

УДК 579.87:579.222.2:579.222.4

РАЗЛОЖЕНИЕ СМЕСИ (ТРИ-ГЕКСА)ХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ШТАММАМИ РОДА *Rhodococcus*

© 2011 г. Д. О. Егорова, В. А. Демаков, Е. Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 7.04.2011 г.

Исследовано разложение полихлорированных бифенилов (ПХБ) штаммами-деструкторами *Rhodococcus ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a. Показано, что эти штаммы разлагают 78–95% смеси ПХБ, содержащей в своем составе (три-гекса)хлорированные бифенилы. Родококки осуществляют деструкцию всех присутствующих в смеси три-, тетра-, пента- и гексахлорбифенилов без накопления токсичных хлорированных метаболитов. Исследуемые бактерии способны разлагать наиболее устойчивые к окислению ПХБ: 2,5,2',5'-ХБ, 3,4,3',4'-ХБ и 2,4,5,2',4',5'-ХБ. *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a – перспективные бактерии-деструкторы ПХБ, метаболический потенциал которых может быть использован в биотехнологиях очистки окружающей среды от высокотоксичных поллютантов.

Одной из наиболее актуальных проблем современности является загрязнение окружающей среды токсичными, устойчивыми соединениями, образующимися в результате промышленной деятельности человека. В 2001 г. международным сообществом принята Стокгольмская конвенция, где определен состав стойких органических загрязнителей (СОЗ), особо опасных для человека, запрещенных к производству и использованию [1].

Согласно конвенции, полихлорированные бифенилы (ПХБ) включены в состав СОЗ. По химической структуре ПХБ представляют два С–С-связанных ароматических кольца, в которых присутствуют в качестве заместителей от 1 до 10 атомов хлора. Коммерческие смеси полихлорбифенилов включают в свой состав 40–60 гомологов и изомеров ПХБ из 209 возможных. Уровень содержания данных веществ в окружающей среде очень высок [2]. Несмотря на прекращение их промышленного производства, ПХБ продолжают поступать в окружающую среду при сгорании промышленных отходов, нарушении целостности электрооборудования, вывозе и размещении на складах, свалках и полях аэрации. Липофильность ПХБ способствует их биоаккумуляции в тканях животных и человека, что ведет к развитию ряда тяжелых заболеваний, а химическая инертность предопределяет устойчивость к воздействию абиотических факторов [3].

К настоящему времени известно, что одним из наиболее перспективных способов снижения содержания ПХБ в окружающей среде является их переработка с использованием метаболического потенциала природной микрофлоры. Способность к трансформации отдельных хлорбифенилов описана для широкого круга природных бактерий [2, 4].

Установлено, что бактерии трансформируют ПХБ как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Наиболее опасные для животных и человека высокохлорированные бифенилы подвергаются восстановительному дегалогенированию (анаэробные условия), в результате чего степень хлорирования молекулы понижается, но полного разложения не происходит. Наибольший интерес вызывает процесс аэробного разложения, так как только в этом случае бактериями осуществляется полная минерализация ПХБ [4, 5]. Однако большинство из исследованных аэробных бактерий-деструкторов высокоактивны по отношению к моно- и дихлорбифенилам и лишь единичные штаммы проявляют деградирующую активность к средне- и высокохлорированным бифенилам. Скорость биодеструкции ПХБ также зависит от способности микроорганизмов разлагать промежуточные продукты трансформации хлорбифенилов. Известно лишь несколько природных и генетически модифицированных штаммов аэробных бактерий, осуществляющих полную минерализацию моно- и дихлорбифенилов [2, 5–7]. В остальных случаях в среде в процессе микробиологического разложения ПХБ накапливаются токсичные, устойчивые к воздействию химических и физических факторов продукты разложения хлорбифенилов.

Известно, что бактерии рода *Rhodococcus* проявляют деградирующую активность к широкому кругу ароматических соединений природного и антропогенного происхождения [8]. Среди организмов этого рода описано несколько штаммов-деструкторов ПХБ [4, 5, 7, 9–11]. Наиболее изученными из них являются *Rhodococcus jostii* RHA1 и *R. globerulus* P6, которые осуществляют разложение полихлорбифенилов как индивидуально, так и в составе смесей [12–

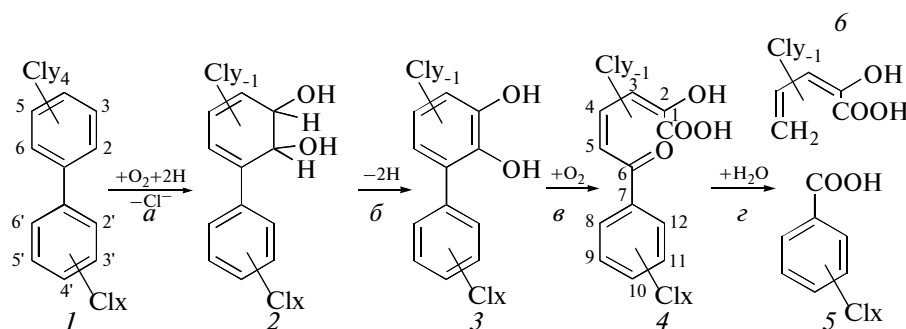


Рис. 1. Схема микробной деструкции полихлорбифенилов: 1 – полихлорбифенил (ПХБ); 2 – (хлор)бифенилдигидродиол; 3 – (хлор)дигидроксибифенил (ДГБ); 4 – (хлор)2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота (ГОФДК); 5 – хлорбензойная кислота (ХБК); 6 – (хлор)2-гидрокси-пента-2,4-диеновая кислота. Ферменты, катализирующие деструкцию ПХБ: *a* – бифенил 2,3-диоксигеназа (БДО); *b* – бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа (Б2,3Д); *в* – бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназа (2,3ДГБ ДО); *г* – ГОФДК гидролаза [5, 15, 16].

14]. Данные родококки активны по отношению к низкохлорированным бифенилам, осуществляя трансформацию этих соединений по пути окислительного расщепления с образованием конечного продукта разложения – хлорбензойной кислоты (ХБК) (рис. 1) [5, 15, 16].

Цель работы – изучение деструкции экспериментальной смеси, содержащей хлорбифенилы со средней степенью хлорирования (от трех до шести заместителей в молекуле бифенила), штаммами рода *Rhodococcus*, выделенными нами из техногенно-загрязненных почв.

МЕТОДИКА

Реагенты. В работе использованы минеральные соли производства ЗАО “НПО Экрос” (Россия); бифенил, додецилсульфат натрия (“Sigma”, Германия); H_2SO_4 , гексан, ацетонитрил (НПК “Криохром”, Россия); экспериментальная смесь хлорбифенилов (**смесь А**) (Институт органического синтеза УрО РАН, Россия).

Бактериальные штаммы. Штаммы *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 (=ИЭГМ 896) выделены из техногенных почв, загрязненных отходами химических и соледобывающих предприятий (г. Березники, Пермский край). Исследуемые штаммы обладают высоким биодеградирующим потенциалом по отношению к различным (хлор)ароматическим соединениям, в том числе бифенилу и моно-, ди-, трихлорбифенилам [7, 9, 17, 18].

Получение биомассы бактериальных культур. Использовали минеральную среду К1 (г/л): K_2HPO_4 – 4.0, NaH_2PO_4 – 0.4, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $Ca(NO_3)_2$ – 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.15, pH среды 7.3 [19]. В качестве источника углерода добавляли бифенил (1 г/л). Культивирование осуществляли в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды К1 на термостатируемой качалке (120 об/мин) при 28°C.

Деструкция смеси хлорбифенилов. Деструкцию проводили с “отмытыми” клетками, как описано [6]. Смесь А вносили в виде ацетонового раствора до конечной концентрации 32 мг/л. В контрольных образцах использовали бактериальную биомассу, инактивированную автоклавированием (1 атм., 30 мин). Количественное и качественное определение хлорбифенилов (ХБ) в смеси А до и после бактериальной трансформации осуществляли согласно [9]. Количественное содержание ХБ вычисляли на основании сравнения высоты и площади пиков на хроматограмме в экспериментальных и контрольных образцах с высотой и площадью пиков ХБ в исходной смеси А. Величину деструкции (Д) рассчитывали по формуле:

$$D(\%) = \frac{C_{\text{контр}} - C_{\text{эксп}}}{C_{\text{контр}}} \times 100,$$

где $C_{\text{контр}}$ – концентрация ХБ в контроле, мг/л; $C_{\text{эксп}}$ – концентрация ХБ в экспериментальном образце, мг/л.

Дегградация ХБ. Продукты дегградации определяли на спектрофотометре BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф LC-10ADvp и детектор RF-10Axl “Shimadzu”, Япония, колонка Lichrosorb RP-18 10U 250 × 4.6 мм “Alltech”, США) в культуральной жидкости, предварительно очищенной от бактериальных клеток центрифугированием при 9660 g в течение 3 мин (центрифуга miniSpin, “Eppendorf”, Германия).

Образование продуктов мета-расщепления ароматического кольца хлорбифенилов – (хлор)2-гидрокси-6-оксо-фенилгекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК) определяли спектрофотометрически при длине волны от 390 до 440 нм [15, 16].

Наличие в надосадочной жидкости ХБК и 4-гидроксибензойной кислоты (4-ГБК) определяли методом ВЭЖХ. Вносили 20 мкл очищенной от клеток культуральной жидкости в установку ВЭЖХ.

Подвижная фаза — смесь ацетонитрил–0.1%-ный H_3PO_4 (70 : 30), скорость протока — 0.70 мл/мин. Продукты деградации ХБ определяли в УФ при длине волны 205 нм. Идентификацию проводили с помощью сравнения времени удерживания на колонке исследуемых и стандартных соединений. Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений.

Наличие свободных ионов хлора контролировали измерением оптической плотности хлорида серебра при длине волны 460 нм, образующегося после реакции ионов хлора с азотнокислым серебром [20].

Образование (хлор)дигидроксибифенила (ДГБ) и (хлор)бифенилдигидродиола определяли в обезвоженных гексановых экстрактах культуральной жидкости [9]. Анализ проводили на газовом хроматографе GC6890N (“Agilent Technology”, США) с масс-селективным детектором MSD5973N (“Agilent Technology”, США) и кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS SN US15189741-1 (30 м × 0.25 мм) (“Agilent Technology”, США) в режиме, аналогичном определению хлорбифенилов [9]. Метаболиты идентифицировали с помощью программ MSD Productivity ChemStation Software Rev.C.00.01 (“Agilent Technology”, США) и Mass Spectral Libraries NIST 98 (“Scientific Instrument Services”, США).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ смеси полихлорированных бифенилов. Для изучения процесса разложения ПХБ штаммами рода *Rhodococcus* была использована смесь А с преимущественным содержанием тетрахлорированных бифенилов, которые составляли 88.3% от остальных ХБ смеси (табл. 1, 2). Элементный анализ смеси А показал, что по содержанию хлора данная смесь наиболее близка к известному коммерческому продукту Ароклор 1248 (табл. 1) [21]. В смеси А так же, как и в Ароклор 1242 и 1248, преобладают тетрахлорированные бифенилы и, в отличие от данных для Ароклор, незначительно представлены три-, пента- и гексазамещенные ХБ (2.5, 8.5, 0.7% соответственно). Полностью спектр ПХБ смеси А встречается в составе Ароклор 1242 (табл. 2) [21].

Биодеградация хлорбифенилов смеси А. Штаммы *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a активно разлагали хлорбифенилы смеси А (рис. 2). Анализ динамики убыли ХБ позволил констатировать, что наибольшую деструктивную активность проявлял штамм G12a, значительно снижая

Таблица 1. Состав экспериментальной (смесь А) и коммерческих (Ароклор) [21] смесей полихлорированных бифенилов (%)

Группа ХБ	Смесь А	Ароклор		
		1242	1248	1254
Моно-	—	3	—	—
Ди-	—	13	2	—
Три-	2.5	28	18	—
Тетра-	88.3	30	40	11
Пента-	8.5	22	36	49
Гекса-	0.7	4	4	34
Гепта-	—	—	—	6
Окта-	—	—	—	—
Нана-	—	—	—	—
[Cl], мас. %	≈48.1	41.3	48.6	54.4

Примечание: знак (—) — в смеси отсутствуют.

содержание хлорбифенилов (71%) в течение первых 2 сут эксперимента. Суммарная концентрация хлорбифенилов при использовании штамма B7a уменьшалась на 40% в течение первых 2 сут и на 3 сут — на 55%. Напротив, динамика убыли хлорбифенилов при разложении штаммом *R. ruber* P25 была близка к линейной и составляла около 26% за 1 сут. За весь период эксперимента (3 сут) уровень деструкции хлорбифенилов смеси А исследуемыми штаммами составил 78–95% (рис. 2).

В литературе описаны бактериальные штаммы, осуществляющие деструкцию коммерческих смесей ПХБ—Ароклор 1242 и 1248, близких к смеси А по изомерному и гомологичному составу ПХБ и содержанию хлора (табл. 1, 2). Так, штамм *Alcaligenes eutrophus* H850 разлагал около 81% ХБ данных смесей в течение 2 сут, *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 — 57.5–73.3% хлорбифенилов (Ароклор 1242) — за 4 сут, а штаммы родов *Enterobacter*, *Ralstonia* и *Pseudomonas* осуществляли деструкцию на 37–91% ХБ (Ароклор 1242) — за 12 сут [22–24]. А.В. Kolar с сотр. были выделены и описаны штаммы рода *Rhodococcus*, способные разлагать 50–61% ХБ (Ароклор 1248) в течение 14 сут [10]. *R. erythropolis* Z6 трансформировал 56–60% ХБ в коммерческих смесях Ароклор 1248 и ПХБ 50 за 14 сут [11]. Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют, что уровень деструкции хлорбифенилов смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. G12a и *R. ruber* P25 сопоставим с уровнем разложения смесей ПХБ грамотрицательными бактериями и значительно

Таблица 2. Содержание (%) индивидуальных ПХБ в смеси А (настоящее исследование) и в коммерческих смесях торговой марки Ароклор [21]

№ ПХБ*	Положение хлора в молекуле бифенила	Смесь А, %	Ароклор, %		
			1242	1248	1254
17	2,4,2'-	2.04	3.22	1.27	0.03
28	2,4,4'-	0.44	6.08	3.36	0.06
41	2,3,4,2'-	0.52	0.59	0.89	0.74
44	2,3,2',5'-	1.61	3.32	5.95	0.61
47	2,4,2',4'-	12.49	0.96	1.4	0.07
49	2,4,2',5'-	7.41	2.91	4.24	0.30
52	2,5,2',5'-	22.61	3.22	6.22	0.78
56	2,3,3',4'-	2.09	1.28	2.83	1.19
60	2,3,4,4'-	2.24	0.91	1.90	0.68
64	2,3,6,4'-	5.28	1.68	3.35	0.31
68	2,3,3',5'-	0.94	0.01	—	—
71	2,6,3',4'-	1.22	0.85	1.21	0.09
72	2,5,3',5'-	10.12	0.02	—	—
75	2,4,6,4'-	7.20	0.90	0.05	—
77	3,4,3',4'-	14.54	0.23	0.36	0.11
85	2,3,4,2',4'-	1.65	0.28	0.96	2.28
105	2,3,4,3',4'-	0.66	0.41	1.32	6.06
110	2,3,6,3',4'-	4.68	0.77	2.67	7.42
118	2,4,5,3',4'-	1.50	0.69	2.18	12.27
153	2,4,5,2',4',5'-	0.77	0.08	0.34	3.07

* Классификация ИЮПАК, (—) — в смеси отсутствует.

превышает аналогичный показатель, выявленный для известных штаммов рода *Rhodococcus*.

Аэробное разложение полихлорированных бифенилов бактериями происходит преимущественно по пути окислительного разложения (хлор)бифенила (рис. 1) [5, 15, 16]. В результате действия ферментов осуществляется окисление одного из колец молекулы, в случае хлорбифенилов, как правило, наименее замещенного, с последовательным образованием гидроксипроизводных (хлор)бифенила до расщепления молекулы на (хлор)пентадиеновую и (хлор)бензойную кислоты. Рядом авторов отмечено, что образующиеся при этом хлорированные дигидродиолбифенилы, дигидроксибифенилы и бензоаты могут быть более токсичны, чем исходные хлорбифенилы [2, 4, 5].

В экспериментах показано, что при культивировании исследуемых штаммов со смесью А в среде наблюдалось наличие продуктов метаболизма ХБ: (хлор)дигидроксибифенилы, (хлор)гидроксиоксо-фенилгексадиеновые кислоты, хлор- и гидрокси-замещенные бензойные кислоты (табл. 3). Несмотря на то что в среде не было зафиксировано присутствие хлорбифенилдигидродиолов, можно утверждать, что разложение хлорбифенилов смеси

осуществляется штаммами по классическому пути окислительного расщепления бифенила (рис. 1). Отсутствие первого метаболита пути разложения (хлор)бифенилов может быть обусловлено двумя факторами: 1) высокой активностью бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназы (КФ 1.3.1.56) (**Б2,3Д**) исследуемых штаммов к образующимся (хлор)бифенилдигидродиолам; 2) способностью бифенил 2,3-диоксигеназы (КФ 1.14.12.18) (**БДО**) при атаке пары углеродных атомов молекулы хлорбифенила, один из которых несет ион хлора, образовывать (хлор)ДГБ, минуя стадию образования (хлор)бифенилдигидродиолов. Подобная схема окисления (ди-пента)хлорбифенилов описана для бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *Rhodococcus globerulus* P6 и *Burkholderia xenovorans* LB400 [13, 16].

Установлено, что при деструкции ХБ смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a не происходило накопления в среде в значительном количестве (хлор)дигидроксибифенилов, но регистрировалось образование различных ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}} = 397, 398, 440$ нм (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназы (КФ 1.13.11.39) (**2,3ДГБ ДО**) данных штаммов.

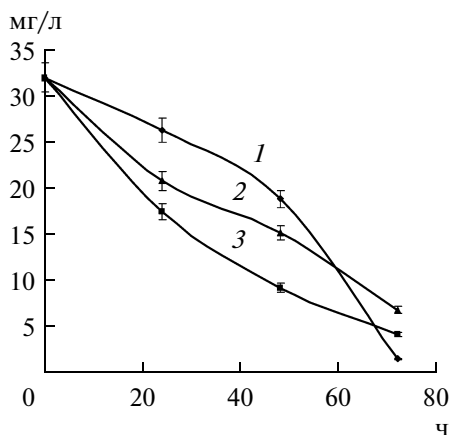


Рис. 2. Разложение (мг/л) смеси А штаммами рода *Rhodococcus*: 1 – *Rhodococcus* sp. В7а, 2 – *R. ruber* P25, 3 – *Rhodococcus* sp. G12а.

Напротив, при разложении ХБ штаммом *R. ruber* P25 не отмечено образование ГОФДК, но зафиксировано накопление ДГБ (табл. 3). Известно, что хлорированные ДГБ осуществляют обратимое субстратное ингибирование бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназы [25]. Можно предположить, что 2,3ДГБ ДО_{P25} менее устойчива к ингибирующему действию (хлор)дигидроксибифенилов, чем 2,3ДГБ ДО_{В7а} и 2,3ДГБ ДО_{G12а}.

Ограничивать утилизацию ПХБ может также неспособность ГОФДК гидролазы (КФ 3.7.1.8) трансформировать ряд изомеров хлорированных ГОФДК. Так, ГОФДК, несущие ионы хлора в диеноатной части, слабо трансформируются гидролазами штаммов *R. globerulus* P6 и *B. xenovorans* LB400, тогда как ГОФДК с заместителями в фенольной части молекулы являются более доступным субстратом для ГОФДК гидролаз данных штаммов [14]. Анализ состава смеси А (табл. 2) и возможных мета-

болических схем разложения ХБ смеси (данные не представлены) показал, что основная доля образующихся ГОФДК содержит ионы хлора в обеих частях молекулы. ГОФДК гидролазы штаммов *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляют активность к хлорированным ГОФДК, о чем свидетельствует накопление невысоких концентраций ГОФДК в культуральной среде и присутствие хлорбензойных кислот.

По нашим данным, штаммы *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. В7а и *Rhodococcus* sp. G12а утилизируют 2-хлорбензойную (2-ХБК) и (или) 4-хлорбензойную (4-ХБК) кислоты [7, 9, 17, 18]. Как видно из табл. 3, при разложении смеси А образуются хлор- и гидроксibenзойные кислоты. Следует отметить, что 4-гидроксibenзойная кислота является основным метаболитом гидролитического дехлорирования 4-ХБК [19]. Анализ динамики изменения концентрации 2-ХБК и 4-ГБК у штамма *Rhodococcus* sp. В7а и 4-ХБК у штаммов *R. ruber* P25 и *Rhodococcus* sp. G12а показал, что хлорбензойные кислоты не являются конечным продуктом в случае конверсии смеси А данными штаммами. Аналогичная способность к разложению пара-, но не орто-, замещенных моно- и дихлорбензойных кислот, образующихся при деструкции тетраХБ, описана для штамма *Alcaligenes* sp. JВ1 [26].

Для штамма *Rhodococcus* sp. В7а определено содержание свободных ионов хлора в среде через 72 ч деструкции смеси А. Установлено, что концентрация ионов хлора составляла 83.8% от максимальной возможной при полном дехлорировании исходной смеси хлорбифенилов. Полученные данные могут свидетельствовать, что при утилизации смеси А штаммом *Rhodococcus* sp. В7а не происходит накопления значительных количеств токсичных хлорированных метаболитов.

Деструкция индивидуальных ПХБ. Снижение концентрации ПХБ в смесях под действием аэроб-

Таблица 3. Продукты разложения смеси А штаммами рода *Rhodococcus*

Штамм	Время, ч	(хлор)ДГБ, % от общего состава смеси	(хлор)ГОФДК		Производные бензойной кислоты, мг/л			
			$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ОП, ед.	2-ХБК	4-ХБК	2,4-ХБК	4-ГБК
В7а	24	1.51 ± 0.02	440	0.156	н.д.	н.д.	н.д.	1.883 ± 0.004
	48	2.62 ± 0.03		0.181	0.079 ± 0.001	н.д.	н.д.	0.646 ± 0.002
	72	2.32 ± 0.02		0.206	0.057 ± 0.003	н.д.	н.д.	0.333 ± 0.002
G12а	24	3.88 ± 0.04	440	1.289	1.008 ± 0.002	3.180 ± 0.004	н.д.	0.382 ± 0.003
	48	5.45 ± 0.01	398	1.334	1.509 ± 0.001	1.789 ± 0.001	0.031 ± 0.005	0.935 ± 0.002
	72	5.16 ± 0.03	397	1.408	3.573 ± 0.004	1.607 ± 0.003	0.384 ± 0.004	4.191 ± 0.003
P25	24	6.71 ± 0.07	н.д.	н.д.	н.д.	0.004 ± 0.001	н.д.	н.д.
	48	19.42 ± 0.05			н.д.	0.103 ± 0.002	н.д.	н.д.
	72	21.85 ± 0.02			н.д.	0.073 ± 0.002	н.д.	0.031 ± 0.001

Примечание: (н.д.) – не детектировалось.

Таблица 4. Деструкция (%) индивидуальных хлорбифенилов смеси А штаммами рода *Rhodococcus*

ПХБ, положение хлора в молекуле	<i>Rhodococcus</i> sp. В7а			<i>Rhodococcus ruber</i> P25			<i>Rhodococcus</i> sp. G12а		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
2,4,2'-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2,3,4,2'-	100	100	100	100	100	100	42.3 ± 0.2	69.1 ± 0.5	95.7 ± 0.1
2,4,4'-	100	100	100	100	100	100	48.6 ± 0.1	82.9 ± 0.4	94.0 ± 0.2
2,3,4,4'-	100	100	100	18.7 ± 0.2	100	100	20.1 ± 0.2	44.4 ± 0.4	95.1 ± 0.2
2,3,6,4'-	100	100	100	88.5 ± 0.4	100	100	93.1 ± 0.4	97.7 ± 0.2	98.7 ± 0.3
2,4,6,4'-	44.5 ± 0.2	61.1 ± 0.6	100	13.0 ± 0.3	19.7 ± 0.2	100	45.8 ± 0.2	88.6 ± 0.3	97.1 ± 0.1
2,4,2',4'-	78.0 ± 0.3	100	100	79.1 ± 0.4	100	100	32.5 ± 0.1	49.2 ± 0.3	74.7 ± 0.2
2,3,4,2',4'-	9.3 ± 0.1	100	100	46.7 ± 0.4	100	100	29.5 ± 0.3	51.4 ± 0.2	78.6 ± 0.3
2,4,2',5'-	8.2 ± 0.1	50.4 ± 0.4	100	14.9 ± 0.1	23.6 ± 0.1	100	23.4 ± 0.1	46.6 ± 0.1	76.7 ± 0.3
2,3,2',5'-	8.7 ± 0.4	19.1 ± 0.4	100	51.2 ± 0.6	100	100	17.4 ± 0.2	39.9 ± 0.1	77.0 ± 0.3
2,5,2',5'-	0	35.9 ± 0.2	89.2 ± 0.2	2.9 ± 0.1	7.1 ± 0.2	29.2 ± 0.2	40.1 ± 0.5	97.1 ± 0.2	97.9 ± 0.1
2,3,3',4'-	9.0 ± 0.2	28.2 ± 0.3	100	77.8 ± 0.3	100	100	19.0 ± 0.5	41.1 ± 0.5	81.6 ± 0.4
2,6,3',4'-	0.6 ± 0.1	100	100	50.1 ± 0.5	100	100	48.1 ± 0.3	51.1 ± 0.5	97.8 ± 0.2
3,4,3',4'-	1.6 ± 0.2	52.1 ± 0.1	100	32.4 ± 0.2	36.7 ± 0.2	78.7 ± 0.2	60.1 ± 0.4	66.5 ± 0.4	81.4 ± 0.1
2,3,6,3',4'-	0	31.3 ± 0.1	100	35.7 ± 0.1	36.5 ± 0.1	48.7 ± 0.1	23.0 ± 0.2	47.6 ± 0.1	77.0 ± 0.1
2,4,5,3',4'-	0	100	100	59.5 ± 0.3	100	100	29.4 ± 0.6	48.9 ± 0.1	78.1 ± 0.2
2,3,4,3',4'-	100	100	100	100	100	100	24.4 ± 0.2	54.4 ± 0.2	79.8 ± 0.3
2,5,3',5'-	72.3 ± 0.5	100	100	17.5 ± 0.2	79.9 ± 0.1	100	58.6 ± 0.1	77.4 ± 0.2	98.2 ± 0.4
2,3,3',5'-	100	100	100	100	100	100	40.3 ± 0.3	43.5 ± 0.1	44.2 ± 0.2
2,4,5,2',4',5'-	100	100	100	100	100	100	39.5 ± 0.1	49.3 ± 0.1	85.8 ± 0.1

ных бактериальных культур обусловлено деструкцией отдельных гомологов или изомеров, чаще всего — моно-, ди- и трихлорированных. При этом средне- и высокохлорированные бифенилы, наиболее устойчивые к микробной атаке и высокотоксичные для живых организмов, остаются не трансформированными [4, 11, 12, 26]. В результате наших исследований установлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляют деструктивную активность по отношению ко всем ПХБ, присутствующим в смеси А (табл. 2, 4). Штаммы активно разлагали три- и тетрахлорированные бифенилы, содержащие монохлорированное кольцо с заместителями в орто- или пара-положении (2,4,2'-, 2,4,4'-, 2,3,4,2'-, 2,3,4,4'-, 2,3,6,4'-, 2,4,6,4'-ХБ). Аналогичный уровень деструкции данных хлорбифенилов описан для штаммов *A. eutrophus*

H850, *Rhodococcus jostii* RHA1 и *B. xenovorans* LB400 [12, 16, 22].

Анализ деструкции отдельных ПХБ смеси А показал, что бифенил 2,3-диоксигеназа штаммов *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляет активность к моно-, ди- и тризамещенным кольцам молекулы ПХБ (табл. 4). Ранее нами установлена способность БДО_{P25} окислять ди-хлорированное кольцо 2,4,2'-ХБ (данные не показаны). Известно, что на активность бифенил 2,3-диоксигеназы оказывает влияние не только количество заместителей, но и их положение в молекуле ПХБ [13, 16, 27]. Активность БДО_{LB400} уменьшается в ряду — незамещенное кольцо, орто-, мета-, пара-замещенное, а БДО_{P6} — мета-, пара-, ди-орто-хлорированное кольцо молекулы ПХБ [13, 16]. Получен-

ные нами результаты не позволяют выявить закономерность в активности бифенил 2,3-диоксигеназы исследуемых штаммов по отношению к дизамещенным кольцам хлорированным в орто-, мета- или пара-положении, однако можно утверждать, что БДО_{P25}, БДО_{B7a} и БДО_{G12a} окисляют орто-пара-, орто-мета, мета-пара- и мета-мета-дихлорированные кольца в молекуле ПХБ (табл. 4).

К концу 3 сут биодеструкции исследуемая смесь ПХБ была представлена: 1) при разложении штаммом B7a – 2,5,2',5'-ХБ; 2) при разложении штаммом P25 – 2,5,2',5'-ХБ, 3,4,3',4'-ХБ и 2,3,6,3',4'-ХБ; 3) при разложении штаммом G12a отмечено наличие в незначительном количестве большинства соединений исходной смеси (табл. 4). Согласно ряду работ, наиболее устойчивыми к микробному окислению являются симметрично замещенные ПХБ, у которых в обоих кольцах молекулы присутствуют ионы хлора в орто-мета-, орто-пара- или мета-пара-положениях [4, 5, 22]. Помимо симметричного расположения заместителей, важную роль играет концентрация данных ХБ [27]. Штаммы *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a осуществляли трансформацию 2,5,2',5'-ХБ эффективнее, чем известные ПХБ-деструкторы родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и *Ralstonia* [11, 12, 22, 24, 28].

Нами было установлено, что родококки разлагают 78–100% 3,4,3',4'-ХБ в концентрации 15.75 мкМ (начальная концентрация в смеси А) за 3 сут. Ли Ксу с сотр. [27] показали, что штамм *Enterobacteria* sp. LY402 трансформирует 50% 3,4,3',4'-ХБ от исходной концентрации 0.05 мкМ за 8 сут, повышение концентрации хлорбифенила до 0.5 мкМ приводило к полному ингибированию деструкции. Уровень деструкции данного соединения в коммерческих смесях ПХБ штаммами *R. jostii* RHA1 и *A. eutrophus* H850 составлял 20–26% [12].

Исследуемые штаммы осуществляли разложение гексахлорированного бифенила, несущего по 3 заместителя в каждом кольце молекулы. Уровень деструкции 2,4,5,2',4',5'-ХБ составил 85–100% (начальная концентрация в смеси А – 6.8 мкМ). Из литературы известно, что данный хлорбифенил является устойчивым к микробной атаке. Способность к его разложению отмечена для *R. jostii* RHA1 (34%), *A. eutrophus* H850 (20%) и *Enterobacteria* sp. LY402 (7–50% при начальной концентрации 5 мкМ) [12, 22, 27]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой деградирующей активности штаммов рода *Rhodococcus* по отношению к труднодоступным полихлорированным бифенилам.

Следует отметить, что динамика разложения ПХБ, оставшихся в культуральной жидкости к концу инкубации (табл. 4), позволяет предположить, что возможно достижение их полной деструкции исследуемыми штаммами.

Таким образом, штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. G12a и *R. ruber* P25 эффективно утилизируют смесь полихлорированных бифенилов,

основную долю которой составляют тетрахлорированные изомеры (88.3%), и могут быть рекомендованы для использования в технологиях утилизации ПХБ и восстановления загрязненных территорий.

Авторы выражают благодарность Гусеву В.А и Шишкину М.А. (ИЭГМ УрО РАН) за помощь в исследовании образцов смеси А, подвергнутых бактериальной деструкции, методом газохроматографического масс-спектрометрического анализа.

Работа поддержана Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (ГР № 01200963682); ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (№ 2009-1.1-201-018-001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22–23 May // UNEP/POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme, Geneva. 2001.
2. Васильева Г.К., Стрижакова Е.П. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 725–741.
3. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q.X. // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2009. V. 6. № 1. P. 278–309.
4. Furukawa K., Fujihara H. // J. Biosci. Bioengin. 2008. V. 105. № 5. P. 433–449.
5. Pieper D.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. № 2. P. 170–191.
6. Рыбкина Д.О., Плотникова Е.Г., Дорофеева Л.В., Мироненко Ю.Л., Демаков В.А. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 759–765.
7. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Демаков В.А. Патент РФ № 2262531 // Б.И. 2005. № 29.
8. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Biology of Rhodococcus. Microbiology Monographs / Ed. H.M. Alvares. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 16. P. 231–262.
9. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 644–650.
10. Kolar A.B., Hrsak D., Fingler S., Cetkovič H., Petrič I., Količ N.U. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2007. V. 60. № 1. P. 16–24.
11. Petrič I., Hrsak D., Fingler S., Voncina E., Cetkovič H., Kolar A.B., Količ N.U. // Food Technol. Biotechnol. 2007. V. 45. № 1. P. 11–20.
12. Seto M., Kimbara K., Shimura M., Hatta T., Fukuda M., Yano K. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 9. P. 3353–3358.
13. McKay D.B., Seeger M., Zielinski M., Hofeer B., Timmis K.N. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 6. P. 1924–1930.
14. Seah S.Y.K., Labbe G., Kaschebek S.R., Reifennath F., Reineke W., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 5. P. 1511–1516.
15. Seeger M., Timmis K.N., Hofer B. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 7. P. 2654–2658.

16. Seeger M., Zielinski M., Timmis K.N., Hofer B. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 8. P. 3614–3621.
17. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
18. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Плотникова Е.Г. // Актуальные аспекты современной микробиологии: Матер. V молодежной школы-конференции с международным участием. Москва. 2009. С. 104–105.
19. Плотникова Е.Г., Цой Т.В., Грищенко В.Г., Зайцев Г.М., Нагаева М.В., Боронин А.М. // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 589–597.
20. Tsoi T.V., Zaitsev G.M., Plotnikova E.G., Kosheleva I.A., Boronin A.M. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. № 2. P. 165–169.
21. Frame G.M. // Fresenius J. Anal. Chem. 1997. V. 357. № 6. P. 714–722.
22. Bedard D.L., Wagner R.E., Brennan M.J., Haberl M.L., Brown J.F. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 5. P. 1094–1102.
23. Hatamian-Zarmi A., Shojaosadati S.A., Vasheghani-Farahani E., Hosseinkhani S., Emamzadeh A. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2009. V. 63. № 6. P. 788–794.
24. Adebuseye S.A., Ilori M.O., Picardal F.W., Amund O.O. // Chemosphere. 2008. V. 73. № 1. P. 126–132.
25. Vaillancourt F.H., Haro M.-A., Drouin N.M., Karim Z., Maaroufi H., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2003. № 4. V. 185. P. 1253–1260.
26. Commandeur L.C.M., May R.J., Mokross Y., Bedard D.L., Reineke W., Govers H.A.J., Parsons J.R. // Biodegradation. 1996. V. 7. № 6. P. 435–443.
27. Xu L., Xu J.-J., Jia L.-Y., Liu W.-B., Jian X. // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 3. P. 784–789.
28. Michaud L., Di Marco G., Bruni V., Lo Giudice A. // Mar. Pollut. Bull. 2007. V. 54. № 11. P. 1754–1761.

Destruction of Mixture of Tri-Hexa-Chlorinated Biphenyls by *Rhodococcus* Genus Strains

D. O. Egorova, V. A. Demakov, and E. G. Plotnikova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia
e-mail: daryao@rambler.ru

Received April 7, 2011

Abstract—Destruction of polychlorinated biphenyls (PCBs) by strain-destructors *Rhodococcus* sp. B7a and *Rhodococcus* sp. G12a has been studied. It was shown that these strains destruct 78–95% of PCB mixture containing tri-hexa-chlorinated biphenyls. *Rhodococcus* destruct all components of the mixture of tri-, tetra-, penta-, and hexa-chlorinated biphenyls without accumulation of toxic chlorinated metabolites. The studied bacteria destruct PCB that are the most stable for oxidation, such as 2,5,2',5'-CB; 3,4,3',4'-CB; and 2,4,5,2',4',5'-CB. The most perspective strains are *R. rubber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a and *Rhodococcus* sp. G12a whose metabolic potential can be used for biotechnological refinement of the environment from highly toxic pollutants.