3,4-дихлорбифенил (ПХБ 12). Синтез осуществляли по реакции Гомберга–Бахмана–Хейя в присутствии *изо*-амилнитрита [21] из бензола и 3,4-дихлоранилина. Все реагенты квалификации х. ч. (ЗАО “НПО Экрос”, АО “Вектон”, Россия). Для применения в микробиологических экспериментах полученный 3,4-дихлорбифенил очищали от остальных компонентов реакционной смеси путем перегонки в вакууме.

Синтез производных ПХБ 12 (смесь Р). В колбу, снабженную магнитной мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, вносили 3.36 г (0.06 моль) КОН и 25 мл (25.55 г, 0.42 моль) 2-аминоэтанола. Содержимое колбы нагревали при интенсивном перемешивании до образования мелкодисперсной суспензии. Затем вносили

0.22 г (0.01 моль) ПХБ 12 и кипятили реакционную массу при перемешивании ($\sim 170^\circ\text{C}$) в течение 17 ч. По окончании массу охлаждали до комнатной температуры, вносили разбавленную соляную кислоту до pH 1–2 и экстрагировали толуолом (2×10 мл). Толуольный экстракт сушили CaCl_2 и анализировали методом ГХ-МС. Каждое взаимодействие проводили 3 раза. Для микробиологических исследований толуольный экстракт упаривали на воздухе, остаток высушивали под вакуумом (5 мм рт. ст., $t_{\text{комн}}$) до постоянной массы [22]. Получали смесь Р — смесь двух изомеров моногидроксимонохлорбифенилов (98.42%), остальное — 3- и 4-монохлорбифенилы с суммарным содержанием (1.68%). Все реагенты были квалификации х. ч.

Идентификация и анализ ПХБ 12 и компонентов смеси Р. Анализ и идентификацию осуществляли на газовом хромато-масс-спектрометре “Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XLEI/CI” (“Agilent Technologies”, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS (полидиметилсилоксан, 5 мас. % фенильных групп) длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки 0.25 мкм и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Температура колонки: начальная — 40°C (выдержка 3 мин), программирование со скоростью 10 град./мин до 290°C (выдержка 30 мин), температура испарителя — 250°C , температура источника — 230°C , квадруполя — 150°C , переходной камеры — 280°C , газ-носитель — гелий, 1.0 мл/мин. Сканирование в режиме электронной ионизации (70 эВ) по полному ионному току в диапазоне масс 20–1000 Да.

Биодеструкция ПХБ 12 и смеси Р. Для изучения биодegradации ПХБ 12 и смеси Р бактериальные культуры (ОП₆₀₀ = 1.5, 1 мл), предварительно выращенные в минеральной среде К1 с добавлением 1 г/л бифенила в качестве источника углерода до середины экспоненциальной фазы, были помещены в стеклянные флаконы (“Sigma-Aldrich”, Германия) объемом 4 мл, закрытые тефлоновыми крышками. В каждый флакон вносили 0.1 г/л ПХБ 12 или смеси Р и инкубировали на круговом шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин в течение 14 сут. Температура культивирования 10, 20, 30, 40 и 50°C . Образцы для анализа отбирали на 0, 1, 3, 7, 10 и 14 сут инкубации. Процесс деструкции останавливали замораживанием. Бактериальный рост контролировали в незамороженных образцах по изменению оптической плотности культуры при 600 нм на спектрофотометре UV-Visible BioSpecmini (“Shimadzu”, Япония).

Определение содержания ПХБ 12 и смеси Р при биодеструкции. Во флаконы, содержащие 1 мл бактериальной культуры и ПХБ 12 или смесь Р после биодеструкции, добавляли 0.1 мл 35%-ной соляной кислоты и 0.5 мл гексана. Для лучшего разделения органической и водной фаз флаконы

помещали в центрифугу Sigma 3-16P (“Sigma”, Германия) и центрифугировали содержимое флакона в течение 5 мин при скорости 9168 g. Далее проводили анализ органического слоя в условиях ГХ-ПИД.

Количественную оценку ПХБ и/или ПХБ-ОН проводили на газовом хроматографе “Shimadzu GC 2010” (“Shimadzu”, Япония) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 (длина 30 м, диаметр 0.25 мм), толщина пленки неподвижной фазы составляла 0.25 мкм. Начальная температура колонки составляла 40°C (3 мин) с последующим повышением температуры $10^\circ/\text{мин}$ до конечной температуры 280°C (изотерма 15 мин). Температура испарителя 250°C , детектора — 300°C .

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

Каждый образец был проанализирован не менее четырех раз на газовом хроматографе, среднеквадратическое отклонение составило не более 3%.

Анализ метаболитов. Метаболиты изучали в образцах, отобранных на 0, 1, 3, 7, 10 и 14 сут эксперимента по биодegradации. Содержимое каждого стеклянного флакона центрифугировали на миницентрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия) 10 мин при 13201 g. Для анализа использовали надосадочную жидкость. В качестве стандартов применяли бензойную кислоту (БК), моно- (3-, 4-) и ди- (3,4-) хлорбензойные кислоты (ХБК), 2-гидрокси-3-хлор- и 2-гидрокси-4-хлорбензойные кислоты (“Sigma-Aldrich”, Германия).

Присутствие метаболитов в среде культивирования регистрировали методом ВЭЖХ при использовании хроматографа “LC-20AD Prominace” (“Shimadzu”, Япония) с колонкой C-18 150×4.6 мм (“Sigma-Aldrich”, США) и УФ-детектором “SPD-20A” (“Shimadzu”, Япония) в системе ацетонитрил — 0.1%-ная H_3PO_4 (60 : 40 об./об.). Идентификацию продуктов метаболизма проводили методом сравнения времени удерживания на колонке образовавшихся и стандартных соединений [23].

Установлено, что БК регистрируется при длине волны $\lambda = 205$ нм с временем удерживания $\tau = 4.8$ мин, 3-ХБК, 4-ХБК и 3,4-диХБК — при длине волны $\lambda = 232$ нм в диапазоне времен удерживания 5–8 мин, а моно(хлоргидрокси)бензойные кислоты — при $\lambda = 205$ нм и $\tau = 10$ –15 мин.

Образование (хлор/гидрокси)-2-гидрокси-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновых кислот (ГОФДК) определяли на спектрофотометре

UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при λ_{\max} от 390 до 450 нм [23].

Анализ эффективности биодеструкции. Эффективность деструкции оценивали, определяя уровень деструкции субстрата (%), удельную скорость (сут⁻¹), а также кинетические параметры деструкции путем вычисления уравнения первого приближения зависимости концентрации ПХБ 12 и смеси Р от времени инкубации (3) с учетом коэффициента достоверности аппроксимации (R^2):

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

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

$$\mu = (\ln C_0 - \ln C_t) / \Delta t, \quad (2)$$

где C_0 – концентрация субстрата (ПХБ12 или смесь Р) в начальный момент времени, мг/л, C_t – концентрация субстрата в конечный момент времени, мг/л, Δt – период деструкции, сут;

$$y = k_1 x^2 + k_2 x + k_3, \quad (3)$$

где y – концентрация ПХБ12 и/или смеси Р, г/л; x – время деструкции; k_1 , k_2 и k_3 – коэффициенты, определяемые экспериментально.

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности. Анализ количественных показателей проводили с использованием пакетов программ MS Office и CAKE (<https://www.tessella.com/show-case/computer-assisted-kinetic-evaluation>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы. Для моделирования структуры α -субъединицы БДО штаммов-деструкторов ПХБ *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25 были использованы нуклеотидные последовательности генов *bphA1*_{КТ112-7} (GenBank MW070531), *bphA1*_{СН628} (GenBank MW070532) и *bphA1*_{P25} (GenBank КР985699.1). Филогенетический анализ генов *bphA1*_{КТ112-7}, *bphA1*_{СН628} и *bphA1*_{P25} показал, что они принадлежат различным семействам диоксигеназ (рис. 1). В результате дедуктивной трансляции и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что *VphA1*_{КТ112-7} на 99.64% идентична таковой фермента семейства бифенил-диоксигеназ (КФ 1.14.12.18) штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus aetherivorans* I24 (GenBank AAL61663.2) и находится в группе классических БДО. Дедуктивная аминокислотная последовательность *VphA1*_{СН628} на 100% сходна с первичной структурой α -субъединицы нафталиндиоксигеназы (КФ 1.14.12.12)

штамма-деструктора *Rhodococcus opacus* В4 (GenBank ВАН47212.1) и располагается в “ветви” нафталиновых диоксигеназ. Как было показано ранее, *VphA1*_{P25} показывает наибольший уровень сходства с ферментами группы фенил-пропионат диоксигеназ (КФ 1.14.12.–) [20].

Анализ вторичной структуры показал, что соотношение α -спиралей и β -тяжей в α -субъединицах БДО штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25 составило 1 : 0.89, 1 : 1.06 и 1 : 1.38 соответственно (табл. 1). Таким образом, у штаммов СН628 и P25 большая часть аминокислотной последовательности *VphA1* формирует β -тяжи.

В результате 3D-моделирования установлены третичные структуры *VphA1*_{КТ112-7}, *VphA1*_{СН628} и *VphA1*_{P25} (рис. 2). Анализ параметров показал, что наиболее достоверная модель (93–99%) α -субъединицы БДО получена для *VphA1* штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 (табл. 2). При этом наиболее близкой моделью третичной структуры *VphA1*_{КТ112-7} является таковая БДО штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 [24]. Для *VphA1*_{СН628} также удалось получить модель третичной структуры с высокими показателями достоверности (91–92%). Наиболее близкой является модель α -субъединицы нафталиндиоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (табл. 2) [25]. В то же время создание модели третичной структуры *VphA1*_{P25} было сопряжено с проблемой поиска наиболее близкой третичной структуры фермента семейства диоксигеназ. Анализ баз данных показал, что из описанных моделей максимальный уровень сходства выявляется при сравнении *VphA1*_{P25} с α -субъединицей толуол-2,3-диоксигеназы штамма *Pseudomonas putida* F1 (табл. 2) [26]. Уровень достоверности полученной третичной структуры *VphA1*_{P25} составил 35–77% при анализе различных параметров. Полученные результаты подтверждают уникальность строения α -субъединицы бифенил-2,3-диоксигеназы штамма *R. ruber* P25.

Анализ деструкции ПХБ 12 штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25. Для изучения особенностей деструкции хлорированных бифенилов штаммами *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25, БДО которых существенно различались, была исследована их активность по отношению к ПХБ 12, в молекуле которого атомы хлора находятся у 3 и 4 атомов углерода в одном ароматическом кольце. Синтез ПХБ 12 был осуществлен по стандартной методике путем конденсации 3,4-дихлоранилина с бензолом в присутствии *изо*-амилнитрита (рис. 3) [21]. Выход целевого продукта ПХБ 12 достигал 10%. Для дальнейших микробиологических исследований ПХБ 12 был очищен от компонентов реакционной смеси до концентрации 98.03%.

Анализ данных, полученных по биотрансформации ПХБ 12, показал, что штаммы КТ112-7 и

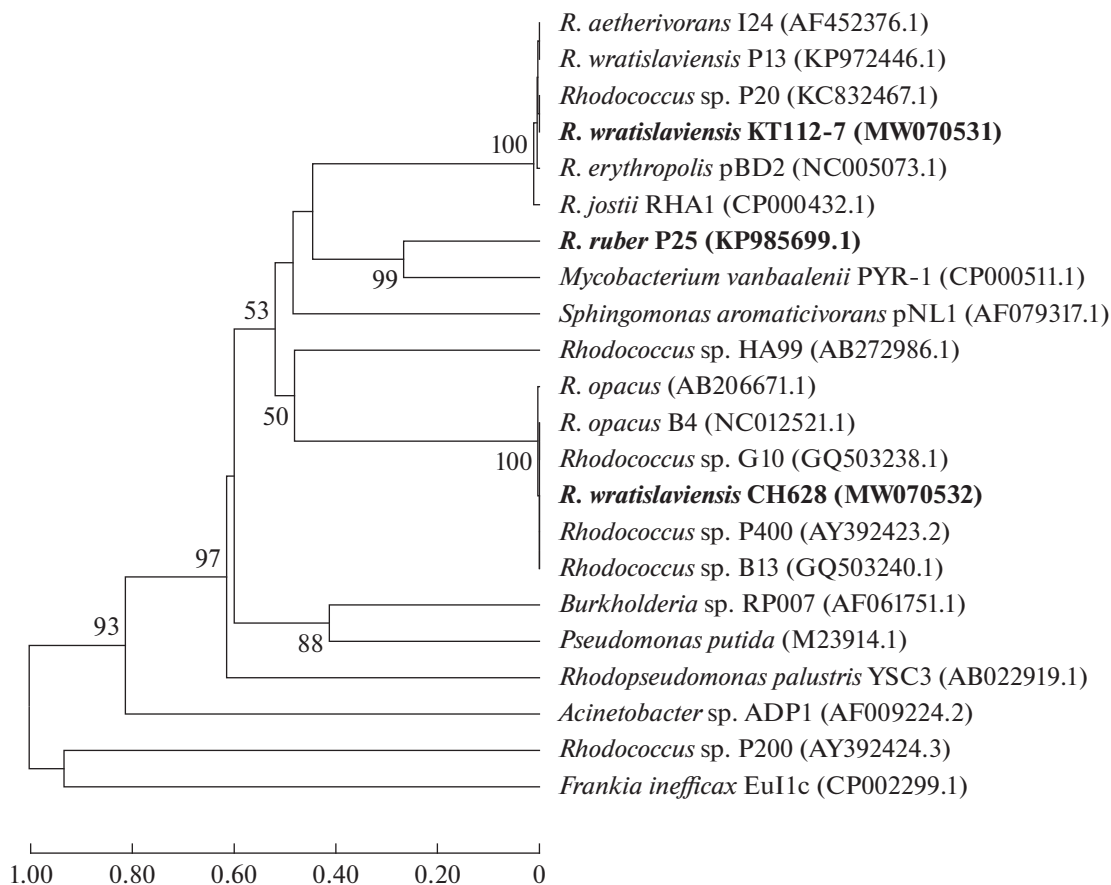


Рис. 1. Дерево сходства генов α -субъединиц гидрокселирующих диоксигеназ ароматических соединений, построенное с использованием метода UPGMA. Достоверность ветвления оценивали на основании “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев. Дерево построено на основании выравнивания последовательностей исследуемых генов и ранее опубликованных в GenBank. На дереве представлены названия штаммов и номера нуклеотидных последовательностей в GenBank (исследуемые в настоящей работе выделены полужирным шрифтом).

CH628 осуществляли его полное разложение за 7 сут, а штамм P25 – за 10 сут культивирования при 30°C. При этом основным метаболитом является 3,4-диХБК (рис. 4). Известно, что термофильный штамм *Bacillus* sp. JF8 разлагал ПХБ 12 также через стадию образования 3,4-диХБК [12]. Помимо хлорбензойной кислоты в среде культивирования всех исследуемых штаммов идентифицирована ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 438 нм (ОП = 0.120–0.264 о.е.), что свидетельствовало о расположении атомов хлора в фенольной части молекулы, при этом один из заместителей находится у 9 углеродного атома [27]. Известно, что низкохлорированные конгенеры ПХБ (количество атомов хлора ≤ 3) в присутствии аэробных микроорганизмов преимущественно подвергаются окислительной деградации под действием ферментов класса диоксигеназ с образованием катехолподобных соединений [5]. Очевидно, что для БДО исследуемых штаммов наиболее удобным структурным фрагментом молекулы ПХБ 12 для атаки двух атомов кислорода из акти-

вированной под действием диоксигеназы молекулы кислорода является стерически свободный, незамещенный ароматический цикл (рис. 5). Окисление ПХБ 12 протекало через стадию дигидроксилирования с образованием 3,4-дихлор-2',3'-дигидроксибифенила. Далее следует стандартный для аэробных бактерий *meta*-распад нехлорированного цикла, и образуется замещенная пентадиеновая кислота (**9,10-диCl-ГОФДК**). В результате последующего ферментативного расщепления 9,10-диCl-ГОФДК образуются пентадиеновая и 3,4-дихлорбензойная кислоты (рис. 5) [28].

Возможный альтернативный вариант – взаимодействие атомов кислорода под действием БДО по хлорированному циклу – является менее выгодным из-за стерических препятствий. В результате окисления хлорированного кольца ПХБ 12 образовавшиеся аналоги дихлор-дигидроксибифенила будут характеризоваться расположением всех заместителей в одном ароматическом кольце, а при *meta*-распаде – все заместители будут располагаться

Таблица 1. Вторичная структура α -субъединицы бифенил диоксигеназы

α -спирали	№ аминокислотного остатка в первичной структуре			β -тяги	№ аминокислотного остатка в первичной структуре		
	KT112-7	CH628	P25		KT112-7	CH628	P25
α 1	3–9	4–16	61–64	β 1	41–45	47–51	5–9
α 2	19–22	25–27	100–115	β 2	54–60	60–66	15–19
α 3	25–36	31–40	137–141	β 3	63–69	69–75	81–85
α 4	46–48	52–54	146–150	β 4	75–79	81–85	88–92
α 5	121–124	127–140	153–159	β 5	94–96	100–102	129–133
α 6	130–132	166–180	197–201	β 6	139–143	105–107	177–179
α 7	158–173	203–212	205–210	β 7	146–150	114–116	186–190
α 8	195–204	215–220	215–220	β 8	180–182	147–151	231–234
α 9	215–221	222–227		β 9	187–192	154–158	238–241
α 10	228–230	236–238		β 10	237–241	187–189	246–252
α 11	257–272	246–248		β 11	248–252	185–199	258–263
α 12	274–284	265–267		β 12	297–300	240–244	
α 13	287–291	270–279		β 13	304–307	250–254	
α 14	338–351	282–288		β 14	312–318	293–298	
α 15	359–374	348–359		β 15	324–333	302–309	
α 16	377–379	368–375		β 16	402–405	318–330	
α 17	410–423			β 17		333–343	
α 18	428–434						

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

Параметр	<i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	<i>R. wratislaviensis</i> CH628	<i>R. ruber</i> P25
Площадь поверхности субъединицы, Å^2	17.84×10^3	17.39×10^3	15.20×10^3
Объем субъединицы, Å^3	55.63×10^3	48.20×10^3	32.40×10^3
Наиболее близкий по третичной структуре фермент	BphA1, бифенил 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.18)	NDO-R_A, нафталин 1,2-диоксигеназа (КФ 1.14.12.12)	TDO-F, толуол 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.11)
Бактериальный штамм с близким ферментом	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 [25]	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038 [26]	<i>Pseudomonas putida</i> F1 [27]
Уровень сходства, %	98.65	93.72	44.79
Точность третичной структуры	0.93	0.91	0.77
Оценка качества третичной структуры	–0.06	–0.35	–2.63
Оценка качества четвертичной структуры	0.76	0.82	0.75

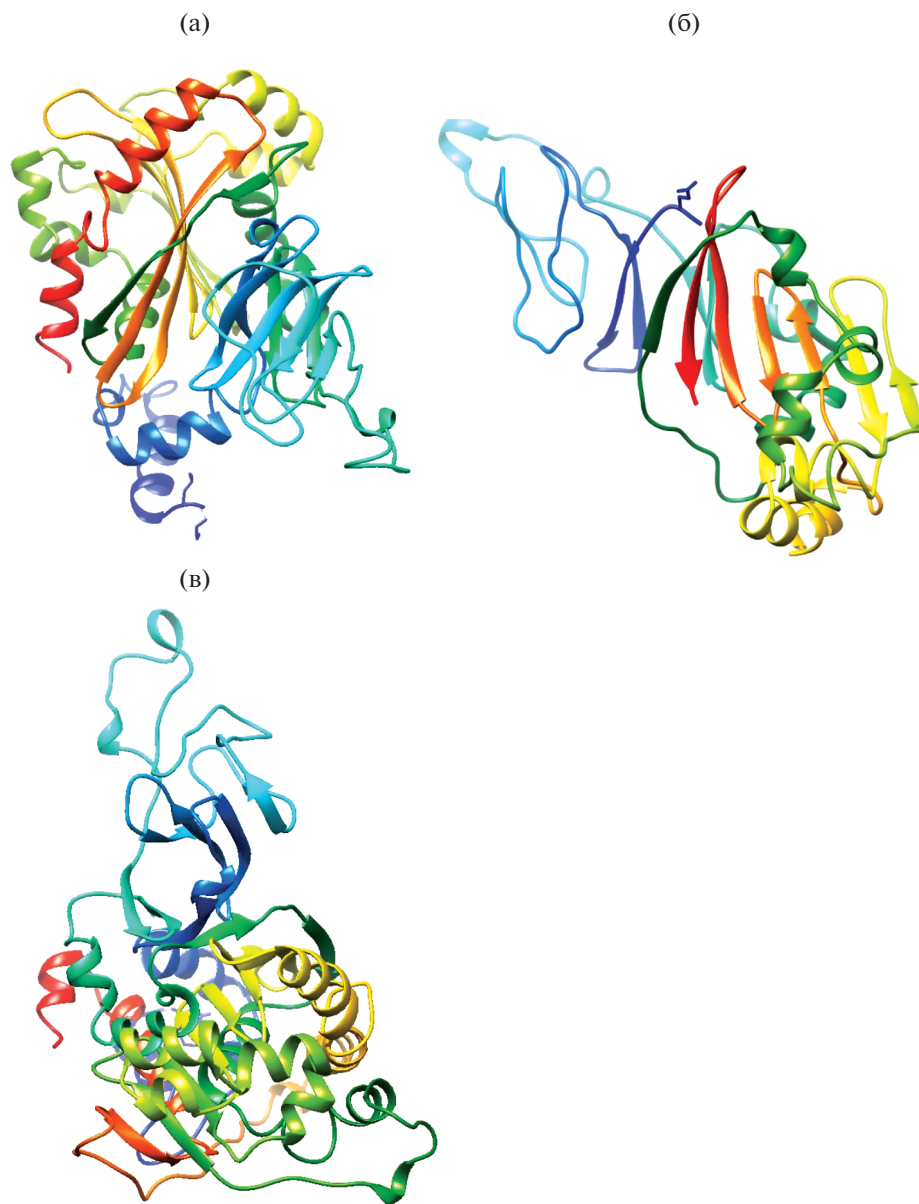


Рис. 2. Третичная структура α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* CH628 (а), *R. ruber* P25 (б) и *R. wratislaviensis* KT112-7 (в). Модели построены на основании анализа дедуктивных аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов, имеющихся в базах данных с использованием алгоритма программы UCSF CHIMERA. При окрашивании моделей использован режим “rainbow”, при котором окрашивание модели происходит от N-конца цепи до C-конца от синего через радужный спектр до красного с выделением цветом каждого элемента вторичной структуры.

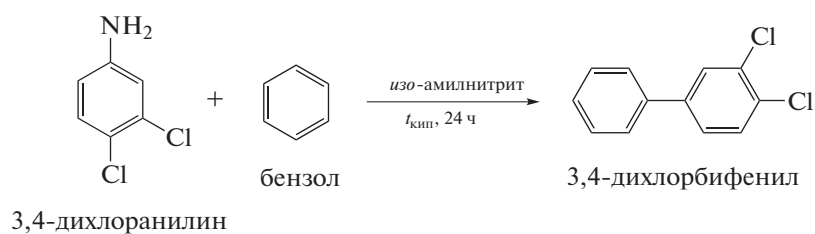


Рис. 3. Схема синтеза ПХБ 12 (3,4-дихлорбифенила).

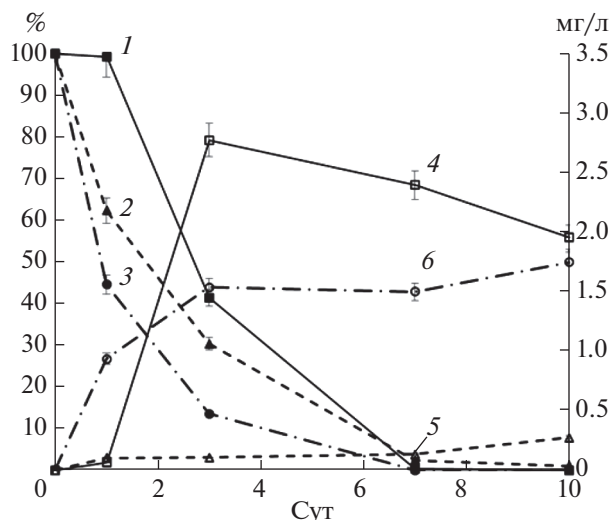


Рис. 4. Деструкция 3,4-дихлорбифенила (%) и образование основного метаболита – 3,4-дихлорбензойной кислоты (мг/л) при 30°C: 1, 4 – *R. wratislaviensis* KT112-7, 2, 5 – *R. ruber* P25, 3, 6 – *R. wratislaviensis* CH628.

в диеноатной части ГОФДК. Последующее гидролитическое расщепление такой молекулы приведет к образованию дихлорпентадиеновой кислоты и БК. Однако в настоящем исследовании БК не была выявлена среди метаболитов, образующихся при разложении ПХБ 12 штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25.

Таким образом, накопление в среде 3,4-диХБК (рис. 4), но не БК, подтверждает высказанное предположение, что БДО исследуемых штаммов осуществляют окисление незамещенного кольца ПХБ 12.

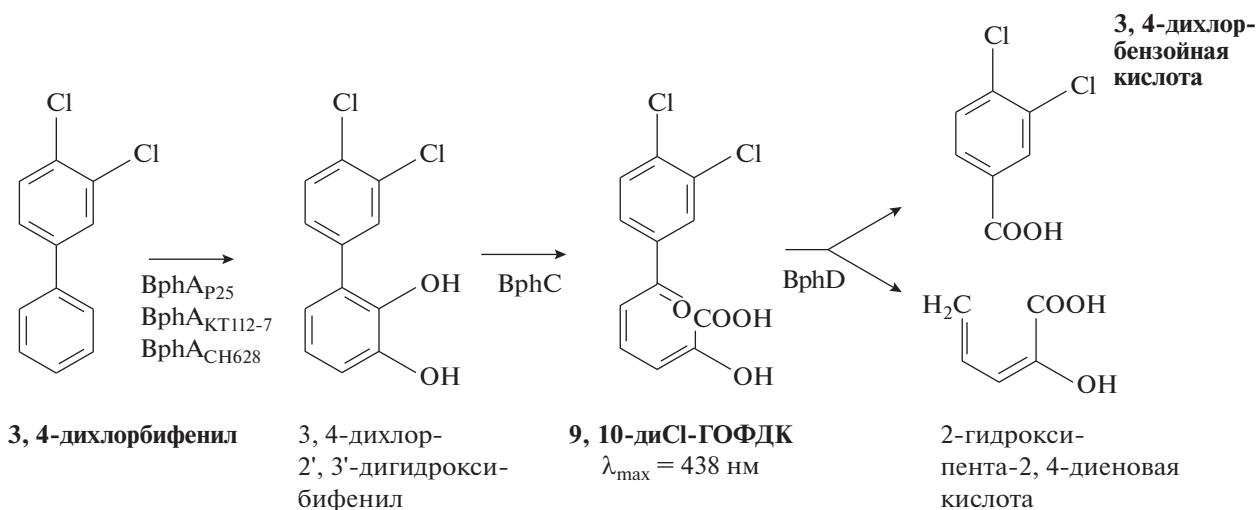


Рис. 5. Схема метаболического пути 3,4-дихлорбифенила у исследуемых штаммов рода *Rhodococcus*.

Биодеструкция смеси Р, полученной при гидроксигировании ПХБ 12. Синтез ПХБ-ОН на основе ПХБ 12 проводили путем взаимодействия конгенера ПХБ со щелочью в среде 2-аминоэтанола (рис. 6) по методике, описанной ранее [22].

По результатам ГХ-МС анализа установлено, что в условиях реакции протекало образование смеси продуктов (смесь Р). В составе смеси Р преобладали целевые продукты – моногидрокси-моноклорированные бифенилы. Наиболее вероятно, что ПХБ-ОН были представлены 3-гидрокси-4-хлорбифенилом и 4-гидрокси-3-хлорбифенилом при условии *inco*-атаки гидроксигруппы по связи $C_{Ar}-Cl$ конгенера ПХБ 12. На долю целевых продуктов (ПХБ-ОН) приходилось 98.42% от всех компонентов смеси Р. Характерной особенностью результатов химического синтеза было образование в условиях реакции более низкохлорированных конгенов ПХБ наряду с формированием изомерных ПХБ-ОН. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в составе смеси Р присутствовали 3-хлорбифенил и 4-хлорбифенил (1.68% от всех компонентов смеси). Как было показано, образование более низкохлорированных ПХБ связано с протеканием *in situ* конкурирующей реакции гидродехлорирования, как результата межмолекулярных взаимодействий всех участвующих реагентов [22].

Время трансформации смеси Р штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 при условиях, аналогичных биодеструкции ПХБ 12, увеличивалось (рис. 7). Штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH628 осуществляли 100%-ное разложение смеси за 10 сут, тогда как уровень деструкции смеси Р штаммом *R. ruber* P25 за аналогичный период составлял 95.4%. Снижение биодegradативной ак-

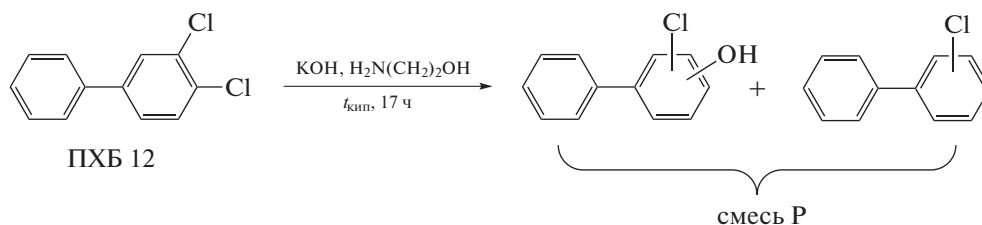


Рис. 6. Схема синтеза смеси Р на основе конгенера ПХБ 12.

тивности может быть обусловлено токсическим эффектом, который оказывают на бактериальные клетки гидроксилированные монохлорбифенилы. Согласно данным [29] концентрация 4-гидрокси-3-хлорбифенила, при которой наблюдалось 50%-ное падение бактериальной люминесценции составляло 1.15 мг/л, а для 3-гидрокси-4-хлорбифенила данный показатель составлял 6.34 мг/л, что в 7–39 раз меньше, чем аналогичный показатель для негидроксилированных хлорбифенилов. Уровень цитотоксичности 100 мг/л 4-гидрокси-3-хлорбифенила, исследованный на специально подготовленных бактериальных клетках, составлял $33.1 \pm 5.5\%$ [30].

Следует отметить, что удельная скорость деструкции смеси Р, по сравнению с аналогичным показателем для штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 ПХБ12, снизилась в 1.2–1.4 раза (табл. 3, 4). Так как основную часть смеси Р составляют гидроксихлорбифенилы, то снижение скорости деструкции исследуемой смеси по сравнению с аналогичным показателем при разложении ПХБ 12, вероятно, обусловлено токсичностью компонентов смеси.

Методом ВЭЖХ при биодеструкции смеси Р в культуральной среде всех трех штаммов были зафиксированы 3-ХБК, 4-ХБК и моногидрокси-монохлорбензойные кислоты, но не обнаруживалась БК (рис. 7). Известно, что основным метаболитом при разложении 4-гидрокси-3-хлорбифенила штаммом *Sphingomonas* sp. N-9 является 4-гидрокси-3-хлорбензойная кислота [30]. Спектрофотометрические исследования показали, что при разложении смеси Р отмечалось присутствие нескольких ГОФДК с максимальной длиной волны поглощения при 436 и 418 нм ($ОП_{436} = 0.112–0.134$ о.е., $ОП_{418} = 0.254–0.351$ о.е. соответственно). Известно, что $\lambda_{\text{макс}} = 436$ нм характерна для 9С1-ГОФДК, образующейся при окислении и последующем расщеплении незамещенного цикла молекулы 3-хлорбифенила [27]. Полученные данные позволяют предположить, что БДО штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 осуществляли окисление компонентов смеси Р (т.е. монохлорбифенилов и моногидрокси-монохлорбифенилов) аналогично ПХБ 12 по незамещенному циклу молекулы (рис. 5, 6).

Таким образом, различия в строении $VprA1_{\text{КТ112-7}}$, $VprA1_{\text{СН628}}$ и $VprA1_{\text{Р25}}$ не оказывали влияния на механизм разложения моно- и дихлорбифенилов, а также моногидрокси-монохлорбифенилов, содержащих заместители в одном кольце молекулы.

Биодеструкция ПХБ 12 и смеси Р при различных температурах. В естественных условиях бактериальные штаммы испытывают существенные перепады температуры окружающей среды. Эффективность биодеструкции зависит от активности штаммов по отношению к ПХБ и их производным в зависимости от температуры. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 являются мезофилами, растут в диапазоне температур 7–45°C, с оптимумом для роста при 20–37°C [13]. Деструктивную активность по отношению к ПХБ 12 и смеси Р штаммы проявляли при 10–50°C (табл. 3, 4). Максимальные показатели деструкции отмечены при 30°C. Отклонение температуры в меньшую или большую стороны снижало способности у штамма *R. ruber* Р25 к деструкции как ПХБ 12, так

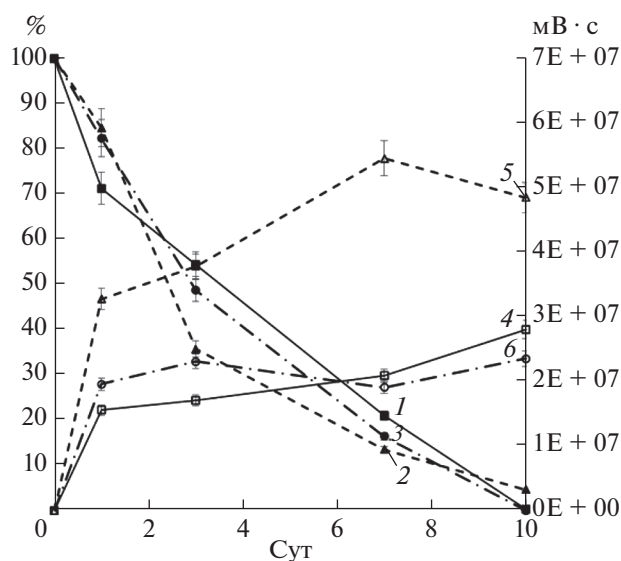


Рис. 7. Деструкция (%) смеси Р и образование замещенных бензойных кислот (мВ · с) при 30°C: 1, 4 – *R. wratislaviensis* КТ112-7, 2, 5 – *R. ruber* Р25, 3, 6 – *R. wratislaviensis* СН628.

Таблица 3. Кинетические параметры разложения ПХБ 12

Штамм	Температура, °С	Деструкция, %	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	Уравнение деструкции	R ²
КТ112-7	10	98.2	0.444	$y = 1.3524x^2 - 21.996x + 89.36$	0.948
	20	99.6	0.543	$y = 2.411x^2 - 33.301x + 104.02$	0.897
	30	100	0.866	$y = 1.4384x^2 - 25.398x + 109.11$	0.969
	40	65.8	0.107	$y = -0.1321x^2 - 4.9961x + 98.593$	0.992
	50	45.7	0.061	$y = 0.0593x^2 - 4.5872x + 97.084$	0.883
P25	10	27.6	0.023	$y = -0.2447x^2 + 0.2605x + 95.723$	0.864
	20	60.2	0.088	$y = -0.1915x^2 - 3.5901x + 102.12$	0.993
	30	98.9	0.536	$y = 1.6013x^2 - 24.992x + 93.244$	0.979
	40	50.7	0.071	$y = -0.0491x^2 - 5.0386x + 104.97$	0.935
	50	25.4	0.029	$y = 0.0913x^2 - 3.3287x + 99.791$	0.955
СН628	10	83.3	0.172	$y = -0.7691x^2 + 0.2328x + 95.089$	0.952
	20	99.8	0.597	$y = 1.387x^2 - 19.13x + 75.651$	0.615
	30	100	0.765	$y = 2.0062x^2 - 28.101x + 85.845$	0.908
	40	93.2	0.269	$y = -0.5051x^2 - 3.2536x + 93.078$	0.964
	50	75.9	0.143	$y = -0.3675x^2 - 4.2201x + 101.66$	0.994

Таблица 4. Кинетические параметры разложения смеси Р, полученной при гидроксировании ПХБ 12

Штамм	Температура, °С	Деструкция, %	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	Уравнение деструкции	R ²
КТ112-7	10	59.4	0.091	$y = 0.8622x^2 - 14.116x + 97.83$	0.969
	20	41.4	0.053	$y = 2.411x^2 - 33.901x + 104.02$	0.897
	30	99.6	0.552	$y = 0.5647x^2 - 14.823x + 93.715$	0.981
	40	61.2	0.095	$y = -0.2598x^2 - 3.5541x + 101.73$	0.968
	50	52.1	0.074	$y = 0.039x^2 - 5.8553x + 100.82$	0.976
P25	10	47.8	0.065	$y = -0.9218x^2 + 5.104x + 96.347$	0.922
	20	52.2	0.074	$y = -0.4391x^2 - 1.5687x + 99.368$	0.999
	30	95.4	0.308	$y = 1.3376x^2 - 22.74x + 100.68$	0.979
	40	35.3	0.044	$y = 0.3753x^2 - 7.1846x + 99.995$	0.976
	50	31.4	0.038	$y = 0.5504x^2 - 8.2418x + 98.04$	0.915
СН628	10	8.2	0.009	$y = 1.5772x^2 - 20.967x + 76.694$	0.651
	20	84.3	0.185	$y = 1.6625x^2 - 26.437x + 99.956$	0.993
	30	100	0.691	$y = 0.833x^2 - 18.107x + 99.023$	0.996
	40	63.4	0.101	$y = 0.2574x^2 - 8.0068x + 94.368$	0.925
	50	45.8	0.061	$y = -0.5727x^2 - 0.404x + 115.04$	0.732

и смеси Р. В то же время, снижение температуры до 10°C не приводило к потере активности штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в отношении ПХБ 12 (табл. 3), тогда как уровень деструкции смеси Р снижался в 1.7–2.4 раза (табл. 4). Повышение температуры культивирования штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 ингибировало процесс разложения как ПХБ 12, так и смеси Р: снижение показателей в 1.5–1.6 раза при 40°C, в 1.9–2.2 раза при 50°C. Штамм *R. wratislaviensis* СН628 эффективно разлагал ПХБ 12 при 20–40°C (табл. 3). Если субстра-

том являлась смесь Р, отклонение температуры культивирования от 30°C как в большую, так и в меньшую стороны приводило к существенному снижению биодegradативной активности штамма СН628 (табл. 4). В литературе присутствует ограниченное количество сведений о разложении ПХБ и ПХБ-ОН при высоких и низких температурах. Известно, что мезофильный штамм-деструктор ПХБ *Burkholderia cepacia* LB400 наиболее активно разлагал смесь ПХБ Арохлор 1242 при 37°C, снижение температуры до 7°C приводило к

ингибированию процесса деструкции в 3.1 раза, а повышение температуры до 50°C – к снижению эффективности деструкции в 1.1 раза [9]. Для психрофильных штаммов *Pseudomonas* sp. Сам-1 и *Hydrogenophaga* sp. IA3-A снижение температуры культивирования с 30–37°C до 5–7°C также вызывало снижение эффективности разложения смесей ПХБ (Арохлор 1221 и Арохлор 1242) в целом, и ПХБ 12, входящего в состав Арохлор 1221, в частности [8, 9]. Микрофлора арктических почв более эффективно разлагает ПХБ 12 в составе Арохлора 1221 при 30°C (100% за 6 недель), чем при 7°C (0–50% за 8 недель) [11]. Аналогичная закономерность описана для психротолерантных антарктических штаммов *Arthrobacter* sp. 74, *Pseudalteromonas* sp. 19 и *Psychrobacter* sp. 15 [10].

Таким образом в результате проведенных исследований установлено, что α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25 имеют существенные различия в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Впервые для $\text{VphA1}_{\text{КТ112-7}}$, $\text{VphA1}_{\text{СН628}}$ и $\text{VphA1}_{\text{P25}}$ созданы модели третичной структуры белковой молекулы, подтвердившие принадлежность данных ферментов к различным подсемействам диоксигеназ и указавшим на уникальность строения $\text{VphA1}_{\text{P25}}$. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25 эффективно разлагают ПХБ 12 и смесь монохлорбифенилов и моногидрокси-монохлорбифенилов (смесь Р), полученную при химической модификации ПХБ 12. Бифенил диоксигеназы всех трех штаммов осуществляют окисление незамещенного цикла в молекулах ПХБ 12 и компонентах смеси Р. Впервые показано, что штаммы рода *Rhodococcus* осуществляют биодеструкцию хлорированных и гидроксильированных бифенилов в диапазоне температур 10–50°C. При этом у штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 наиболее эффективно процесс деструкции ПХБ 12 протекал при 10–30°C, а смеси Р – при 30°C. Штамм *R. wratislaviensis* СН628 разлагал ПХБ 12 на 93–100% при 20–40°C, тогда как уровень деструкции смеси Р в том же температурном диапазоне составлял 63–100%. Отклонение температуры культивирования от 30°C приводит к снижению, но не к потере активности штамма *R. ruber* P25 к исследуемым субстратам. Полученные данные позволили предположить, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* P25 могут быть перспективными для использования в технологиях биоремедиации территорий, загрязненных ПХБ, с различными климатическими условиями.

В работе использовали оборудование молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского

университета, Центра коллективного пользования “Спектроскопия и анализ органических соединений” (ЦКП “САОС”), а также ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

Работы по химическому синтезу ПХБ 12 и его производных, а также исследования биодеструкции данных соединений штаммами рода *Rhodococcus* при различных температурах выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-29-05016мк).

Моделирование структуры α -субъединицы БДО выполнено в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящем исследовании не использованы в качестве объектов люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Логинов О.Н. // Прикл. биохимия микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 338–349.
2. Занавескин Л.Н., Аверьянов В.А. // Успехи химии. 1998. Т. 67. № 8. С. 788–800.
3. Sinkkonen S., Paasivirta J. // Chemosphere. 2000. V. 40. P. 943–949.
4. Tehrani R., Van Aken B. // Environ. Sci. Poll. Res. 2014. V. 21. P. 6334–6345. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1742-6>
5. Furukawa K., Fuijehara H.J. // Biosci. Bioeng. 2008. V. 105. P. 433–449. <https://doi.org/10.1016/j.jbb.105.433>
6. Agulló L., Pieper D.H., Seeger M. // In: Rojo F. (eds) Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham, 2019. P. 595–622. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6_30
7. Bajaj S., Singh D.K. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2015. V. 100. P. 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.023>
8. Lambo A.J., Patel T.R. // Curr. Microbiol. 2006. V. 53. P. 48–52. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0194-8>
9. Master E.R., Mohn W.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 12. P. 4823–4829.
10. Michaud L., Di Marco G., Bruni V., Lo Giudice A. // Marine Pollut. Bull. 2007. V. 54. P. 1754–1761. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007/07/011>
11. Mohn W.W., Westerberg K., Cullen W.R., Reimer K.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 9. P. 3378–3384.

12. Shimura M., Mukerjee-Dhar G., Kimbara K., Nagato H., Kiyohara H., Hatta T. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 178. P. 89–93.
13. Plotnikova E.G., Rybkina D.O., Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A. // Russ. J. Ecol. 2006. V. 37. P. 233–240.
<https://doi.org/10.1134/S1067413606040035>
14. Plotnikova E.G., Egorova D.O., Shumkova E.S., Solyanikova I.P., Golovleva L.A. // Microbiology (Mikrobiologiya). 2012. V. 81. P. 143–153.
<https://doi.org/10.1134/S0026261712020117>
15. Egorova D.O., Buzmakov S.A., Nazarova E.A., Andreev D.N., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Water Air Soil Pollut. 2017. V. 228. P. 183–199.
<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3344-2>
16. Egorova D.O., Farafonova V.V., Shestakova E.A., Andreev D.N., Maksimov A.S., Vasyanin A.N., Buzmakov C.A., Plotnikova E.G. // Eurasian. Soil. Sci. 2017. V. 50. P. 1217–1224.
<https://doi.org/10.1134/S1064229317100015>
17. Egorova D.O., Korsakova E.S., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. P. 244–255.
<https://doi.org/10.1134/S0003683813030071>
18. Egorova D.O., Pervova M.G., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. P. 252–261.
<https://doi.org/10.1134/S000368381803002X>
19. Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н. // Микробиология. 1981. Т. 50. № 2. С. 423–428.
20. Шумкова Е.С., Егорова Д.О., Боронникова С.В., Плотникова Е.Г. // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 4. С. 638–648.
21. Mullin M.D., Pochini C.M., McGrindle M.R., Romkes M., Safe S.H., Safe L.M. // Environ. Sci. Technol. 1984. V. 18. P. 468–476.
22. Горбунова Т.И., Первова М.Г., Салютин В.И., Чунахин О.Н. // Журнал органической химии. 2019. Т. 55. № 7. С. 1089–1092.
<https://doi.org/10.1134/S0514749219070127>
23. Maltseva O.V., Tsoi T.V., Quensen III J.F., Fukuda M., Tiedje J.M. // Biodegradation. 1999. V. 10. P. 363–371.
24. Furusawa Y., Nagarajan V., Tanokura M., Masai E., Fukuda M., Senda T. // J. Mol. Biol. 2004. V. 342. P. 1041–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.062>
25. Gakhar L., Malik Z.A., Allen Ch.C.R., Liqscob D.A., Larkin M.J., Ramaswamy S. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 21. P. 7222–7231.
<https://doi.org/10.1128/JB/187.21.7222-7231.2005>
26. Friemann R., Lee K., Brown E.N., Gibson D.T., Eklund H., Ramaswamy S. // Acta Crystallographica sect D. 2009. V. 65. P. 24–33.
<https://doi.org/10.1107/s0907444908036524>
27. Fortin P.D., Lo A. T.-F., Haro M.-A., Kaschabek S., Reineke W., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 2. P. 415–421.
28. Passatore L., Rossetti S., Juwarkar A.A., Massacci A. // J. Hazard. Mater. 2014. V. 278. P. 189–202.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
29. Bhalla R., Tehrani R., Van Aken B. // Microtox. Ecotoxicol. 2016. V. 25. P. 1438–1444.
<https://doi.org/10.1007/s10646-016-1693-z>
30. Mizukami-Murata S., Sakakibara F., Fujita K., Fukuda M., Kuramata M., Takagi K. // Chemosphere. 2016. V. 165. P. 173–182.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.127>

Modeling of the Biphenyl Dioxygenase α -Subunit Structure of *Rhodococcus* Strains and Features of the Destruction of Chlorinated and Hydroxylated Biphenyles at Different Temperatures

D. O. Egorova^{a,*}, T. I. Gorbunova^b, T. D. Kir'yanova^a, M. G. Pervova^b, and E. G. Plotnikova^a

^aInstitute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^bPostovskii Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620108 Russia

*e-mail: daryao@rambler.ru

Based on the modeling of the protein structure of the α -subunit of biphenyl 2,3-dioxygenase (BphA1) (EC 1.14.12.18), the key enzyme for the destruction of biphenyl and polychlorinated biphenyls (PCBs), it was found that BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (= VKM Ac-2623D) had the highest level of similarity with classical biphenyl dioxygenases (BDOs) of the PCBs-degrader strains of the genus *Rhodococcus*, the structure BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 – with naphthalene dioxygenase of strains of the genus *Rhodococcus*, and the structure of BphA1 *Rhodococcus ruber* P25 (= IEGM 896) was unique, since no protein molecules with a high level of similarity were identified. It was shown that all the studied strains, despite the differences in the structure of BphA1, carried out dioxygenation of the unsubstituted ring in the molecules of 3,4-dichlorobiphenyl (PCB 12) and monochlorinated and monohydroxy-monochlorinated biphenyls (mixture P). The level of destruction of PCB 12 and mixture P was 95.4–100% at 30°C for 10 days at an initial concentration of 0.1 g/L. It was found that a change in temperature (10–50°C) had the greatest effect on the biodegradative activity of the *R. ruber* P25 strain (a decrease in 3.1–3.9 times). Strains *R. wratislaviensis* CH628 and *R. wratislaviensis* KT112-7 efficiently degraded PCB 12 at temperatures of 20–40°C and 10–30°C, respectively (destruction level 93.2–100%).

Keywords: *Rhodococcus*, biphenyl dioxygenase, 3,4-dichlorobiphenyl, hydroxybiphenyl, temperature, destruction