

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.222:577.152.199.2

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-48-55.

А. О. Воронина^a, Е. Г. Плотникова^{a,b}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ДЕСТРУКТОР БИФЕНИЛА *RHODOCOCCUS* SP. VR43-1: ВЫДЕЛЕНИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки, протекающей по территории предприятия «Средне-Волжский завод химикатов» (г. Чапаевск, Самарская обл.), выявлены генетические структуры (*bphA1*-гены), кодирующие бифенил 2,3-диоксигеназу (БДО), ключевой фермент, ответственный за деструкцию бифенила и полихлорированных бифенилов (ПХБ, токсичные труднорастворяемые поллютанты). Обнаружено сходство на уровне 95.8–99.7% исследуемых нуклеотидных последовательностей с генами α -субъединиц БДО и других диоксигеназ (подсемейства бензол/толуол ДО) штаммов рода *Rhodococcus*. С использованием метода накопительного культивирования из образца донных отложений был выделен активный штамм-деструктор бифенила, обозначенный VR43-1. При сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с гомологичными последовательностями из базы данных EzBioCloud, штамм VR43-1 имел наибольший уровень сходства (100%) с типовым штаммом *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T. Сравнение гена *bphA1* штамма VR43-1 с *bphA1*-генами активных деструкторов бифенила/ПХБ *R. jostii* RHA1 и штаммов *R. wratislaviensis* P13 и Ch628 показало их сходство на уровне 99.1 и 100%, соответственно.

Ключевые слова: бифенил; полихлорированные бифенилы; бактерии-деструкторы; *Rhodococcus*; *bphA1*-гены; молекулярное клонирование генов.

А. О. Voronina^a, E. G. Plotnikova^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

ISOLATION AND MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF BIPHENYL DEGRADING *RHODOCOCCUS* SP. STRAIN VR43-1

The genetic structures (*bphA1* genes) encoding biphenyl 2,3-dioxygenase (BDO) - a key enzyme in the aerobic catabolism of biphenyl and polychlorinated biphenyls (PCBs, persistent and toxic pollutants), are revealed in the microbial community of bottom sediments of the river Chapayevka, which flows through the territory of the chemical plant «Mid-Volga Chemical enterprise» (Chapayevsk, Samara region). The similarity (95.8-99.7%) of the studied nucleotide sequences with the genes of the BDO α -subunit and another dioxygenases (benzene / toluene subfamily DO) of genus *Rhodococcus* strains was found. An active strain-destroyer of biphenyl, designated VR43-1, was isolated from the bottom sediments sample by enrichment cultivation. A comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA genes with homologous sequences from the EzBioCloud database, showed that strain VR43-1 had the highest level of similarity (100%) with the type strain *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T. A comparison of the *bphA1* gene of the VR43-1 strain with the *bphA1* genes of the active biphenyl/PCB destroyer *R. jostii* RHA1 and the *R. wratislaviensis* strains P13 and Ch628 showed a similarity of 99.1% and 100%, respectively.

Key words: biphenyl; polychlorinated biphenyls; bacteria-destroyers; *Rhodococcus*; *bphA1*-genes; molecular cloning of genes.

На сегодняшний день загрязнение окружающей среды токсичными органическими соединениями, в том числе полученными в процессе технологической деятельности человека, остается актуальной-

шей проблемой экологии. Среди таких синтетических веществ наиболее широко распространенными поллютантами являются полихлорированные бифенилы (ПХБ), которые были отнесены к группе

стойких органических загрязнителей (СОЗ) Программой ООН по окружающей среде (ЮНЕП) (URL: <http://chm.pops.int>). Многочисленные исследования показали, что ПХБ негативно влияют на здоровье человека. Так, при длительном воздействии ПХБ повышается уровень возникновения онкологических заболеваний, происходит нарушение работы жизненно важных систем организма, таких как эндокринная, нервная, репродуктивная и иммунная [Mugan and Vasudeva, 2018].

Разложение ПХБ в природе осуществляется анаэробными и аэробными микроорганизмами [Liang et al., 2014]. Выделено и охарактеризовано большое количество аэробных бактерий-деструкторов бифенила (в том числе штаммов рода *Rhodococcus*), способных к утилизации или частичной трансформации ПХБ [Warren et al., 2004; Yang et al., 2004; Taguchi et al., 2007; Xiong et al., 2011]. Аэробный процесс разложения бифенила и ПХБ у бактерий осуществляется одними и теми же ферментными системами и включает четыре этапа [Furukawa, 2000]. Первая реакция – включение двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо бифенила, происходит под действием фермента бифенил 2,3-диоксигеназы (БДО) и считается определяющей стадией разложения бифенила/ПХБ [Pieper, Seeger, 2008]. Ген *bphA1*, кодирующий α -субъединицу БДО, играет ключевую роль в распознавании и связывании субстрата [Pieper, 2005] и является важным маркером при исследовании биодеградационного потенциала бактерий [Шумкова и др., 2015].

В последние годы восстановление загрязнённых территорий с использованием биологического потенциала бактерий является одним из наиболее оптимальных способов утилизации стойких токсичных соединений, как с экологической, так и с экономической точек зрения [Егорова и др., 2014; Sharma et al., 2018]. Поэтому постоянно проводится поиск новых, перспективных для использования в биотехнологических целях, активных бактерий-деструкторов СОЗ.

В течение нескольких десятилетий, до конца 1980-х гг., на территории г. Чапаевска (Самарская обл.) на химическом предприятии «Средне-Волжский завод химикатов» (ОАО «СВЗХ») осуществлялся выпуск различных хлорорганических соединений, в том числе 1,2,4-трихлорбензола, который далее использовался для изготовления содержащей ПХБ технической смеси – «Совтол-10» [Федоров, Оноприенко, 1993]. В результате интенсивной производственной деятельности произошло загрязнение территории предприятия и р. Чапаевки, протекающей вдоль территории завода, токсичными поллютантами [Назаров и др., 2016].

Цель работы – определить наличие ключевых генов разложения бифенила (*bphA1*-генов) в микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки (территория химического предприятия ОАО «СВЗХ», г. Чапаевск) и выделить бактерии-

деструкторы бифенила (полихлорированных бифенилов).

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В качестве материала для исследований были взяты четыре образца донных отложений р. Чапаевки, протекающей по территории химического предприятия ОАО «СВЗХ» (Самарская обл.). Пробы отбирались в стерильные пробирки объемом 50 мл и транспортировались к месту исследования (ИЭГМ УрО РАН, г. Пермь) в контейнере при температуре +4°C. Методом хромато-масс-спектрометрии в образце № 4 были обнаружены хлорированные бифенилы в количестве 0.213 мг/кг, а также эфиры фталевой кислоты (дибутилфталат, диоктилфталат), хлорсодержащие органические загрязнители линдан, алохлор, триалат и имеющие ароматическое строение (хлорбензолы и ДДТ) [Назаров и др., 2016].

Выделение ДНК, ПЦР и клонирование *bphA1*-генов

Выделение тотальной ДНК из образцов донных отложений проводили с использованием коммерческого набора реактивов «MP Biomedicals» (США). Концентрацию ДНК определяли на приборе QubitTM Fluorometer, («Invitrogen», США) при применении реактивов производителя.

С матрицы тотальной ДНК проводили амплификацию *bphA1*-генов с праймерами BPHD-f3 и BPHD-r1 [Iwai et al., 2010], специфичными к гену α -субъединицы БДО, на приборе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», США) согласно протоколу. Клонирование ПЦР-фрагменты *bphA1*-генов и последующий отбор рекомбинантных клонов осуществляли, как описано в статье [Шумкова и др., 2015].

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов *bphA1*-генов (ПДРФ-анализ) осуществляли с использованием эндонуклеазы рестрикции *HhaI* («Fermentas», Литва).

Для подготовки к секвенированию клонированных в составе вектора pTZ57R/T фрагментов ДНК проводили амплификацию вставки с использованием стандартных праймеров M13 (M13F 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3' и M13R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), для которых имеются сайты связывания в векторе pTZ57R по обеим сторонам от полилинкера. Описание секвенирования и анализа клонированных последовательностей *bphA1*-генов приведены ниже.

Накопительное культивирование, выделение штаммов-деструкторов бифенила

Для получения накопительной культуры в колбы Эрленмейера объемом 250 мл добавляли 50 мл минеральной среды K1 [Maltseva et al., 1999], об-

разец весом 0.5 г и бифенил (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Культивирование проводилось 1 месяц при температуре 28°C с аэрацией на термошейкере (120 об./мин). Полученную суспензию высевали на агаризованную среду К1, бифенил добавляли на крышку перевернутой чашки Петри и культивировали при температуре 28°C до появления колоний. Чистоту культур проверяли при выращивании на богатой среде LB [Маниатис и др., 1984].

Морфо-физиологические признаки бактериальной культуры

Морфологию выделенной чистой культуры изучали по общепринятым методикам [Методы общей бактериологии, 1983]. Рост бактериальной культуры при изменении осмолярности среды изучали как на агаризованной минеральной среде Раймонда [Розанова, Назина, 1982] с добавлением бифенила в качестве единственного источника углерода и энергии, так и на богатой среде Раймонда (в состав среды входит дрожжевой экстракт (2.5 г/л), триптон (5 г/л)), при концентрациях NaCl (г/л): 0, 30, 50, 70. Культивирование осуществляли в термостате при 28°C в течение 7 сут. Оценку роста бактериального штамма проводили при различных температурных режимах (+4°C, +10°C, +28°C, +37°C и +45°C), на агаризованных средах: К1 (минеральная среда) с добавлением бифенила и LB (богатая среда). Рост колоний учитывали на 7-е сут.

Способность исследуемого штамма разлагать ароматические соединения

Способность разлагать ароматические соединения оценивали путем культивирования в жидкой среде К1 на термошейкере (120 об./мин) и/или на агаризованной среде К1 при 28°C. В качестве источника углерода и энергии использовали следующие субстраты: толуол и фенол – помещали на крышку перевернутой чашки Петри; бифенил, нафталин, фенантрен, а также *орто*-фталевую, салициловую, *пара*-оксibenзойную, бензойную, протокатеховую кислоты (в виде натриевых солей в пересчете на количество кислоты), вносили в среду в концентрации 0.5 г/л. Бактериальный рост в жидкой среде на вышеперечисленных субстратах оценивали путем измерения оптической плотности культуры на спектрофотометре UV-Visible Bio-Spec-mini («Shimadzu», Япония) при λ_{\max} 600 нм, на агаризованной среде – оценивали рост бактериальных колоний.

Секвенирование и анализ генов 16S рРНК и *bphA1*

Выделение ДНК из исследуемого изолята осуществляли общепринятым методом [Short protocols in molecular biology, 1995]. Идентификацию клеточной культуры проводили с использованием стандартных

бактериальных праймеров 27F и 1492R [Tirola et al., 2002] для амплификации гена 16S рРНК. Амплификацию *bphA1*-генов проводили с праймерами ВРНД-f3 и ВРНД-r1 [Iwai et al., 2010]. Определение и анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных генов осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 («Applied Biosystems», США) на проборе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США), в лаборатории молекулярной биологии и генетики при кафедре ботаники и генетики растений, ПГНИУ). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v 2.0 и MEGA 6.0 (URL: <http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей генов *bphA1* и 16S рРНК проводили в международных базах данных GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] и EzBioCloud [<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>] соответственно.

Результаты и их обсуждение

Разнообразие *bphA1*-генов в микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки

Методом накопительного культивирования донных отложений (образца № 4) на бифениле была получена ассоциация микроорганизмов, из которой была выделена тотальная ДНК. С использованием праймеров к гену *bphA1* [Iwai et al., 2010] была осуществлена амплификация и получен ПЦР-продукт размером ~500 п.н., который был клонирован в составе вектора pTZ57R в клетках *E. coli*. Создана библиотека *bphA1*-генов, включающая 88 клонов. Методом ПДРФ-анализа у представителей каждой геномной группы (клоны Ch9, Ch14) были определены нуклеотидные последовательности клонированных участков и проведен филогенетический анализ (таблица, рис. 1).

При анализе клонов Ch9 и Ch14 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* (таблица). Полученные данные указывают на присутствие в микробном сообществе донных отложений р. Чапаевки генов *bphA1* и *bphA1*-подобных генов. Стоит отметить, что при сравнении нуклеотидных последовательностей двух исследуемых клонов (Ch9 и Ch14) с гомологичными последовательностями в международной базе данных GenBank (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), процентное сходство и перечень представителей бактериальных штаммов идентичны (таблица), в то же время между собой участки сравниваемых нуклеотидных последовательностей исследуемых клонов являются гетерогенными.

Наличие в общей ДНК, выделенной из полученной накопительной культуры (НК, образец дон-

ных отложений р. Чапаевки), нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам α -субъединицы БДО родококков, указывает на присутствие в исследуемом микробном сообществе деструкторов бифенила рода *Rhodococcus*.

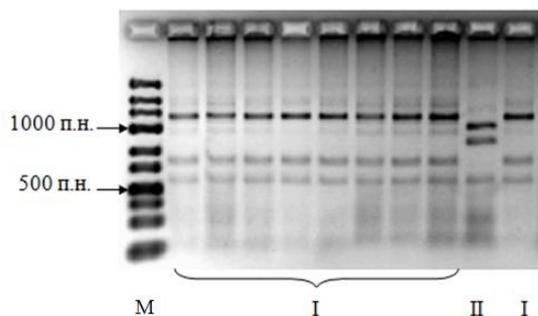


Рис. 1. Электрофореграмма рестриционных фрагментов генов *bphA1* после обработки эндонуклеазой *HhaI* (I, II – геномгруппы).

M – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (“Fermentas”, Литва)

Выделение и характеристика штамма-деструктора бифенила

Из полученной НК был выделен бактериальный штамм (обозначенный VR43-1), способный использовать бифенил в качестве единственного источника углерода и энергии. При выращивании штамма на агаризованной полноценной среде LB образовывались округлые, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–3 мм. Клетки штамма грамположительные, неподвижные, не образуют спор, каталазоположительные. Штамм VR43-1 способен к росту на агаризованных средах (среда LB и минеральная среда K1 с добавлением бифенила в качестве субстрата) в интервале температур от +4°C до +37°C. Ростовые эксперименты при изменении осмолярности среды показали, что штамм VR43-1 растет (как на среде LB, так и на минеральной среде Раймонд с добавлением бифенила) при концентрации NaCl до 70 г/л.

Сравнение клонированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов гидроксилирующих диоксигеназ (*bphA1*-генов) с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

Клон (геномгруппа)/штамм, размер анализируемого фрагмента ДНК	Гомологичные гены в GenBank	Номера сравниваемых нуклеотидных последовательностей в GenBank	Сходство, %	Ссылка	Место выделения <i>bphA1</i> -генов и/или бактерий-деструкторов
Клон Ch9 (I), 387 п.н. /	Гены α -субъединицы бифенил 2,3- диоксигеназы (<i>bphA1</i>): клоны HS7/HS8/NS7/NS8, некультивируемые бактерии	JN675903.1/ JN675902.1/ JN675900.1/ JN675901.1	99.2-98.9 / 99.1-98.6 / < 92	н.д.*	Нет данных
Клон Ch14 (II), 373 п.н. /		Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> P13	KP972446.1	99.7 / 99.7 / 100	Шумкова и др., 2015
Штамм VR43-1, 364 п.н.	Ген α -субъединицы бензотрифторид 2,3-диоксигеназы (<i>btfA1</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. 065240	AB970510.1	99.2 / 98.9 / 99.7	Yano et al., 2015	Нет данных
	Ген 1,2-дигидробензол-1,2-диол -дегидрогеназы (<i>bnzB</i>); <i>Rhodococcus opacus</i> B4 (pROB02)	AP011117.1	99.2 / 98.9 / 99.7	Na et al., 2005	Территория химических заводов. (Хиросима, Япония)
	Ген α -субъединицы толуол диоксигеназы (<i>terpA</i>); <i>Rhodococcus</i> sp. L4	EF527236.1	98.9 / 98.6 / 99.7	н.д.	Ил из очистных сооружений химического завода (Таиланд)

Окончание таблицы

Клон (геномгруппа)/штамм, размер анализируемого фрагмента ДНК	Гомологичные гены в GenBank	Номера сравниваемых нуклеотидных последовательностей в GenBank	Сходство, %	Ссылка	Место выделения bphA1-генов и/или бактерий-деструкторов
	Ген α -субъединицы изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (<i>ipbA1</i>); <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD2 (pBD2)	AY223810.1	98.4 / 98.1 / 100	Stecker et al., 2003	Нет данных
	Ген α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (<i>bphA1</i>); <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	D32142.1	95.8 / 96.2 / 99.1	Masai et al., 1995	Загрязнённая почва (Япония)

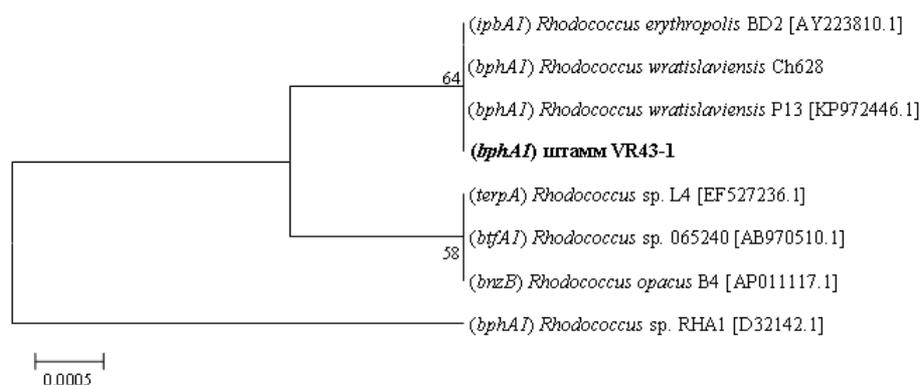


Рис. 2. Положение *bphA1*-генов исследуемого штамма VR43-1 на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей с использованием метода UPGMA.

Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью «bootstrap»-анализа. В качестве аутгруппы использована нуклеотидная последовательность большой субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы *Rhodococcus jostii* RHA1 (D32142.1)

Определение филогенетического положения на основании анализа генов 16S рРНК показало, что исследуемый штамм относится к роду *Rhodococcus*. При сравнении нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма VR43-1 с гомологичными последовательностями, имеющимися в базе данных EzBioCloud (URL: <https://www.ezbiocloud.net/>) сходство с типовым штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605^T (BAWF01000105) составило 100%.

При изучении биodeградационных свойств штамма VR43-1 была определена способность использовать штаммом различные моно- и полиароматические соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Помимо способности расти на минеральных средах с добавлением бифенила, штамм VR43-1 демонстрировал хороший рост на агаризованных средах с бензолом, толуолом, фенолом и дибутилфталатом. Активный рост штамма наблюдался в жидкой среде K1 на бифениле, нафталине, рост отсутствовал при вы-

ращивании на фенантрене. При культивировании в жидкой среде K1 штамм характеризовался способностью использовать а качестве субстрата моноароматические кислоты: орто-фталевою, пара-оксибензойную, протокатеховую, бензойную, но рост не наблюдался на салициловой кислоте.

Анализ нуклеотидной последовательности, амплифицированной с использованием праймеров к гену *bphA1* [Iwai et al., 2010], штамма VR43-1 показал 100%-ное сходство с генами α -субъединиц бифенил ДО штамма *R. wratislaviensis* P13 и изопропилбензол ДО штамма *R. erythropolis* BD2 (таблица). Штамм *R. wratislaviensis* P13, выделенный из почвы, загрязненной хлорорганическими соединениями (территория предприятия ОАО «Галоген», г. Пермь), является активным деструктором бифенила и хлорированных бифенилов [Шумкова и др., 2015]. Другой штамм, *R. erythropolis* BD2, выделенный при культивировании на изопропилбензоле, характеризуется способностью утилизировать широкий спектр моно(поли)аро-

матических соединений, таких как бифенил, толуол, бензол, фенол и другие [Dabrock et al., 1994].

Проведенное сравнение амплифицированного фрагмента ДНК (*bphA1*) штамма VR43-1 с *bphA1*-геном активного деструктора бифенила/ПХБ *R. jostii* RHA1 показало их сходство на уровне 99.1% (таблица). Штамм *R. jostii* RHA1 обладает исключительно высокой деструктивной активностью по отношению к индивидуальным конгенерам хлорированных бифенилов и различным смесям ПХБ [Furukawa, 2000].

Высокое сходство *bphA1*-гена штамма VR43-1 (на уровне 99.7%) с генами бензотрифторид ДО (*btfA1*), толуол ДО (*terpA*) и 1,2-дигидробензол-1,2-диол дегидрогеназы (*bnzB*) может быть обусловлено сходством большинства БДО с другими диоксигеназами подсемейства «бензол/толуол ДО» (к которому принадлежат вышеперечисленные ДО), благодаря чему БДО характеризуются способностью деградировать соединения со сходной химической структурой, обладая широкой субстратной специфичностью [Gibson and Parales, 2000].

Это утверждение подтверждается наличием активного бактериального роста штамма VR43-1 на различных моно(поли)ароматических соединениях (в том числе бензоле, толуоле).

Ранее из загрязненной почвы на территории предприятия ОАО «СВЗХ» (г. Чапаевск) был выделен штамм *R. wratislaviensis* Ch628, активный деструктор полихлорированных бифенилов и других хлорароматических соединений [Егорова и др., 2014]. Филогенетический анализ показал 100%-ное сходство анализируемых участков *bphA1*-генов исследуемого штамма VR43-1 и штамма Ch628 (таблица; рис. 2). На основании полученных данных можно предположить, что на загрязненной хлорорганическими соединениями территории предприятия ОАО «СВЗХ» (как в почве, так и в донных отложениях) функционируют микробные сообщества, в составе которых доминируют бактерии-деструкторы рода *Rhodococcus*, содержащие ферментные системы разложения бифенила/ПХБ и других (хлор)ароматических соединений.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353249.

Библиографический список

Егорова Д.О. и др. Бактерии-деструкторы полихлорированных бифенилов из почв с различным уровнем загрязнения // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2014. Вып. 4. С. 64–72.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 390 с.

Методы общей бактериологии: пер. с англ. / под ред. Ф. Герхардта с соавторами. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.

Назаров А.В. и др. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Экология человека. 2016. № 3. С. 3–8.

Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углерододокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.

Федоров Л.А., Оноприенко В.В. Диоксины как экологическая опасность: ретроспектива и перспективы. М.: Наука, 1993. 266 с.

Шумкова Е.С. и др. Полиморфизм генов *bphA* бактерий-деструкторов бифенила/полихлорированных бифенилов // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 4. С. 638–648.

Dabrock B. et al. Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism // Applied and environmental microbiology. 1994. Vol. 60, № 3. P. 853–860.

Furukawa K. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) // The Journal of general and applied microbiology. 2000. Vol. 46, № 6. P. 283–296.

Gibson D., Parales R. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology // Current opinion in biotechnology. 2000. Vol. 11, № 3. P. 236–243.

Iwai S. et al. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment // ISME J. 2010. Vol. 4. P. 279–285.

Liang Y. et al. Potential for polychlorinated biphenyl biodegradation in sediments from Indiana Harbor and Ship Canal // International biodeterioration & biodegradation. 2014. Vol. 89. P. 50–57.

Maltseva O.V. et al. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by aerobic bacteria // Biodegradation. 1999. Vol. 10. P. 363–371.

Masai E. et al. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // Applied and Environmental Microbiol. 1995. Vol. 61, № 6. P. 2079–2085.

Murugan K., Vasudevan N. Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. Vol. 157. P. 40–60.

Na K-S. et al. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005. Vol. 99, № 4. P. 378–382.

Ohtsubo Y. et al. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls // Appl Microbiol Biotechnol. 2004. Vol. 65. P. 250–258.

Petrić I. et al. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation // Journal of soils and sedi-

- ments. 2011. Vol. 11, № 2. P. 290–300.
- Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. Vol. 67. P. 170–191.
- Pieper D.H., Seeger M. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls // *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2008. Vol.15. P. 121–138.
- Sharma J.K. et al. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018. Vol. 25. P. 16355–16375.
- Short protocols in molecular biology. 3rd ed. / Eds. Ausbel F.M. et al. New York: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.
- Stecker C. et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2 // *Journal of bacteriology.* 2003. Vol. 185, № 17. P. 5269–5274.
- Taguchi K. et al. Polychlorinated biphenyl/biphenyl degrading gene clusters in *Rhodococcus* sp. K37, HA99, and TA431 are different from well-known *bph* gene clusters of rhodococci // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 2007. Vol. 71, № 5. P. 1136–1144.
- Takeda H. et al. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // *Journal of Bacteriology.* 2004. Vol. 186, № 7. P. 2134–2146.
- Warren R. et al. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // *Journal of Bacteriology.* 2004. Vol. 186, № 22. P. 7783–7795.
- Xiong F. et al. Expression, purification and functional characterization of a recombinant 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* // *Mol. Biol. Rep.* 2011. Vol. 38. P. 4303–4308.
- Yang X. et al. Genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader // *Journal of Bacteriology.* 2011. Vol. 193, № 18. P. 5032–5033.
- Yano K. et al. Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* sp. 065240 // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2015. Vol. 79, №. 3. P. 496–504.
- References**
- Egorova D.O. et al. [Bacteria destructors of polychlorinated biphenyls from the soil with various level of pollution]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija.* Iss. 4 (2014): pp. 64-72. (In Russ.).
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Methods of genetic engineering. Molecular cloning.* M.: Mir Publ., 1984. 390 p.
- Metody obshej bakterologii* [Methods of general bacteriology]. Moscow, Mir Publ., 1983. V. 1-3. (In Russ.).
- Nazarov A.V. et al. [Ecological-Microbiological Assessment of Polychlorinated Biphenyl-Contaminated Grounds]. *Ekologija človeka.* N 3 (2016): pp. 3-8. (In Russ.).
- Rožanova E.P., Nazina T.N. [Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil pool]. *Mikrobiologija.* V. 51 (1982): pp. 324-348. (In Russ.).
- Shumkova E.S. et al. [Polymorphism of *bpha* genes in bacteria-destructors of biphenyl/chlorinated biphenyls]. *Molekuljarnaja biologija.* V. 49, N 4 (2015): pp. 638-648. (In Russ.).
- Dabrock B. et al. Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism. *Applied and environmental microbiology.* V. 60, N 3 (1994): pp. 853-860.
- Fedorov L.A. Onoprienko V.V. *Dioksiny kak ekologičeskaja opasnost': retrospektiva i perspektivy* [Dioxins as an ecological danger:retrospective and perspective]. Moscow, Nauka Publ., 1993. 266 p. (In Russ.).
- Furukawa K. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *The Journal of general and applied microbiology.* V. 46, N 6 (2000): pp. 283-296.
- Gibson D., Parales R. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current opinion in biotechnology.* V. 11, N 3 (2000): pp. 236-243.
- Iwai S. et al. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment. *ISME J.* V. 4 (2010): pp. 279–285.
- Liang Y. et al. Potential for polychlorinated biphenyl biodegradation in sediments from Indiana Harbor and Ship Canal. *International biodeterioration & biodegradation.* V. 89 (2014): pp. 50-57.
- Maltseva O.V. et al. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by aerobic bacteria. *Biodegradation.* V. 10 (1999): pp. 363-371.
- Masai E. et al. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* spp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiolog.* V. 61, N 6. (1995): pp. 2079-2085.
- Murugan K., Vasudevan N. Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* V. 157 (2018): pp. 40-60.
- Na K-S. et al. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* V. 99, N 4 (2005): pp. 378-382.
- Ohtsubo Y. et al. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 65 (2004): pp. 250-258.
- Petrić I. et al. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil

- under bioremediation. *Journal of soils and sediments*. V. 11, N 2 (2011): pp. 290-300.
- Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol*. V. 67 (2005): pp. 170-191.
- Pieper D.H., Seeger M. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. V. 15 (2008): pp. 121-138.
- Sharma J.K. et al. Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils. *Environ. Sci. Pollut. Res*. V. 25 (2018): pp. 16355-16375.
- Short protocols in molecular biology. 3rd ed. / Eds. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. New York, John Wiley & Sons, 1995. 450 p.
- Stecker C. et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of the 210-kilobase linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. *Journal of bacteriology*. V. 185, N 17 (2003): pp. 5269-5274.
- Taguchi K. et al. Polychlorinated biphenyl/biphenyl degrading gene clusters in *Rhodococcus* sp. K37, HA99, and TA431 are different from well-known *bph* gene clusters of *Rhodococci*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. V. 71, N 5 (2007): pp. 1136-1144.
- Takeda H. et al. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* spp. strain RHA1. *Journal of Bacteriology*. V. 186, N 7 (2004): pp. 2134-2146.
- Warren R. et al. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* spp. strain RHA1. *Journal of bacteriology*. V. 186, N 22 (2004): pp. 7783-7795.
- Xiong F. et al. Expression, purification and functional characterization of a recombinant 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous*. *Mol. Biol. Repp*. V. 38 (2011): pp. 4303-4308.
- Yang X. et al. Genome sequence of *Rhodococcus* spp. strain R04, a polychlorinated-biphenyl biodegrader. *Journal of bacteriology*. V. 193, N 18 (2011): pp. 5032-5033.
- Yano K. et al. Degradation of benzotrifluoride via the dioxygenase pathway in *Rhodococcus* spp. 065240. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. V. 79, N 3 (2015): pp. 496-504.

Поступила в редакцию 18.12.2018

Об авторах

Воронина Анна Олеговна, инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН
ORCID: 0000-0002-7295-1337
 614081, Пермь, ул. Голева, 13;
 voroninaao@gmail.com; (342)2808431

Плотникова Елена Генриховна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН
ORCID: 0000-0002-0107-0719
 614081, Пермь, ул. Голева, 13; peg_el@mail.ru;
 (342)2808431

профессор кафедры ботаники и генетики растений
 ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Информация для цитирования:

Воронина А.О., Плотникова Е.Г. Деструктор бифенила *Rhodococcus* SP. VR43-1: выделение, молекулярно-биологическая характеристика // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 1. С. 48-55. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-48-55.

Voronina A.O., Plotnikova E.G. [Isolation and molecular biological characterization of biphenyl degrading *Rhodococcus* sp. strain VR43-1]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 1 (2019): pp. 48-55. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-48-55.

About the authors

Voronina Anna Olegovna, engineer of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.
ORCID: 0000-0002-7295-1337
 13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
 voroninaao@gmail.com; (342)2808431

Plotnikova Elena Genrikhovna, doctor of biology, leading researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.
ORCID: 0000-0002-0107-0719
 13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
 peg_el@mail.ru; (342)2808431

professor of the Department of botany and plant genetics
 Perm State University
 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

