Министерство науки и высшего образования российской федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра генетики и клеточной биологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Руководитель ООП
д-р биол.наук, профессор
_____ В.Н. Стегний
подпись
« _____ » _____20 ___ г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА
(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)

Поиск генов ферментов, участвующих в биодеградации фракций нефти (аренов и алканов) и органических загрязнителей (нитрофенол, полихлорбифенил) в штаммах консорциума микроорганизмов «Абориген»

по направлению подготовки «06.03.01. Биология»

направленность (профиль): Генетика, геномика и синтетическая биология

Сагдеева Стелла Артемовна

Руководитель ВКР (от кафедры)
доцент, к.б.н.
_____А.А. Коханенко
подпись
«_____»_____20___ г.

Руководитель ВКР
(от профильной организации)
доцент, к.б.н.
_____Ю.А. Франк
подпись
«_____»_____20___ г.

Автор работы
студент группы № 012121
_____ С.А.Сагдеева
подпись
«_____»_____20___ г.

Томск – 2023

Аннотация

Тема магистерской диссертации: Поиск генов ферментов, участвующих в биодеградации фракций нефти (аренов и алканов) и органических загрязнителей (п-нитрофенол, полихлорбифенил) в штаммах консорциума микроорганизмов «Абориген».

Существует проблема загрязнения окружающей среды углеводородами нефти и нефтепродуктами. Добыча нефти и ее переработка превносит в среду обитания человека множество новых, часто опасных соединений. Есть множество способов ликвидации последствий такой деятельности. В частности на участках разливов нефти проводят очистку и биоремедиацию с применением препаратов лиофилизированных углеводородокисляющих микроорганизмов. Штаммы одного их таких препаратов стали объектом данной магистерской диссертации.

Данная работа направлена на поиск генов ферментов, ассоциированных с деградацией нефти и ее продуктов в штаммах B10, 2H и B1318 консорциума углевородокисляющих микроорганизмов препарата «Абориген».

В качестве материала использовались монокультуры штаммов на твердой среде. Поиск генов ферментов проводили методом ПЦР с праймерами к консервативным участкам генов алкангидроксилазы, катехол-1,2-диоксигеназы, катехол-2,3-диоксигеназы, 4-нитрофенол-монооксигеназы и бифенил-2,3-диоксигеназы.

Общий объем магистерской диссертации составляет 64 страниц, включает 7 таблиц, список используемой литературы состоит из 124 источников. Работа содержит: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Источники литературы».

В результате исследования все искомые гены обнаружены в штамме B1318, в штамме 2H обнаружены гены алкангидроксилазы, катехол-1,2-диоксигеназы, 4-нитрофенол-монооксигеназы и бифенил-2,3-диоксигеназы. В штамме B10 также обнаружены все искомые гены.

Практическая значимость исследования заключается в возможном использовании найденных последовательностей, после этапа секвенирования, для получения штамма, окисляющего большинство фракций нефти, а также в возможном расширении области применения препарата.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

1 Обзор литературы 7

1.1 Источники загрязнений почв и водоёмов 7

1.1.1 Нефть: основные фракции и их состав 7

1.1.2 Нефть как органический загрязнитель 8

1.1.3 Органические загрязнители почв и водоемов, сопутствующие деятельности человека 9

1.2 Использование потенциала микроорганизмов для очистки почв и водоёмов 10

1.2.1 Деградация алканов микроорганизмами 12

1.2.2 Деградация нафтенов микроорганизмами 15

1.2.3 Деградация аренов микроорганизмами 17

1.2.4 Деградация ПАУ микроорганизмами 23

1.2.5 Деградация фенантрена и антрацена микроорганизмами 26

1.2.6 Деградация бензпирена микроорганизмами 27

1.3 Гены ферментов, участвующих в деградации различных соединений нефти 28

1.3.1 Гены ферментов, участвующих в деградации алканов 29

1.3.2 Гены ферментов, участвующих в деградации моноароматических соединений 32

1.3.3 Гены ферментов, участвующих в деградации ПАУ 35

1.4 Применение штаммов микроорганизмов для ремедиации почвы 37

2 Материалы и методы 39

2.1 Получение образцов плазмидной ДНК 39

2.2 Получение образцов хромосомной ДНК 39

2.3 Выделение образцов хромосомной ДНК из геля 39

2.4 ПЦР-анализ штаммов на наличие генов биодеградации углеводородов нефти 40

2.5 Электрофорез образцов ДНК 40

3 Результаты и их обсуждение 41

3.1 Получение чистых фракций штаммов 41

3.2 Поиск ферментов для анализа деградации фракций нефти 42

3.3 Поиск генов ферментов, участвующих в деградации органических загрязнителей в штаммах консорциума «Абориген» 46

ВЫВОДЫ 52

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 53

ВВЕДЕНИЕ

Экологический ущерб от загрязнения почв углеводородами весьма велик – от снижения качества и продуктивности почв до вывода земель из сельскохозяйственного оборота. Создаётся опасность загрязнения подземных и поверхностных вод в результате попадания нефтепродуктов в водоносные горизонты, реки и водоёмы. Нефть и продукты ее переработки, многие из которых чрезвычайно токсичны, канцерогенны и персистентны, то есть разрушаются крайне медленно, в частности, в Сибири с ее холодным климатом. Известно, что биодеградация нефти и нефтепродуктов в почве происходит при активном участии почвенных микроорганизмов, способных использовать соединения нефти в качестве источника энергии. Тем не менее, когда концентрация загрязнителя в почве относительно высока, как происходит при разливах, естественной микрофлоре необходимо время для адаптации к ксенобиотику. Ауторемедиация нефтезагрязненных почв может длиться до 30 лет, в северных регионах период декструкции составляет 50 и более лет, а токсические свойства нефти исчезают через 10-12 лет после рекультивационных работ [Неустроев, 2015]. Чтобы ускорить время биоремедиации и/или улучшить её качество, т.е. достигнуть более низких значений остаточной концентрации загрязнителя применяют различные методы биоремедиации, в том числе микробные препараты содержащие как отдельные штаммы нефтедеструкторов, так и целые консорциумы, выделенные из естественной среды. Одним из таких препаратов является «Абориген» производства «ООО Дарвин» содержащий штаммы микроорганизмов, выделенных из природных естественных ландшафтов с застарелыми разливами на нефтяных месторождениях Ханты-Мансийского и Ямало-Ненецкого автономного округа. На базе Национального Исследовательского Томского Государственного университета и научно-производственной лаборатории компании Дарвин проведены лабораторные исследования, подтвердившие высокую эффективность биопрепарата. Однако пока неизвестно какие именно ферменты и кодирующие их гены ответственны за эту способность в штаммах консорциума «Абориген». Выделение генов, ассоциированых с деградацией различных соединений нефти и других оргнических загрязнителей может помочь в улучшении состава микробного препарата путем получения одного или двух многофункциональных генноинженерных штаммов с множественной активностью.

Целью данной магистерской диссертации является поиск генов ферментов, участвующих в биодеградации фракций нефти (аренов и алканов) и органических загрязнителей (нитрофенол, полихлорбифенил) в штаммах консорциума микроорганизмов «Абориген».

Для выполнения поставленной цели были выделены следующие задачи:

1. Наработка клеточной массы штаммов *Pseudomonas* sp. 2Н, *Bacillus subtiles* B10, *Acinetobacter calcoaceticus* B1318 консорциума «Абориген», ответственных за биодеградацию нефти для получения чистой хромосомной и плазмидной ДНК.

2. Выделение чистой хромосомной и плазмидной ДНК из штаммов конорциума «Абориген».

3. На основе литературных данных подбор оптимальных праймеров для поиска генов ферментов, участвующих в деградации аренов и алканов, а также органических загрязнителей.

4. Анализ наличия нуклеотидной последовательности ферментов участвующих в деградации аренов и алканов *CatA, NahH, AlkB* в хромосомной и плазмидной ДНК, выделенных из штаммов консорциума «Абориген» *Pseudomonas* sp. 2Н, *Bacillus subtiles* B10, *Acinetobacter calcoaceticus* B1318.

5. Анализ наличия нуклеотидной последовательности ферментов участвующих в биодеградации органических загрязнителей *NpcB, BphA4* в хромосомной и плазмидной ДНК, из штаммов консорциума «Абориген» *Pseudomonas* sp. 2Н, *Bacillus subtiles* B10, *Acinetobacter calcoaceticus* B1318.

1 Обзор литературы

1.1 Источники загрязнений почв и водоёмов

Хотя большинство организмов обладают способностью к детоксикации, т.е. к минерализации, трансформации или иммобилизации загрязняющих веществ, микроорганизмы играют решающую роль в биогеохимических циклах и в устойчивом развитии биосферы. Бактерии разработали стратегии получения энергии практически из каждого соединения с использованием кислорода или в бескислородных условиях, используя альтернативные акцепторы электронов. В то же время множество токсичных химических соединений попадает в почвы, воды и воздух городов в связи с хозяйственной деятельностью человека. Загрязнение можно разделить на промышленное и бытовое. Бытовые отходы включают мусор и сточные воды. Они достаточно опасны для водных организмов и также ухудшают состояние пресных вод, которые в дальнейшем могут исползоваться в хозяйственных или рекреационных целях. Промышленные отходы представляют большую опасность, т.к. выводятся большими объёмами, и не всегда тщательно контролируются. Любые предприятия потенциально опасны для окружающей среды т.к. являются постоянными источниками загрязнения атмосферы, воды и воздуха. Производство различных товаров или сырья чрезвычайно редко бывает безотходным в нашей стране, хотя сейчас предпринимаются попытки по созданию именно таких производств замкнутого цикла. По количеству загрязняющих веществ и масштабу негативного воздействия на окружающую среду приоритет принадлежит нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности. Ни одна из стадий нефтепользования не является безотходной, аварийные ситуации лишь усиливают и концентрируют это влияние. Потенциальными источниками загрязнения природной среды в зонах влияния предприятий нефтяной отрасли могут быть пруды-накопители сточных вод, шламоотстойники, места хранения отходов, а также многолетние скопления нефти и нефтепродуктов, образовавшиеся в результате эксплуатационных и аварийных утечек и проливов в почву [Путилина и др., 2019].

1.1.1 Нефть: основные фракции и их состав

Нефть представляет собой сложную смесь жидких углеводородов, в которых в различных количествах растворены твёрдые углеводороды, смолисто-алфальтеновые вещества и природные углеводородные и неуглеводородные газы. Как известно нефть разделяют на отдельные компоненты – фракции путём перегонки при постоянно повышающейся температуре кипения. Фракции являются смесями индивидуальных

соединений со схожей температурой кипения. Первая фракция – петролейная состоит из лёгких углеводородов, преимущественно пентанов С5 и гексанов С6. В состав бензиновой фракции нефти входят нормальные и изомерные парафиновые углеводороды С5-С11. Среди нафтеновых (циклических) углеводородов в наибольшем количестве содержатся метилциклопентан, циклогексан, метилциклогексан. Здесь содержатся также легкие ароматические углеводороды – толуол и метаксилол. Лигроиновая фракция (или тяжелая нафта) – смесь более тяжелых (С8-С14) углеводородов. В ней содержится значительно больше ароматических углеводородов (до 8%), чем в бензиновой фракции. Также в ней нафтены почти в 3 раза превышают содержание парафинов. Керосиновая фракция обычно представлена углеводородами, имеющими от 9 до 16 атомов углерода. Наряду с парафинами, моноциклическими нафтенами и углеводородами ряда бензола она содержит в своем составе бициклические нафтеновые, ароматические и нафтено-ароматические углеводороды. Дизельные фракции содержат мало ароматических углеводородов (до 25%), а нефтены в ней преобладают над парафинами. Эти фракции преимущественно состоят из производных циклопентана и циклогексана, имеют высокие цетановые числа и относительно низкие температуры застывания. Мазут – это смесь высокомолекулярных углеводородов (от 400 до 1000), нефтяных смол (молекулярная масса 500-3000 и более), асфальтенов, карбенов, карбоидов и органических соединений, содержащих различные микроэлементы – металлы и неметаллы (V, Ni, Fe, Mg, Na, Ca, Ti, Hg, Zn и другие). В состав самой тяжелой фракции – гудрона входят парафиновые углеводороды (45-95%), асфальтены (3-17%), а также нефтяные смолы (2-38%). Кроме того в гудроне сконцентрированы практически все присутствующие в нефти металлы [Плотникова, 2012).

1.1.2 Нефть как органический загрязнитель

Нефть и нефтепродукты относятся в целом к 3 классу опасности, уровень их воздействия на ОПС умеренно опасный, а период восстановления длится от 10 лет. При попадании на поверхность углеводороды подвергаются фотохимическому окислению с образованием озона, карбонильных соединений, алкилнитратов и др. [ГОСТ Р 51858-2002]. Загрязнение нефтью влияет на весь комплекс морфологических, физических, химических и биологических свойств почвы, определяющих её плодородные и экологические функции. При этом увеличивается количество водопрочных агрегатов, возрастает степень агрегации железа, усиливается оглеение, теряется способность, впитывать и удерживать влагу и др. Изменение физических свойств почвы приводит к вытеснению воздуха, нарушению поступления воды, питательных веществ, что является

главной причиной торможения развития растений и их гибели. В нефтезагрязненных почвах увеличивается отношение C:N, что приводит к ухудшению азотного режима почв и нарушению корневого питания растений. Происходит уменьшение содержания подвижных форм фосфора и калия. [Шамраев, Шорина, 2009].

1.1.3 Органические загрязнители почв и водоемов, сопутствующие деятельности человека

При сгорании нефтепродуктов получаются вещества, имеющие более высокие классы опасности 1 и 2, например бензапирен и полихлорированный бифенил. Бензапирен – ароматическое соединение, представитель полициклических углеводородов, образующееся при сгорании твердого, жидкого и газообразного (в меньшее мере) углеводородного топлива. В окружающей среде накапливается в почве, меньше в воде. Бензапирен отнесен к веществам первого класса опасности. К нему относятся вещества с чрезвычайно высоким опасным воздействием на окружающую среду, при этом изменения, вызываемые ими, необратимы. Бензапирен химически и термически устойчив, обладает свойством биоаккумуляции. Обладает канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим, гематотоксическим действием [Шелепова, Звягинцева, 2012]. При этом источники бензапирена повсюду: нефтехимические и химические предприятия, металлургические предприятия, автотранспорт, теплоэлектростанции и котельные, даже пища.

Полихлорированные бифенилы – хлорорганические ароматические соединения, относящиеся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), которые воздействуют на среду обитания человека на чрезвычайно низком уровне (10-8 – 10-13 %). Благодаря своей негорючести, химической стабильности, высокой температуре кипения и электроизоляционным свойствам ПХБ имели сотни промышленных приложений, включая электрическое, теплообменное и гидравлическое оборудование, в качестве пластификаторов в красках, пластмассах и резоноизделиях и др. Они также являются канцерогенами, тератогенами, иммунотоксикантами и способны к биоаккумуляции и географическому распростанению. В 2002 году на конференции в Стокгольме была подписана Глобальная международная конвенция о запрещении СОЗ, к которой присоединилась и Россия. Полихлорбифенилы не производятся с 1991 года, но из-за их химической инертности они до сих пор находятся почвах, в частности вблизи химических заводов [Назаров, Егорова, 2016]. В основном эти соединения использовались для изоляции в трансформаторах и конденсаторах, утилизация которых и является современными источниками проникновения ПХБ в окружающую среду. Согласно конвенции уже произведенные бифенилы необходимо обезвредить к 2028 году.

Существует два основных метода: термическое обезвреживание и регенерация. Используется также биологический метод обезвреживания.

Другими загрязнителями, поступающими в связи с хозяйственной деятельностью человека в окружающую природную среду являются пестициды. Многие из них относятся к хлорорганическим соединениям, обладающим свойствами персистентности, биоаккумуляции, магнификации и токсичности для живых организмов. Такие пестициды как ДДТ, алдрин, мирекс относят к СОЗ, и их использование запрещено в развитых странах. Тем не менее, в развивающихся странах продолжается их использование (например для борьбы с распространением малярии), а в почве до сих пор обнаруживаются их следы. Применение даже современных препаратов приводит к неизбежному переносу путем распыления, испарения, инфильтрации и стока с обработанных участков. Эти процессы потенциально приводят к загрязнению воздуха, почвы и воды используемыми в настоящее время пестицидами. Было показано, что их концентрация в обработанных сельскохозяйственных почвах превышала токсикологический порог для дождевых червей и других беспозвоночных, которые играют важную роль в поддержании структуры, функционировании и продуктивности почвы [Vašíčková, Hvězdová, 2019]. Многие пестициды, в особенности инсектициды, токсичны для водных организмов с долгосрочными последствиями.

Нитроароматические соединения используются в производстве лекарств, взрывчатых веществ и пестицидов. Из-за их потенциальной токсичности и стойкости в окружающей среде необходимо их быстрое удаление и детоксикация. п-Нитрофенол входит в число таких соединений. Он широко используется в синтезе прекурсора аспирина ацетаминофена и в производстве пестицидов, таких как паратион и метилпаратион. В окружающей среде такие пестициды гидролизуются и трансформируются в 4-нитрофенол, являющийся довольно токсичным и распространенным соединением [Kitagawa *et al*, 2004].

1.2 Использование потенциала микроорганизмов для очистки почв и водоёмов

Нефть является важной частью мировой экономики и важнейшей статьей российского экспорта. Альтернативные источники энергии пока не позволяют исключить влияние ископаемого топлива в целом и в России в частности. Другие органические загрязнители также являются неотъемлемой частью хозяйственной деятельности человека. Необходимо контролировать их поступление в окружающую среду, а также

осуществлять очистку земель и вод, загрязненных токсикантами. Среди известных методов восстановления загрязненных грунтов и водных систем наиболее безопасным для окружающей среды является биоремедиация – комплекс методов очистки окружающей среды с применением метаболического потенциала биологических объектов. Естественная способность организмов поглощать, накапливать и разлагать токсичные соединения довольно давно показала человечеству способ избавления от последствий хозяйственной деятельности в виде опасных для нас самих веществ. Успешное развитие биоремедиационных технологий для восстановления загрязненных почв началось в 1970-х гг., прежде всего, в связи с очисткой земель остающихся после нефтедобычи, аварий при транспортировке и переработке нефти и применения нефтепродуктов [Янкевич, Хадеева, 2015]. В этом процессе основными агентами являются бактерии, благодаря своей непревзойденной метаболической пластичности и неприхотливости. Тем не менее, известно, что многие дрожжи и грибы, а также водоросли также обладают способность метаболизировать углеводороды [van Beilen *et al*, 2005].

С тех пор как была обнаружена первая углеводородокисляющая бактерия известно не менее 175 родов, способных разлагать эти соединения до более простых или до углекислого газа и воды. Известны рода бактерий использующие эти непривлекательные соединения в качестве приоритетных источников углерода, так называемые «профессиональные углеводородокластические бактерии» родов *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira* и другие. Большинство же бактерий, обладающих этой активностью способны разлагать только небольшой диапазон углеводородов со сходной структурой, например алканы с определённым диапазоном длинны цепи. Индивидуальные бактериальные штаммы или рода бактерий обычно не способны разлагать все компоненты нефти из-за её сложного состава. Обычно в специфическом процессе деградации углеводородных соединений с различной структурой доминируют разные бактерии [Wang *et al*., 2016]. В одном из исследований с использованием проб морской воды бактерии родов *Thalassolituus* и *Roseobacter* доминировали в процессе деградации н-алканов, а рода *Alcanivorax* и *Cycloclasticus* в деградации полиароматических углеводородов (ПАУ). В то же время существуют такие бактерии как грамотрицательные *Pseudomonas* и грамположительные *Rhodococcus*, обнаруживающие множественную углеводородокисляющую активность [McKew et al, 2007]. Кроме того горизонтальный перенос генов играет огромную роль в адаптации микробных сообществ к ксенобиотику [Ветрова, 2009]. Тип грамотрицательных *Proteobacteria* (*Pseuomonadota*) оказывается наиболее многочисленным в загрязненных местообитаниях во многих исследованиях.

Вторым по распространенности таксоном с более высокой средней длиной прочтений в загрязненных образцах являлись *Actinobacteria*. Наиболее доминирующими родами бактерий в рассматриваемом исследовании оказались *Pseudomonas*, за которыми следуют *Serratia, Rhodococcus и Sphingobium*. Несомненно, загрязнение сказывается на разнообразии почвенных сообществ. Численность типов *Acidobacteria, Bacteroidetes, Cloroflexi* и других значительно снижалась после внесения углеводородного топлива [Bidja Abena *et al*.,2020].

1.2.1 Деградация алканов микроорганизмами

Все соединение нефти в той или иной степени подвержены микробной деградации. Легче всего подвергаются деградации алифатические углеводороды нормального строения (н-алканы) [Путилина и др., 2019]. Это также составляет проблему при добыче нефти, называемой её «старением». Наиболее изучены процессы аэробного окисления углеводородов, но известны и анаэробные процессы. В первом случае он действует как триггер в механизме активации оксигеназ (моно- и диоксигеназ), переносящих один или два атома на молекулу субстрата соответственно [Laczi *et al*, 2020]. В зависимости от длины цепи алкана требуются различные ферментные системы для введения кислорода в субстрат и инициирования биодеградации. Обозначают три категории таких систем C1-C4 (от метана до бутана, окисляемые метанмонооксигеназоподобными ферментами), C5-C16 (от пентана до гексана, окисляемые интегральными мембранными ферментами, содержащими негемовое железо или цитохромами P450), и C17+ (более длинные алканы, окисляемые малоизвестными ферментными системами). Ферменты первой группы известны у родов *Methylococcus, Methylosinus, Methylocystis, Methylomonas* и т.д. Они способны окислять короткоцепочечные алканы, в том числе галогенированные, алкены и циклоалканы. Вторая группа ферментов, *AlkB*-подобные алкангидроксилазы известны у многих родов, включая *Acinetobacter, Alcanivorax, Burkhoderia, Mycobacterium, Pseudomonas и Rhodococcus*. Представитель третьей группы ферментов диоксигеназ, позволяющей окислять C10-C30 алканы, зафиксирован на момент публикации обзора у рода *Acinetobacter*. Отдельно можно отметить эукариотические (у *Candida maltosa, Candida tropicalis и Yarrowia lypolytica*) и прокариотические (*Acinetobacter, Alcanivorax, Caulobacter, Mycobacterium, Rhodococcus, Spingomonas* и др.) цитохромы P450, активные в отношении алканов от C5 и C10 до C16, жирных кислот, циклоалканов, алкилбензолов [van Beilen *et al*, 2005]. Цитохромы P450 представляют собой гемопротеины, которые распространены во всех царствах жизни и могут быть объединены в более чем 100 семейств на основе сходства последовательности. Несколько бактериальных штаммов,

разлагающих алканы C5-C10 содержат алкангидроксилазы, принадлежащие к семейству растворимых монооксигеназ цитохрома P450. Первым охарактеризованным членом этого семейства был CYP153A1 из *Acinetobacter sp.* EB104, а сходные ферменты были обнаружены в различных штаммах микобактерий, родококков и протеобактерий. Было показано, что цитохром P450 *Mycobacterium sp.* HXN-1500 гидроксилирует алканы C6-C11 до 1-алканолов [Rojo, 2009].

Все мембраносвязанные алкангидроксилазы (pAH) содержат шесть гидрофобных участков, которые, как считается, пересекают мембрану в виде альфа-спиралей и содержат 8-9 остатков гистидина, необходимых в качестве лигандов двухядерного негемового железного центра, участвующего в катализе. Было обнаружено, что лишь одно положение аминокислоты, расположенное в середине трансмембранной спирали 2 алкангидроксилазы определяет способность гидроксилировать алканы длиннее C12 [van Beilen *et al.*, 2005]. Многие микроорганизмы содержат одновременно несколько алкангидроксилаз с перекрывающейся субстратной специфичностью, в том числе одновременно группы CYP153 (P450) и других групп [van Beilen, Funhoff, 2007].

AlkB-подобная алкангидроксилаза впервые были охарактеризованы у *Pseudomonas putida* GPo1. Было показано, что это интегральная мембранная монооксигеназа содержащая два атома негемового железа, требующая наличия двух электронотранспортных белков рубредоксина и рубредоксинредуктазы. В дальнейшем с использованием амплификации консервативных участков этого белка полученных из *Acinetobacter sp.* ADP1 (*AlkM*) и *Micobacterium tuberculosis* H37Rv подобные белки были найдены у широкого круга альфа-, бета- и грамма-протеобактерий и *Actinomycetales* [van Beilen, Funhoff, 2007]. Диапазон активности этих ферментов, выделяемых на рисунке в подгруппу pAH1, колеблется от C5-C12. Родственные им ферменты, обозначенные pAH2 активны в отношении алканов, начиная с C10. (Рис.1)

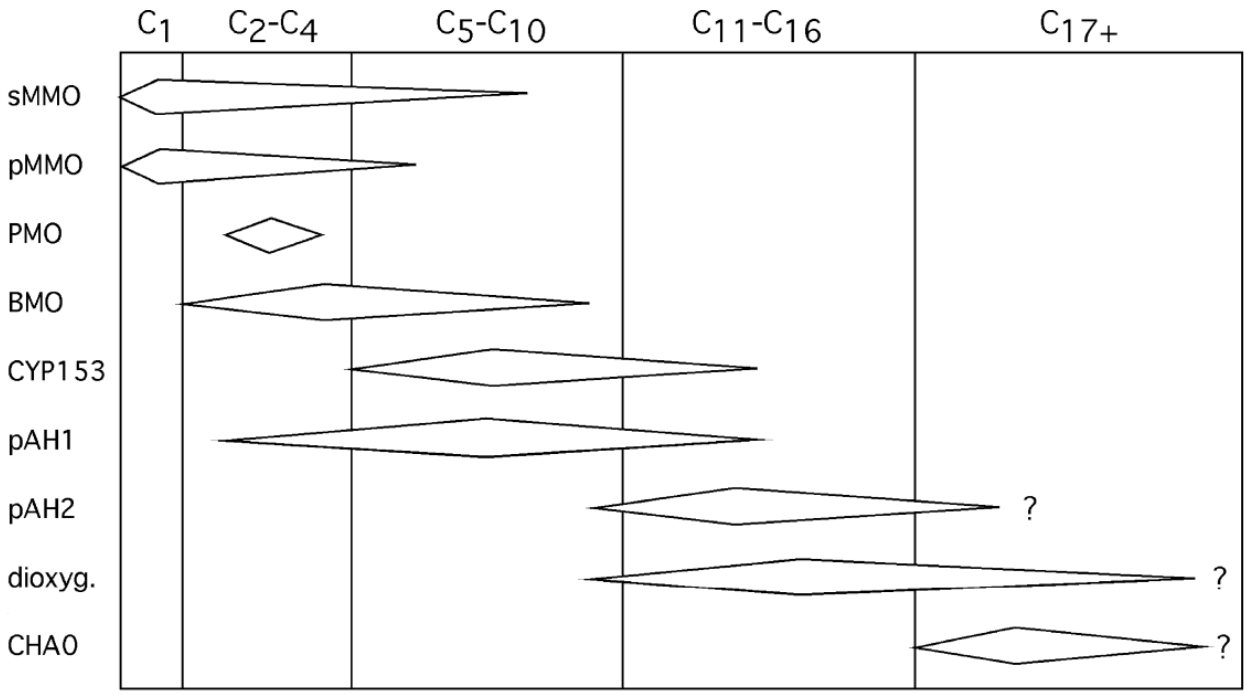


Рисунок 1 – Субстратная специфичность алкангидроксилаз различных групп. sMMO – растворимые метанмонооксигеназы (ММО), pMMO – мембранные ММО, PMO – пропанмонооксигеназы, BMO – бутанмонооксигеназы, pAH1 – интегрально-мембранные гидроксилазы алканов средней длины, pAH2 – интегрально-мембранные алкангидроксилазы длинноцепочечных алканов, dioxyg. - диоксигеназа Acinetobacter sp. M-1, CHA0 – предполагаемая алканоксигеназа *P. fluorescens* [van Beilen, Funhoff, 2007]

Окисление метана осуществляется немногочисленной группой метанотрофных бактерий, содержащих цитоплазматические и мембранные метанмонооксигеназы (ММО). Окисление приводит к образованию метанола, который затем превращается в формальдегид и далее в муравьиную кислоту, которая либо окисляется до CO_2, либо используется для биосинтеза необходимых соединений. Некоторые бактериальные штаммы могут расти на газообразных алканах C2-C4, но не на метане. *Pseudomonas butanovora* может ассимилировать алканы до C9 путём последовательного окисления концевой метильной группы с помощью фермента бутанмонооксигеназы (BMO). *Gordonia sp.* TY-5 может использовать пропан в качестве источника углерода, используя монооксигеназу с узкой специфичностью, подобную цитоплазматической метанмонооксигеназе (sMMO), которая окисляет пропан в субтерминальном положении, образуя 2-пропанол. Этот вторичный спирт затем окисляется до ацетона, который превращается в метилацетат и затем в уксусную кислоту и метанол.

В случае н-алканов, содержащих более двух атомов углерода, окисление начинается с концевой метильной группы с образованием первичного спирта, который далее окисляется до соответствующего альдегида и, наконец, превращается в жирную

кислоту, которая вступает в бета-окисление. В некоторых случаях оба конца молекулы алкана окисляются за счет ω-гидроксилирования жирных кислот по концевой метильной группе, в результате чего получается жирная ω-гидроксикислота, которая далее превращается в дикарбоновую и также подвергается бета-окислению. Сообщалось также о субтериминальном окисление н-алканов. Образующийся при этом вторичный спирт превращается в соответствующий кетон, а затем окисляется монооксигеназой Байера-Виллигера с образованием сложного эфира. Сложный эфир гидролизуется эстеразой до спирта и жирной кислоты. У некоторых организмов терминальное и субтерминальное окисление могут сосуществовать [Rojo, 2009].

Несколько бактериальных штаммов способны ассимилировать алканы длиннее двадцати атомов углерода (C20+). Эти штаммы обычно содержат несколько алкангидроксилаз. Ферменты, катализирующие такие реакции не похожи AlkB *P. putida* GPo1 или цитохром P450 *Acinetobacter sp.* EB104. Например, штамм *Acinetobacter sp.* M1, который может расти на алканах C13-C44, содержит растворимую Cu2+-зависимую алкангидроксилазу, активную в отношении алканов C10-C30. Было высказано предположение, что это диоксигеназа, которая генерирует н-алкилгидропероксиды с образованием соответствующих альдегидов [Maeng *et al.*, 1996; Tani *et al.*,2001]. Другой штамм *Acinetobacter* DSM 17874 имеет флавинсодержащую монооксигеназу, названную *AlmA*, которая окисляет C20-C32 алканы [Throne-Holst *et al.*, 2007]. Гены, гомологичные *almA* были идентифицированы в нескольких других штаммах деградирующих алканы с длинной цепью, включая *Acinetobacter sp.* M1 и *A. borkumensis* SK2. Другая длинноцепочечная алкангидроксилаза, названная *LadA* была охарактеризована у *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 [Feng *et al.*, 2007]. Она окисляет алканы C15-C36 с образованием первичных спиртов. Его структура показала, что это двухкомпонентная флавинзависимая оксигеназа, принадлежащая к семейству белков бактериальных люцифераз [Li *et al.*, 2008].

1.2.2 Деградация нафтенов микроорганизмами

Насыщенная циклическая структуры нафтенов делает их более устойчивыми по сравнению с алканами и моноароматическими соединениями. Циклогексан входит в состав нефтей, а также используется в промышленности для синтеза адипиновой кислоты и капролактама – предшественников в производстве нейлона. Он также используется в качестве растворителя, осаждающего и экстрагируещего агента в различных производствах. Разложение циклогексана бактериальными штаммами было впервые описано де Клерком и ван дер Линденом в 1974 году в процессе ко-метаболизма с

гептаном в качестве основного субстрата на штамме *Pseudomonas sp.* Сейчас известно, что некоторые штаммы способны использовать циклогексан в качестве единственного источника углерода и энергии, но потенциал биоремедиации все еще ограничен несколькими факторами, например низкой растворимостью циклогексана в воде и трудностями с образованием биопленок. Были обнаружены два различных пути деградации циклических алканов: образование лактона и ароматизация. В случае образования лактона циклогексан сначала окисляется до циклогексанола, а циклогексанол дегидрируется до циклогексанона, из которого получают ε-капролактон. ε-Капролактон далее окисляется до адипиновой кислоты и в конечном итоге до CO_2. Путь ароматизации лежит через реакцию десатурации адипиновой кислоты до 2-циклогексен-1-она, который далее превращается в фенол, а пройдя несколько стадий (рис.2) образует фуран [Yi *et al*, 2011].

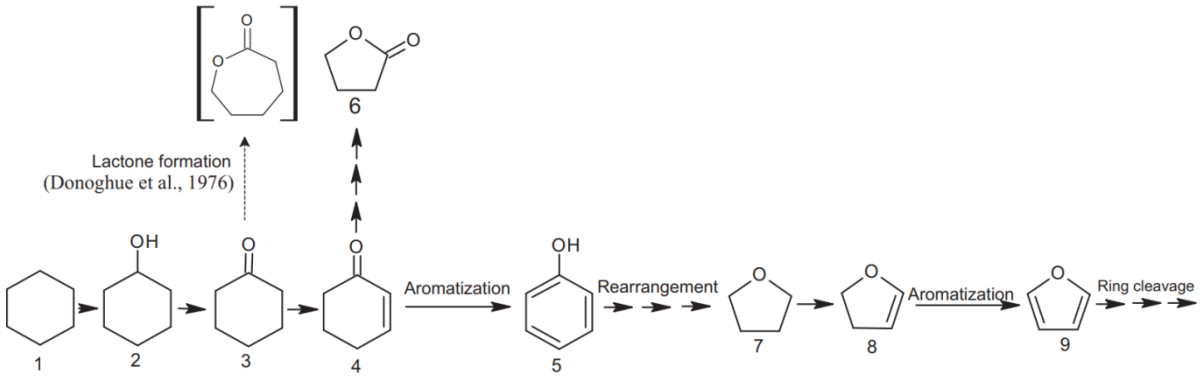


Рисунок 2 – Путь деградации циклогексана у *Rhodococcus sp* EC1. 1 – циклогексан, 2 – циклогексанол, 3 – циклогексанон, 4 – 2-циклогексен-1-он, 5 – фенол, 6 – гамма-бутиролактон, 7 – тетрагидрофуран, 8 – 2,3-гидрофуран, 9 – фуран [Yi *et al*, 2011]

Известно, что метаболизировать циклогексан способны штаммы *Acidovorax sp.*, *Chelatococcus sp.*, *Xanthobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus lentus* LP32 [Salamanca, Engesser, 2014]. Для штамма *Acinetobacter sp.* SE19 известны гены, участвующие в окислении циклогексанола через ε-картолактон. Этот кластер генов размером 14 т.п.н. содержит две алькогольдегидогеназы (*ChnA* и *ChnD*), альдегиддегидрогеназу (*ChnE*), монооксигеназу (*ChnB*), гидролазу (*ChnC*) и регулятор транскрипции (Таблица 1). Тестируемый штамм не мог расти на циклоалканах, лишь на циклических спиртах, предпочтительно шестичленных [Cheng *et al*, 2000].

Таблица 1 – Гены, продукты которых участвуют в окислении циклогексанола у *Acinetobacter sp.* SE19

Ген	Функция
ChnA	Циклогексанол→ циклогексанон
ChnB	Циклогексанон→ капролактон
ChnC	Капролактон→6-гидроксигексановая кислота
ChnD	6-гидроксигексановая кислота→6-оксигексановая кислота
ChnE	6-оксогексаеновая кислота →адипиновая кислота

Как заключают Salamanca и Engesser монооксигеназа, специфичная в отношении циклогексана, неизвестна, и гидроксилирование циклогексана, возможно, осуществляет ферментная система класса CYP (CYP450). Позднее авторы показали наличие циклогексанмонооксигеназы, превращающей циклоалканы C5-C8 в циклические спирты на том же штамме (*Acidovorax sp.* CHX100). Он в то же время не способен расти на нормальных алканах с короткой цепью, как другие штаммы, несущие CYP [Funhoff *et al*, 2006]. Найденный фермент не является частью кластера генов разложения циклогексанола и циклогексанона и представляет отдельный оперон (*CYP450chx*), состоящий из *CYP450*, ФАД-зависимой оксидоредуктазы и ферредоксина. Выравнивание последовательности *CYP450chx* показывает его близость с алканмонооксигеназами семейства CYP153 [Salamanca *et al*, 2015].

1.2.3 Деградация аренов микроорганизмами

Арены (ароматические углеводороды) содержатся в нефтях, как правило, в меньших количествах по сравнению с алканами и циклоалканами. Общее содержание этих углеводородов в различных нефтях колеблется в достаточно широких пределах, составляя в среднем 10 – 20 %. В ароматических нефтях, например, чусовской, оно может достигать 35 % и более. В бензиновых фракциях нефтей идентифицированы все возможные алкилбензолы до С9. Преобладающими аренами являются толуол, м-ксилол и псевдокумол (1,2,4-триметилбензол). В керосиновых и газойлевых фракциях кроме углеводородов бензольного ряда идентифицированы гомологи нафталина и бифенила. Нафталин содержится в нефтях в незначительных количествах, намного меньших, чем его метилпроизводные. Содержание производных бифенила в нефтях значительно меньше чем нафталиновых углеводородов. В тяжелых газойлевых, масляных и высших фракциях нефтей обнаружены также и полициклические арены, представителями которых являются фенантрен, антрацен, хризен и пирен. В тяжелых дистиллятах обнаружены

полициклические арены имеющие до семи колец. Содержание полициклических аренов в нефтях незначительно, но они наиболее стойки к деградации. Моноциклические арены по сравнению с би- и полициклическими преобладают не только в бензиновых и керосиновых фракциях, но как правило также в газойлевых и масляных фракциях. Отдельно выделяют в составе нефтей гибридные циклоалкано-арены. Они широко представлены в нефтях, особенно в высших фракциях. Простейшими представителями циклоалкано-аренов, гомологи которых присутствуют в керосиново-газойлевых фракциях, являются индан, тетралин, флуорен и аценафен. Циклоалкано-арены с одним и двумя ациклическими кольцами могут преобладать над алкилбензолами с тем же числом углеродных атомов. Среднее содержание аренов с учетом гибридных структур составляет для высокоциклических нефтей 37 %, а для высокопарафинистых всего 21 % [Проскуряков, Драпкина, 1996].

Так как ароматические соединения чрезвычайно распространены в природе, огромное число бактерий развило способность к их усвоению. Первая бактерия, разлагающая толуол и ксилол, *Bacillus hexacarbovorum,* выделена в 1908 году (Gibson, Subramanian, 1984]. В дальнейшем также было выделено большое число штаммов, в том числе принадлежащих родам *Rhodococcus, Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter, Ralstonia, Burkholderia* и др.

Реакции окисления ароматического кольца могут катализировать как монооксигеназы, так и диоксигеназы. Первые включают один атом кислорода в субстрат, в результате чего образуются моногидроксипроизводные, например, 2-гидрокситолуол. Второй атом восстанавливается до воды. Они могут катализировать вставку гидроксильной группы в орто-, мета- и пара-положении. Примерами таких ферментов являются толуол-2-монооксигеназа, толуол-3-монооксигеназа и толуол-4-монооксигеназа, салицилат-1-монооксигеназа. Диоксигеназы могут выполнять две функции: включая оба атома кислорода в молекулу субстрата, они катализируют, либо гидроксилирование кольца с образованием цис-дигидродиолов, либо его расщепление в ароматических диолах. Образовавшаяся алифатическая кислота поступает в центральный путь метаболизма (ЦТК). Гидроксилирующие диоксигеназы, как и монооксигеназы требуют НАДН или НАДФН в качестве кофактора, тогда как «расщепляющим кольцо диоксигеназам» (RHD) для катализа необходимы ионы металлов. Примерами дигидроксилирующих диоксигеназ являются бензолдиоксигеназа и толуолдиоксигеназа. Расщепляющие кольцо диоксигеназы делят на два класса в зависимости от места расщепления и соответствующих продуктов. Интрадиолдиоксигеназы расщепляют

ароматическое кольцо между двумя гидроксильными группами с образованием орто-кислот; экстрадиолдиоксигеназы катализируют расщепление в положении соседнем с одной из гидроксильных групп (мета-положении) с образованием полуальдегидов. Биохимия этих двух путей окисления ароматическим соединений оказалась общей для всех эубактерий. Основными промежуточными продуктами при этом являются ароматический мета-диол катехол или изомеры дигидроксибензойной – протокатеховая и гензитиновая кислоты. Интрадиольное расщепление катехола ферментом катехол-1,2-диоксигеназой приводит к образованию цис,цис-муконовой кислоты, которая далее метаболизируется до ацетил-КоА и сукцинил-КоА через β-кетоадипатный путь. Экстрадиоловое расщепление катехола катехол-2,3-диоксигеназой приводит к образованию 2-гидроксимуконового полуальдегида. Протокатеховая кислота подвергается расщеплению тремя различными способами: интрадиольно ферментом прокатехоат-3,4-диоксигеназой до 3-карбокси-цис,цис-муконовой кислоты, проксимально прокатехоат-4,5-диоксигеназой с образованием 2-гидрокси-5-карбоксимуконового полуальдегида или дистально прокахетоат-2,3-диоксигеназой с образованием 2-гидрокси-4-карбоксимуконового полуальдегида [Shrivastava, Phale, 2012](рис.3)

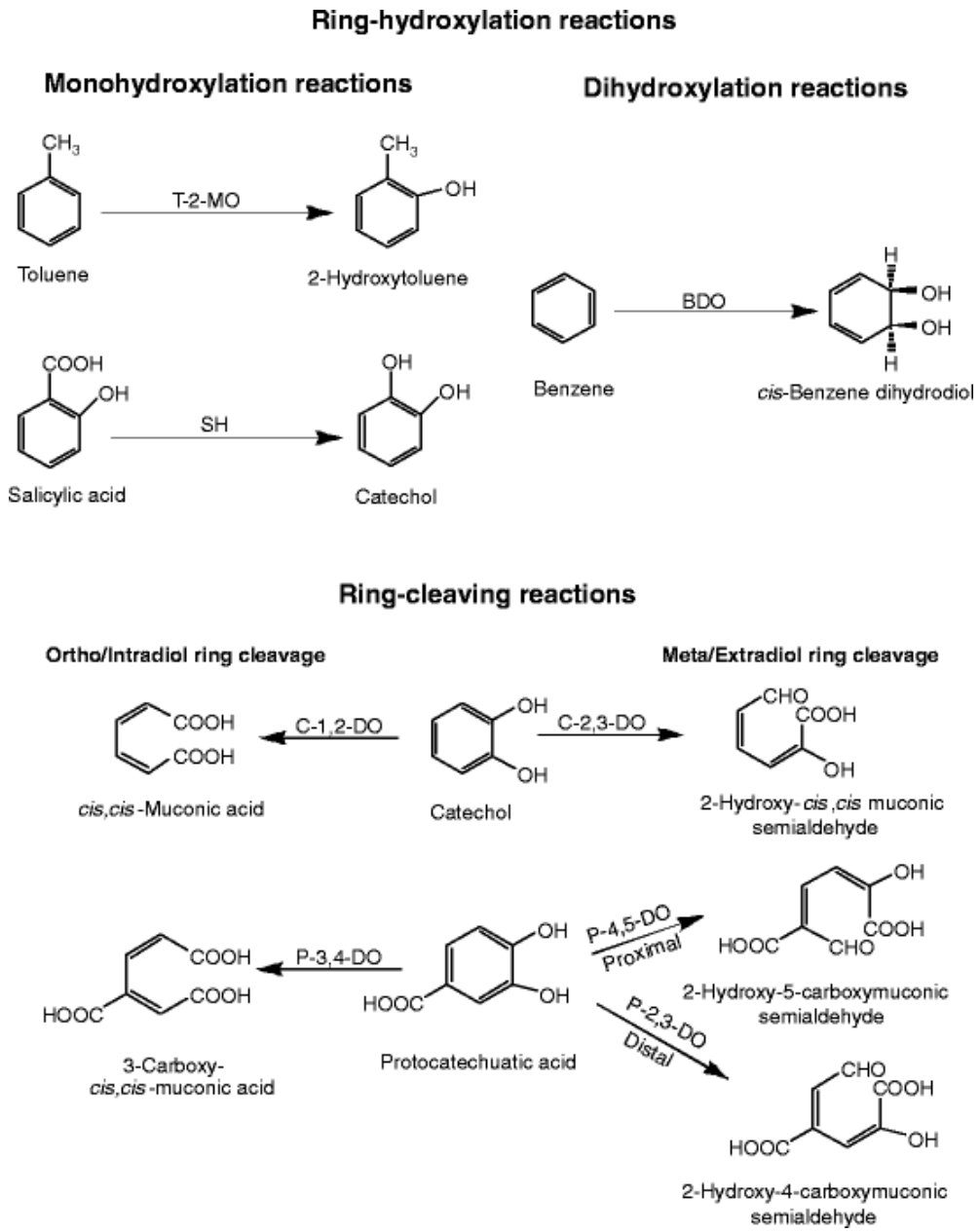


Рисунок 3 – Начальные этапы метаболизма моноароматических соединений бактериями [Shrivastava, Phale, 2012]

Ароматические соединения с гидроксильными группами в пара-положении или с карбоксильной или аминогруппой вместо второй гидроксильной группы (например, 2-аминофенол, гензитиновая кислота, 1-гидрокси-2-нафтоевая кислота, гидрохинон, салициловая кислота) подвергаются экстрадиольному расщеплению по замещенному углероду и соседнему гидроксилу [Harwood, Parales, 1996]. Гензитиновая кислота в частности превращается в малеил-ПВК [Phale *et al*, 2007].

Наличие алкильной группы в ароматическом кольце толуола предполагает два альтернативных пути его начального окисления. Окислительная атака может произойти на ароматическое кольцо с образованием алкилкатехола или сам алкильный радикал может

быть окислен до ароматической кислоты, которая в свою очередь окисляется до дигидроксилированного соединения. Всего описано пять путей окисления толуола до катехола. Один включает окисление толуола через бензиловый спирт, бензальдегид и бензоевую кислоту. Этот путь кодируется плазмидой TOL, содержащей два кластера генов [Worsey, Williams, 1975]. Оперон «верхнего пути» кодирует ферменты катализирующие образование соответствующих спирта, альдегида и кислоты; оперон «нижнего» пути, кодирует ферменты расщепления кислоты в катехол и его дальнейшего мета-расщепления ферментом катехол-2,3-диоксигеназой с образованием полуальдегидов, которые далее катаболизируются в ЦТК [Ramos *et al*.,1987]. Остальные пути окисления толуола происходят за счет гидроксилирования ароматического кольца моно- или диоксигеназами. Происходит это с помощью, например, толуол-2,3-диоксигеназы *Pseudomonas putida* F1. Фермент катализирует введение двух атомов кислорода в толуол, образуя цис-толуол-2,3-дигидродиол [Gibson *et al*,1970]. О толуолмонооксигеназах известно больше: описаны толуолмонооксигеназы, которые гидроксилируют ароматическое ядро во всех трех возможных положениях с образованием орто-, мета- и паракрезолов. К ним относятся толуол-орто-монооксигеназа *Burkholderia cepacia* G4 [Gibson *et al*,1970, Shields *et al*, 1989,1995], толуол-монооксигеназа *Pseudomonas picketti* PK01 [Olsen, *et al*, 1994] и толуол-пара-монооксигеназа *Pseudomonas mendocina* KR1 [Whiteed, Gibson, 1991]. Ксилолмонооксигеназа, кодируемая плазмидой TOL pWWO *Pseudomonas putida*, катализирует гидроксилирование метильной боковой группы толуола и ксилола. Исследования генов показали, что монооксигеназа состоит из двух разных белков, продуктов генов *xylA* и *xylM*, которые функционируют как белок-переносчик электронов и терминальная гидроксилаза соответственно [Harayama *et al*.,1989]. Дальнейшее разложение толуола также осуществляется различными организмами. Бензил-алкогольдегидрогеназа катализирует окисление бензилового спирта до бензальдегида с помощью НАД+. Бензальдегиддегидрогеназа катализирует необратимое окисление до бензойной кислоты также с помощью НАД+ [Shaw, Harayma 1990]. Бензилалкогольдегидрогеназа и бензальдегиддгидрогеназа также катализируют окисление многих замещенных ароматических спиртов и альдегидов, но не окисляют алифатические спирты и альдегиды [Shaw, Harayma 1990, Shrivastava *et al*., 2011].

Интересно, что замещенные моноароматические соединения, например, хлорбензолы и его производные, окисляются специфическими диоксигеназами до замещенных катехолов, а далее хлоркатехолы расщепляются теми же катехол-1,2- и катехол-2,3-диоксигеназами до хлормуконовой или хлоркарбонилмуконовой кислот

соответственно. Далее эти соединения превращаются в промежуточные ферменты ЦТК [Shrivastava, Phale, 2012]. Считается, что ферменты мета-пути отличаются способностью катализировать деградацию метилированных субстратов, таких как толуол и ксилол, а модифицированный орто-путь эволюционировал для метаболизма хлорированных субстратов. При этом эти модификации орто-путей кодируются плазмидами, тогда как классический бета-кетоадипатный путь почти всегда кодируется хромосомой. Способность мета-окисления хлорированных субстратов также часто кодируется плазмидами, которые сосуществуют в бактериях с хромосомными орто-путями [Harwood, Parales, 1996].

Микробная деградация нитроароматических соединений может происходить по четырем различным механизмам [Smith, 1990]: а) через образование нитрита, б) с образованием амина в) с восстановлением нитрогруппы, г) с образованием гидроксиамина. Ароматические соединения, образующиеся в результате таких реакций, далее разлагаются по общим схемам разложения гомоциклических ароматических соединений. Оксигеназы, участвующие в первом из этих путей, (2-нитрофенолдиоксигеназа, 4-нитрофенолдиоксигеназа и др.) отщепляют нитрогруппу субстрата. 2-Нитрофенолдиоксигеназа имеет широкую субстратную специфичность, катализирую реакции с некоторыми алкил- и галоген-замещенными замещенными 2-нитрофенолами. Этот же фермент участвует в превращении 2-нитрофенола в катехол и нитрит [Zeyer *et al*, 1986]. В отличие от вышеписаннного пути, некоторые микроорганизмы превращают нитроароматические соединения в нитрокатехолы, а нитрогруппа удаляется потом [Raymond, Alexander, 1971; Haigler, Spain,1993]. Путь деградации нитроароматических соединений у других организмов проходит через восстановление нитрогруппы до нитрозогруппы или гидроксиаминогруппы. Последующее окисление приводит к образованию аммония и катехола. Т.к. промежуточные аминоароматические соединения не выявлены до конца, считается что некоторые бактерии не способны до конца их метаболизировать и после восстановления нитрогруппы используют высвобожденный аммоний в качестве источника азота [Zeyer, Kearney, 1984; Boopathy, Kulpa, 1992]. Третий путь включает полное восстановление нитрогруппы до нитрита с образованием комплекса Мейзенгеймера [Lenke, Knackmuss,1992]. Некоторые нитроароматические соединения, такие как 4- или 2-нитробензойная кислота, часто метаболизируются с образованием гидроксиламина. Конечным продуктом при этом является амммиак [Groenewegen *et al.*, 1992]. В дополнение к четырем описанным путям окисления нитроароматических соединений, у

некоторых бактерий таких как *Alcaligenes eutrophus* и *Pseudomonas sp.* [Ecker *et al*.1992; Haigler, Spain 1993] метаболизм нитроароматических соединений кроме удаления нитрогрупп включает присоединение двух гидроксильных групп к ароматическому кольцу.

Выделяют всего два основных пути окисления 4-нитрофенола. Путь деградации, при котором 4-NP превращается в малеилацетат через гидрохинон (гидрохиноновый путь) (рис. 4, вверху), был преимущественно обнаружен у грамотрицательных бактерий, таких как *Burkholderia spp*. и *Moraxella spp*. Путь деградации, при котором 4-нитрофенол превращается через 4-нитрокатехол и гидроксихинол (гидроксихиноловый путь) (рис. 4 , внизу), был преимущественно обнаружен у грамположительных бактерии, такие как виды *Bacillus* и бактерии рода *Arthrobacter*. Обнаружено что у Rhodococcus opacus SAO101 гены *npc*, отвечающие за деградацию 4-нитрофенола через нитрокатехол, были закодированы в хромосомной ДНК [Kitagawa *et al*, 2004].

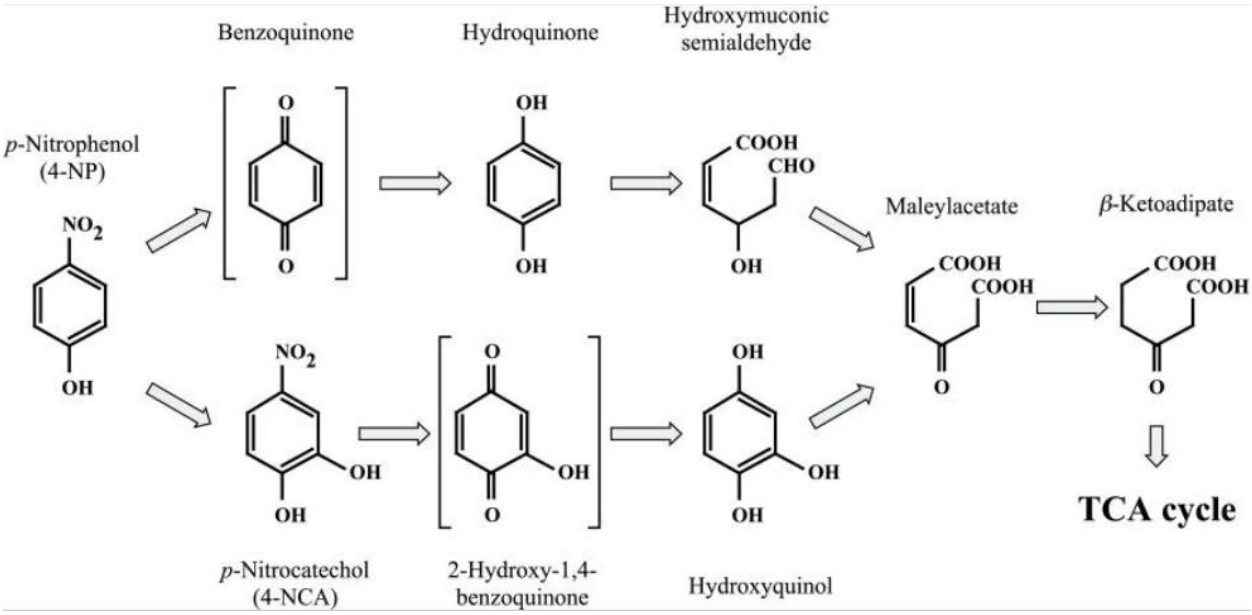


Рисунок 4 – Пути окисления 4-нитрофенола [Kitagawa *et al*, 2004]

1.2.4 Деградация ПАУ микроорганизмами

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – это соединения с двумя и более конденсированными бензольными кольцами, в линейной, угловой или кластерной структуре. Нахождение ПАУ в окружающей среде вызывает большое беспокойство в связи с их эффектами на живые организмы и высокой стабильностью к деградации. По происхождению ПАУ можно разделить на петрогенные, пирогенные и биогенные. Петрогенные ПАУ попадают в окружающую среду из нефти и нефтепродуктов, при этом

часто они имеют дополнительный алкильный радикал. Пирогеннные ПАУ образуются в результате процессов горения и состоят преимущественно из незамещенных ПАУ. Биогенные ароматические соединения – ароматические аминокислоты, лигнин и его производные чаще всего имеют растительное происхождение. Основными источниками полиароматических загрязнителей являются неполное сгорание органических материалов, газодобыча, деревообрабатывающие предприятия и сжигание отходов [Seo *et al*,2009].

Нафталин – простейшее полиароматическое соединение, которое часто используется в качестве модельного для изучения способности бактерий разлагать ПАУ [Goyal, Zylstra, 1997]. Многие бактерии способны использовать нафталин в качестве единственного источника углерода, в том числе рода *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Polaromonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* и *Streptomyces* [Seo *et al*,2009]. Деградация нафталина начинается за счет атаки многокомпонентного фермента нафталиндиоксигеназы на ароматическое кольцо с образованием цис-нафталиндигидродиола [Goyal, Zylstra, 1997; Simon *et al*, 1993]. Далее цис-нафталиндигидродиол под действием дигидродиолдегидрогеназы дегидрируется до 1,2-дигидроксинафталина [Goyal, Zylstra, 1997; Auger, Jacobson, 1995]. 1,2 – Дигидроксинафталин метаболизируется до салицилата через 2-гидрокси-2Н-хромен-2-карбоновую кислоту, цис-о-гидроксибензальпируват и 2-гидроксибензальдегид [Goyal, Zylstra, 1997; Kiyohara *et al* 1994; Baboshin *et al*, 2007;Denome *et al* 1993]. Получившийся салицилат обычно декарбоксилируется ферментом салицилат-1-гидроксилазой до катехола, который далее расщепляется по мета- или орто-пути.(Рис. 5).

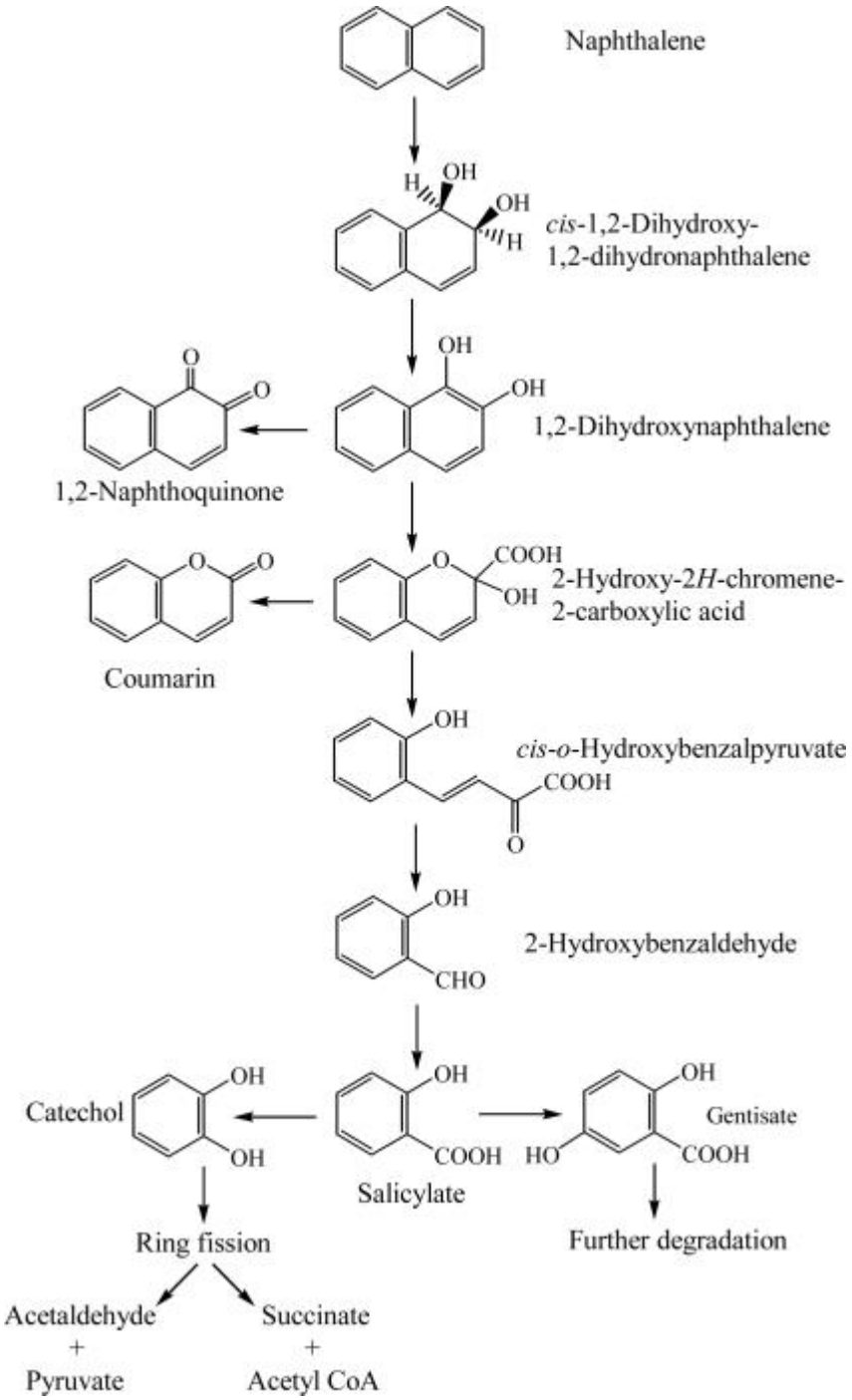


Рисунок 5 – Путь окисления нафталина бактериями [Seo, Keum, 2009]

Салицилат также может быть превращен в гензитат с помощью фермента салицилат-5-гидроксилазы. [Fuenmayor *et al*, 1998]

1.2.5 Деградация фенантрена и антрацена микроорганизмами

Бактериальный метаболизм фенантрена начинается с двойного гидроксилирования кольца фенантрендиоксигеназой до 3,4-дигидроксифенантрена, который впоследствии превращается в 1-гидрокси-2-нафтоевую кислоту. В зависимости от штамма, 1-гидрокси-2-нафтоевая кислота метаболизируется по одному из трех различных путей: (1) фталатный путь – ароматическое кольцо 1-гидрокси-2-нафтоевой кислоты расщепляется диоксигеназой до 2-карбоксибензальдегид, который далее метаболизируется через орто-фталат и прокатеховую кислоту в интерметиаты ЦТК; (2) 1,2-дигидроксигафталиновый путь через салициловый альдегид и салициловую кислоту до гентизитовой кислоты либо катехола и далее в интермедиаты ЦТК; (3) образование 1-гидрокси-2-нафтоевой кислоты, превращение ее в 1-нафтол под действием декарбоксилазы, который далее превращается в салицилат или орто-фталат.

У *Pseudomonas putida* OUS82 катализ разложения фенантрен происходил с помощью тех же ферментов, что деградируют нафталин [Kiyohara *et al*, 1994]. Та же ферментная система осуществляла разложение антрацена до 2-гидрокси-3 нафтоевой кислоты. Салицилатгидроксилаза *P.putida* BS202-P1 катализировала превращение 1-гидрокси-2-нафтоевой кислоты в 1,2-дигидроксинафталин [Balashova *et al*, 2001]. Это говорит о том, что некоторые ферменты, участвующие в разложении нафталина могут быть активны в отношении фенантрена.

Путь разложения антрацена аналогичен фенантрену и нафталину. *P. aeruginosa* разлагает антрацен через цис-1,2-дигидродиол-1,2-дигидроксиантрацен, 3-гидрокси-2-нафтоевую кислоту и 2,3-дигидроксинафталин до салицилата или катехола [Williams, Sayers, 1994]. Кроме того, *Mycobacterium sp.* LB501T превращает антрацен через орто-фталат [van Herwijnen *et al*, 2003]. *Rhodococcus* и штамм *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 превращают 1,2-дигидроксинафталин в орто-положении до 3-(2-карбоксивинил)нафталин-2-карбоновой кислоты[Moody *et al*, 2001; Dean-Ross *et al*, 2001].

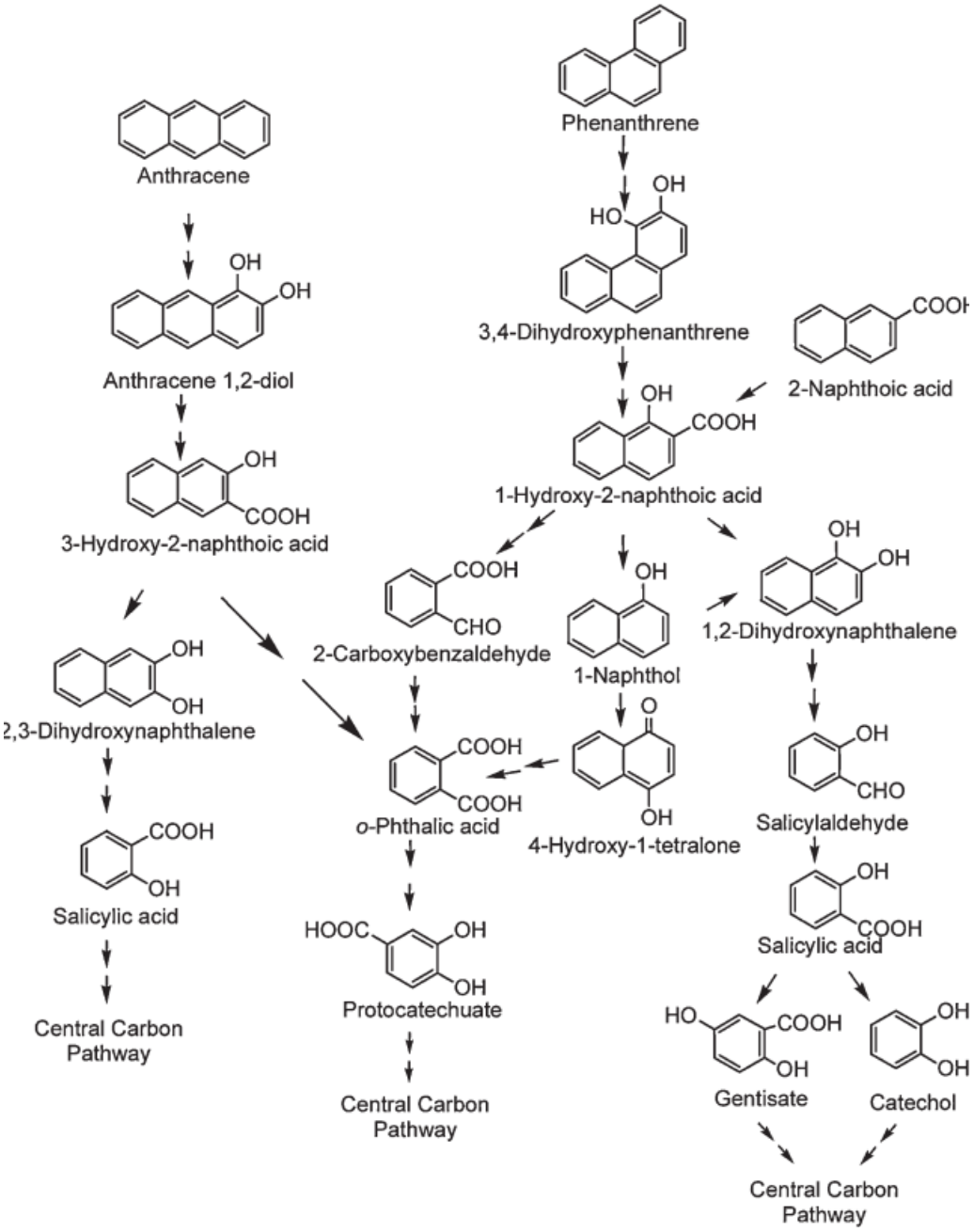


Рисунок 6 – Пути деградации фенантрена и антрацена у бактерий [Phale, *et al*, 2007]

1.2.6 Деградация бензпирена микроорганизмами

Хотя раньше считалось, что бактерии неспособны к окислению высокомолекулярных ПАУ, в последнее время приводятся доказательства, что это возможно [Kaushish Lily *et al*., 2009; Sowada *et al*., 2014]. Хорошо известно также, что бактерии могут кометаболизировать бензпирен при добавлении в среду салицилата, сукцината и др. нихкомолекулярных содинений. Эти добавки необходимы в качестве источника углерода и энергии, а также для индукции ферментов, расщепляющих ПАУ [Rentz *et al*., 2009]. Таким образом, некоторые бактерии способны минерализовать

бензпирен до CO2, но не в чистом виде, а при добавлении индуцирующих процесс метаболитов.

Известно, что некоторые метаболиты БаП обладают канцерогенными свойствами, поскольку он может окисляться до эпоксидов и дигидродиолов под действием монооксигеназы в метаболизме грибов [Ostrem Loss, and Yu, 2018]. Некоторые мицелиальные грибы, базидиомицеты, грибы белой гнили и дейтеромицеты удаляют ПАУ более компетентно, чем бактерии. ПАУ, подверженные грибковому биоразложению, включают нафталин, фенантрен, антрацен, пирен, бенз(а)пирен, флуорен, дибензотиофен, катехол, бензантрацен, бензоперилен, хризен, бензо(b)флуорантен и бензо(k)флуорантен [Peng *et al*, 2008]. По крайней мере, два механизма окисления ПАУ грибами известно: это система цитохрома P-450 [Yadav *et al*., 2006] и система катаболизма лигнина, в том числе лигнин пероксидаза, марганцевая пероксидаза [Steffen *et al*., 2003] и лакказы [Gianfreda *et al*., 1999].

1.3 Гены ферментов, участвующих в деградации различных соединений нефти

Гены катаболизма различных источников углерода у бактерий обычно организованы в опероны или кластеры. Эти кластеры кодируют ферменты деградации, транспортные гены, регулирующие поступление соединения в клетку, один или несколько регуляторных генов, отвечающих за общую экспрессию этих генов. Кластеры катаболических генов часто присутствуют на плазмидах, что облегчает адаптацию к различным средам и источникам углерода благодаря процессу горизонтального переноса генов. Даже если гены деградации закодированы в хромосомной ДНК, они часто окружены мобильными генетическими элементами или расположены внутри крупных транспозонов [Top *et al*, 2002; van der Meer *et al*, 1992]. Эти мобильные элементы могут способствовать перестройке не только внутри генома, но и между организмами за счет ассоциации с плазмидами, например. При этом перенос плазмиды и транспозиции могут способствовать метаболической адаптации, как по отдельности, так и одновременно, т.к. многие плазмидные пути разложения, такие как TOL, фланкированы инсерционными последовательностями (IS) или находятся внутри мобильных элементов [George, 2011]. Некоторые плазмиды способны к ретротранспозиции или захвату кодируемых хромосомами катаболических генов [Ronchel *et al*., 2000]. Плазмидный перенос в сочетании с внутригеномными перестройками создает огромный генетический потенциал метаболической адаптации. К элементам способным к горизонтальному переносу относятся не только плазмиды, но также некоторые транспозоны и так называемые

«геномные острова». Термин «геномные острова» был предложен для мобильных участков ДНК, несущих гены интеграции и конъюгации вместе с генами катаболизма [van der Meer, Sentchilo 2003]. Они могут отсутствать у близкородственных штаммов, а их GC-состав часто отличается от остального генома. Часто они встраиваются сразу после гена тРНК, а также 16-20 п.н. на 3`-конце этого гена представлены прямым повтором. Геномный острова содержат ген интегразы на одном конце, что указывает на то, что в какой-то момент своей эволюции они представляли собой мобильный элемент. Они часто утрачивают эту функцию и становятся частью генома. Геномные острова, которые сохранили способность передаваться в процессе конъюгации называют ICEs – интегративными конъюгативными элементами [Ronson *et al*, 2013]. Примером такого элемента является *clc Pseudomonas sp.* B13, несущий кластер генов *clcRABD*. Эти гены участвуют в минерализации 3-хлорбензойной кислоты и хлоркатехинов через орто-расщепление кольца. *Clc*-элемент найден и у других бактерий, у многих из которых он интегрируется в гены тРНК с помощью интегразы типа P4. Описаны также геномные острова, похожие на *clc*, но несущие другие катаболические гены, для деградации бифенила (*bph*) [van der Meer, Sentchilo 2003].

1.3.1 Гены ферментов, участвующих в деградации алканов

Самой изученным путем деградации алканов являеются гены кодируемые плазмидой *OCT Pseudomonas putida (oleovorans)* GPo1 [Baptist *et al*, 1963; van Beilen *et al*, 2001]. Этот путь состоит из негемовой мембранной монооксигеназы *AlkB*, гидролизующей субстрат в терминальной позиции, электронотранспортного белка рубредоксина (*AlkG*) и рубредоксин редуктазы (*AlkT*). Активный сайт монооксигеназы *AlkB* содержит четыре гистидиновых остатка, связывающих два атома железа. Ферментные системы гомологичные генам *alk Pseudomonas putida* GPo1, были обнаружены у нескольких видов бактерий [Smits *et al*., 2002 г.; Vomberg, Klinner, 2000], и было показано, что гомологи *AlkB*, обычно называемые *AlkB* или *alkM*, иногда встречаются в виде двух или более паралогов в пределах одного и того же штамма. Например, A. borkumensis несет два гомолога *AlkB, AlkB1* и *AlkB2*, которые играют роль в деградации C6 до C12 н-алканы [Hara *et al*., 2004]. Как правило в геноме обнаруживается только один ген AlkB, но существует несколько грамположительных и грамотрицательных родов, представители которых имеют две или более копий гена AlkB, например род Rhodococcus [Whyte *et al*., 2002] и Acinetobacter [Tani *et al*., 2001].

На сегодняшний день известно более 60 гомологов AlkB. Они обнаружены как у грамположительных, так и у грамотрицательных микроорганизмов и демонстрируют

большое разнообразие последовательностей. Организация генов, участвующих в окислении алканов значительно различается у разных бактерий. Гены деградации алканов, кодируемые плазмидой ОСТ *Pseudomonas putida* GPO1, сгруппированы в два оперона, и этот путь явно был передан горизонтально многим бактериям. Однако сцепление было утрачено в разной степени у разных штаммов. Во многих случаях ген, кодирующий алкангидроксилазу, картируется отдельно от генов вспомогательных белков – рубредоксина и рубредоксинредуктазы, как и гены, кодирующие алкоголь- и альдегиддегидрогеназы. Когда несколько алкангидроксилаз сосуществуют в одном штамме, они обычно располагаются на разных участках хромосомы. Более того регуляторные гены могут картироваться как рядом, так и вдали от генов, которые они регулируют. Следовательно, степень кластеризации генов деградации алканов бактериальных штаммов сильно различается [Rojo, 2009].

У *Pseudomonas oleovorans*, которые могут расти на алканах со средней длиной цепи в диапазоне от гексана до додекана путь окисления алканов лежит через гены *alk*, кодирующие превращение алканов в ацилкофермент А (ацил-КоА), расположены в двух разных областях плазмиды ОСТ. Гены *AlkBFGHJKL* котранскрибируются с промотора *alk* и кодируют алкангидроксилазу, два рубредоксина, альдегиддегидрогеназу, алкогольдегидрогеназу, ацил-КоА-синтетазу и белок наружной мембраны, функция которого неизвестна. Другая область содержит *alkS* и *alkT*, которые кодируют LuxR-UhpA-подобный регулятор экспрессии оперона *alk* и рубредоксинредуктазу. Особый интерес представляет начальное окисление инертных алканов, катализируемое трехкомпонентным алканмонооксигеназным комплексом *P. oleovorans*, который состоит из алкангидроксилазы, рубредоксина и рубредоксинредуктазы и приводит к первичному спирту [Young *et al*, 2006].

У *Acinetobacter spp*. обнаружено несколько путей окисления алканов. Биохимические данные предполагают, что цитохром P-450 является терминальной гидроксилазой в некоторых штаммах *Acinetobacter*, которые растут на алканах со средней и длинной цепью [McKew *et al*, 2007]. Также был описан окисляющий алканы фермент с предполагаемой диоксигеназной активностью, участвующий в деградации длинноцепочечных алканов. Генетическая организация штамма *Acinetobacter sp.* ADP1 оказалась совершенно другой. Гены *Alk* не были сгруппированы в большие опероны и не локализовались на плазмиде. *AlkM* представляет собой отдельный ген, ориентация которого противоположна ориентации *AlkR*. Оба гена расположены на хромосоме

примерно в 369 т.п.н. от генов *rubA* и *rubB*, которые кодируют рубредоксин и рубредоксинредуктазу соответственно [Ratajczak *et al*, 1998].

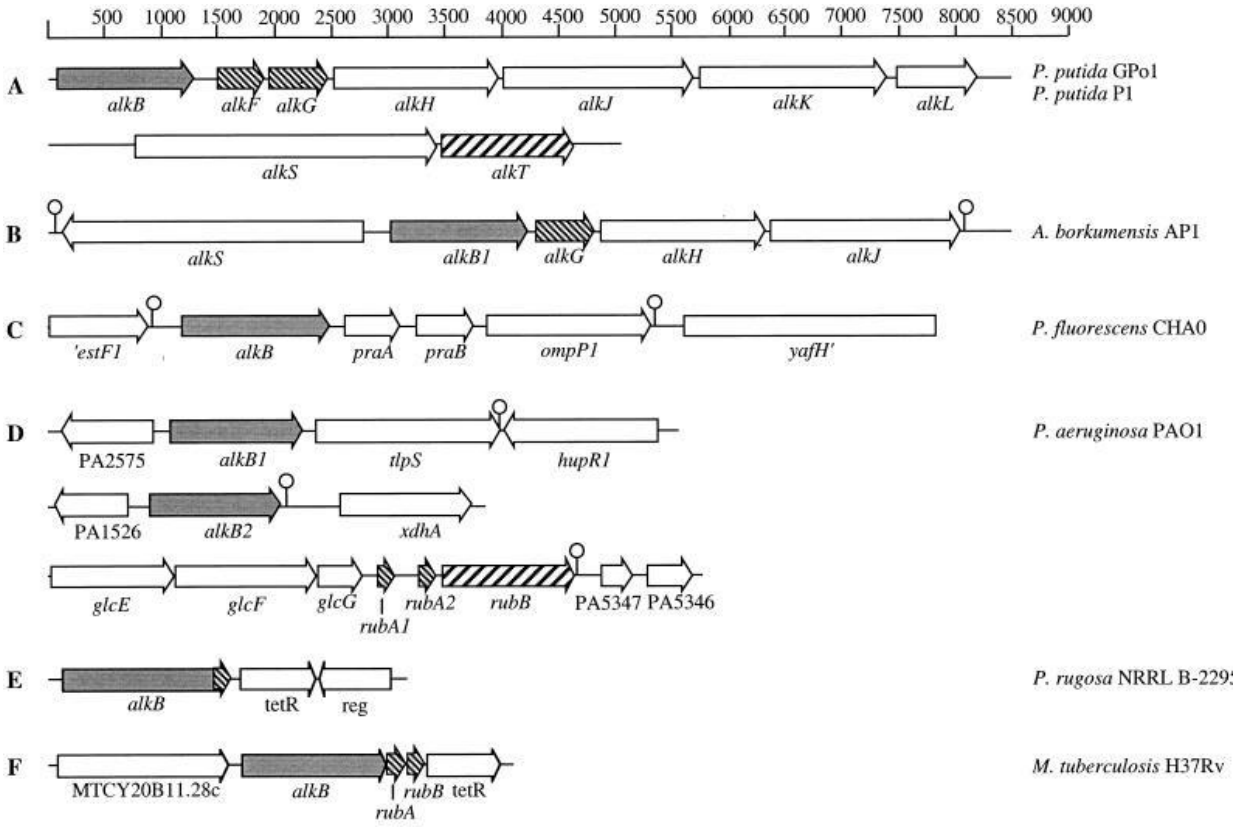


Рисунок 7 – Организация генов *Alk* различных бактерий [Smits *et al*., 2002]

Прокопио с соавторами [Procópio *et al*., 2013] исследовали алкандеградирующий штамм *Dietzia cinnamea* P4, выделенный из почвы в Бразилии, и показали, что алкан-1-монооксигеназа объединена в штамме P4 с рубредоксином в единый белок. Подобную организацию наблюдали и у других алкандеградирующих штаммов *Dietzia*. Было выявлено, что этот слитый белок, называемый *AlkW*, участвует в деградации алканов с длиной цепи больше C14 [Nie *et al*., 2011].

Маршант с соавторами [Marchant *et al*., 2006] показали, что гены *AlkB* являются достаточно консервативными. Авторы исследовали деструкцию гексадекана термофильным штаммом *Geobacillus thermoleovorans* T70 и выявили, что ампликон гена *AlkB* штамма T70 имел 96% сходства с последовательностью *AlkB Rhodococcus erythropolis* и 95% сходства с *AlkB Rhodococcus sp*. Q15.

Интегрально-мембранные алкангидроксилазы (*AlkB*; EC 1.14.15.3), которые ответственны за гидроксилирование алканов средней длины цепи (C10-C16), являются

наиболее распространенными генами, которые использовались для описания состава сообществ, разлагающих алканы, и расчета количества разлагающих нефть бактерии в различных средах [Smith *et al*., 2013; Nie *et al*., 2014]. Хотя последовательности *AlkB* могут быть весьма расходящимися, они имеют общий консервативный фрагмент, который позволяет создавать праймеры, применимые для амплификации филогенетически отдаленных алкангидроксилаз. При сравнении кластеризации с маркером по 16S рРНК можно предположить горизонтальный перенос катаболических генов [Viggor *et al*., 2015].

1.3.2 Гены ферментов, участвующих в деградации моноароматических соединений

Расщепление ароматического кольца катализируется диоксигеназами двух больших групп по экстрадиольному и интрадиольному механизмам. Интрадиоловые оксигеназы, описанные до сих пор относятся к одному семейству, тогда так экстрадиоловые оксигеназы образуют по крайней мере три различных семейства. Интрадиольное расщепление ароматического кольца ведет к появлению промежуточного продукта β-кетоадипата на одноименном пути окисления. β–Кетоадипатный путь (орто-путь) – это хромосомно кодируемый конвергентный путь деградации ароматических соединений, названный по основному промежуточному соединению, который широко распространен в почвенных бактериях и грибах. Одна ветвь этого пути преобразует прокахетовую кислоту – промежуточный продукт катаболизма фенольных соединений, включая п-крезол, 4-гидроксибензойную кислоту, и мономеры лигнина в β-кетоадипат. Другая его ветвь преобразует катехол – продукт катаболизма различных ароматических углеводородов, аминоароматических соединений и мономеров лигнина так же в β-кетоадипат. Двумя дополнительными стадиями осуществляется превращение β-кетоадипата в промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот. Исследования ферментов и данные о последовательностях аминокислот указывают на то, что этот путь высоко консервативен у различных бактерий, включая *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus erythropolis* и многих других. Катехольная ветвь β-кетоадипатного пути, по-видимому, является предшественником переносимых плазмидами ортопутей деградации хлоркатехола [Harwood, Parales, 1996]. Катехол-1,2-диоксигеназы, связанные с β-кетоадипатным путем (кодируются *catA*), часто называют ферментами типа I, чтобы отличить их от катехол-1,2-диоксигеназ типа II, которые катализируют расщепление хлорированных катехолов и, таким образом, инициируют деградацию с помощью модифицированных путей орто-расщепления. Тип I и тип II C1,2Os имеют общую идентичность аминокислотной последовательности на 25-

35% и демонстрируют высокую степень сохранения последовательности в предполагаемой области активного сайта [Nakai, 1995]. Известно, что некоторые бактерии содержат несколько копий *catA*. *Acinetobacter Iwoffii* имеет две копии гена *catA* и одну копию *pcaGH*, расположенных на хромосоме. Штамм K24 может ассимилировать несколько моноароматических соединений и индуцировать отдельные диоксигеназы в разных условиях культивирования: две катехол-1,2-диоксигеназ (*catA1* и *catA2*) индуцируются в среде с анилином, прокахетоат-3,4-диоксигеназа (*pcaGH*) индуцируется в среде с п-гидроксибензойной кислотой и гензитат-1,2-диоксигеназа индуцируется в среде с салициловой кислотой. У него идентифицирована также третья катехол-1,2-диоксигеназа (*catA3*) которая экспрессируется независимо, что означается возможность наличия сразу трех катехоловых ветвей бета-кетоадипатного пути у *Acinetobacter*. Индукция трех различных ветвей катаболизма катехола в различных средах обнаружена также у *Pseudomonas sp*. K82. Анализ последовательностей показал, что гены *A.Iwoffii* гомологичны генам катехоловой ветви пути таксономически далеких бактерий, что позволяет предполагать, что они не имеют общего происхождения, а произошли от разных предковых генов [Young *et al*., 2007].

Хотя основные ферментативные активности сохраняются β-кетоадипатный путь проявляет множество изменений в различных группах бактерий в отношении распределения ферментов (изоферменты, точки схождения разветвлений), регуляции (индуцирующие метаболиты, регуляторные белки) и организации генов. Различия также очевидны в реакциях различных бактерий на ароматические соединения, связанные с β-кетоадипатным путем. Такое разнообразие, сформировано предположительно для оптимального соответствия разнообразному образу жизни бактерий [Harwood, Parales, 1996].

Деградация катехолов у *Pseudomonas* широко изучена. Они содержат кластер генов *catRBCA*, где *catR*-регулятор типа LysR, *catA* – катехол-1,2-диоксигеназа, образующая муконовую кислоту, *catB* кодирует циклоизомеразу, катализурующую образование муколактона и *catC*, муколактонизомеразу, катализирующую образование енол-лактона, который является общим продуктом деградации как катехола и прокахетовой кислоты, и гидролизуется енол-лактон-гидролазой, локализующейся обычно отдельно от *cat*-оперона [Kim *et al*., 2004]. Анализ генома *P.putida* KT2440 предсказал существование четырех путей биодеградации ароматических соединений в его организме: деградации прокахетовой кислоты (гены *pca*), катехола (гены *cat*) – разветвления бета-кетоадипатного пути, гены расщепления гентизиновой кислоты и фенилацетата (гены *pha*). Эти данные

были подтверждены при анализе протеома KT2440 [Kim *et al*, 2006]. Авторы сообщают о единственных копиях генов бета-кетоадипатного пути *Acinetobacter calcoaceticus* и *Pseudomonas putida* [Young *et al*, 2006; Barbe *et al*, 2004]. Все гены β-кетоадипатного пути *P. putida* и *A. calcoaceticus* были клонированы и секвенированы. Сравнение ферментов кетоадипатного пути этих двух организмов показывает идентичность аминокислотных последовательностей в диапазоне от 45 до 68%, что является признаком того, что пути β-кетоадипата у *P. putida и A. calcoaceticus* происходят от общего предка. Сравнение выбранных последовательностей ферментов других организмов, наряду с энзимологическими данными других видов, распространяет этот вывод на эубактерии в целом. *CatB* и *CatC* из грамположительного организма *R. erythropolis* имеют 39% и 49% аминокислотную идентичность со своими аналогами из *P. putida.* [Harwood, Parales, 1996]. Гомология гена, кодирующего Cat-1,2-DO из *R. opacus* 1CP, присутствующего в хромосомном *cat*-опероне (GenBank X99622), с генами, кодирующими аналогичные ферменты других грамположительных бактерий, варьирует от 73% до 99% среди 43 присутствующих последовательностей. Гомология между катехол-1,2-диоксигеназами грамположительных и грамотрицательных бактерий значительно ниже. Так, выделенная аминокислотная последовательность гена, кодирующего Cat-1,2-DO *cat*-оперона хромосомы *R. opacus* 1CP имеет 32-38% сходства с Cat-1,2-DO хромосомы *Pseudomonas knackmussii* B13. То же самое можно сказать и о многих других ферментах, опосредующих биодеградацию поллютантов. На основании представленных данных авторы делают вывод, что соответствующие гены грамположительных и грамотрицательных бактерий, имеющих в группе общего предка, имели независимое происхождение в ходе конвергентной эволюции [Solyanikova *et al*., 2016] .

Acinetobacter ADP1 тесно связан с *Pseudomonas putida* согласно филогенетическому анализу, но их хромосомы различаются по размеру: хромосома ADP1 составляет менее 60% хромосомы Pseudomonas. Гены утилизации различных соединений составляют в геноме ADP1 «архипелаг катаболического разнообразия, занимающий четверть его генома. У *Pseudomonas*, напротив, кластеры катаболических генов распределены по всей хромосоме. Возможным фактором, способствующим группированию отдельно регулируемых генов, является склонность ДНК в этом квадранте к частым и обширным тандемным дупликациям. Отличительной чертой *Acinetobacter* ADP1 является то, что он не имеет гена пируваткиназы, катализирующей конечную стадию превращения углеводов в пируват, и использует путь Энтнера–Дудорова окисления глюкозы.

Гены катаболизма ароматических соединений через катехол штамма *Acinetobacter* ADP1 находятся в кластере *sal-are-ben-cat*, расположенных между генами катаболизма ваниллата (*van)* и кластером *dca-pca-qui-pob-hca*. По сравнению *Pseudomonas putida* только кластер IV (катаболизм малоната) уникален для *Acinetobacter* ADP1, большинство же кластеров катаболизма имеется в геномах обоих штаммов. Неидентифицированные гены внутри кластеров III и IV также имеются только у *Acinetobacter* ADP1. Гены *catIJF* и *pcalJF*, разделенные 263 п.н. имеют содержание G+C значительно выше, чем другие гены ADP1, что свидетельствует о горизонтальном переносе. [Barbe *et al*, 2004]

1.3.3 Гены ферментов, участвующих в деградации ПАУ

Деградация полиароматических углеводородов также происходит через известные интермедиаты – салицилат и катехол, а также гентизиновую кислоту, но с помощью специфических диоксигеназ. Гены, отвечающие за разложение ПАУ можно разделить на две категории: *nah*-подобные гены *Pseudomonas sp.* и не похожие на них (non-*nah*), происходящие от других бактерий [Habe, Omori, 2003].

Почти все гены *nah* происходят от *Pseudomonas spp.* Разложение нафталина штаммом *Pseudomonas putida* G7 хорошо изучено [Lloyd-Jones *et al.* 1999]. Эти катаболические гены организованы в три оперона на плазмиде NAH7 длиной 83 т.п.н. Первый оперон кодирует ферменты «верхнего пути», участвующие в превращении нафталина в салицилат, в то время как второй кодирует ферменты «нижнего пути», участвующие в превращении салицилата до пирувата и ацетальдегида посредством мета-расщепления кольца. Третий оперон кодирует регуляторный белок (NahR). Как верхний, так и нижний опероны регулируются трансактивным регулятором положительного контроля, кодируемым геном *nahR*. В этой системе гены, кодирующие терминальную диоксигеназу, высоко консервативны и состоят из больших α и малых β субъединиц [Cebron *et al.* 2008]. α-Субъединица содержит две консервативные области. Одна из них представляет собой железосерный центр Риске, а другая – моноядерный железосодержащий каталитический домен. Некоторые исследователи предполагают, что каталитический домен α-субъединицы подобного белка у штамма *Sphingomonas sp.* CHY-1 достаточно велик, чтобы вместить молекулу бензпирена с пятью кольцами [Jakonic *et al.*, 2007]. Наиболее изученной диоксигеназой ПАУ (ПАУ-RHDα) является нафталин-1,2-диоксигеназа из *P. putida* NCIB 9816-4, в которой α-субъединица кодируется геном *nahAc*.

Другие гены катаболизма ПАУ также существуют у грамотрицательных бактерий, в том числе гены *phd* штамма *Comamonas testosteroni* GZ39 [Stach, Burns, 2002], гены *nag*

Pseudomonas sp. штамм U2 [Fuenmayor *et al.* 1998] и гены *phn Burkholderia sp.* штамм RP007 [Lloyd-Jones *et al.* 1999]. У грамположительных бактерий найдены *nar*-гены *Rhodococcus sp.* штамм NCIMB12038 [Kimura *et al*. 2006] и гены *phd* (*phdABCD*) *Nocardioides sp*. штамма KP7 [Saito *et al.* 2000]. Все эти вышеперечисленные гены связаны с разложением нафталина, фенантрена и антрацена. В деградации пирена участвуют гены *nid Mycobacterium sp.* штамм PYR-1 [Zhou et al., 2006]. *Nag*-гены, кодирующие нафталиндиоксигеназу и участвующие в превращении салицилата в гентизат, были секвенированы и идентифицированы [Fuenmayor *et al*. 1998]. Результаты показали, что новый порядок генов *nagAa-nagG-nagH-nagAb-nagAc-nagAd-nagB-nagF* представляет собой архетип для штаммов разлагающих нафталина, которые используют путь гентизата вместо мета-расщепления катехола. Бактерии рода *Rhodococcus* способны утилизировать многие алифатические и ароматические соединения. Гены *nar Rhodococcus sp.* 1BN составляют 59 % гомологии с генами *AlkB Pseudomonas oleovorans*. *Nid*-гены, кодирующие диоксигеназу ПАУ штамма *Mycobacterium sp.* PYR-1, способного разлагать пирен, флуорафен, фенантрен и бензпирен также были секвенированы [Moody *et al*., 2001].

Полихлорированные бифенилы являются опасными широко распространенными загрязнителями окружающей среды. Хорошо известно, что разложение ПХБ в значительной степени зависит от положения и количества заместителей. Впервые гены катаболизма бифенила были получены из *Pseudomonas furukawaii* KF707 [Furukawa, Miyazaki, 1986] . С тех пор гены *bph* обнаружены у различных грамотрицательных и грамположительных бактерий [Furukawa, 2008]. Некоторые гены *bph* обнаруживаются на плазмидах, тогда как другие в составе хромосом. Гены *bph C. oxalacticus* A5 (ранее *Ralstonia sp*. A5) [Toussaint *et al*, 2003] и *Acidovorax sp.* KKC102 [Ohtsubo *et al*, 2012] расположены на ICE-элементах. Грамположительный штамм *Rhodococcus jostii* RHA1 обладает множеством генов *bph*, рсположенных на большой линейной плазмиде [Shimizu *et al*, 2001]. Бифенилдиоксигеназа представляет собой многокомпонентный фермент, кодируемый опероном *bphA1A2A3A4*, где *bphA1* и *bphA2* кодируют большую и малую субъединицы терминальной диоксигеназы, *bphA3* кодирует ферредоксин, а *bphA4* кодирует ферредоксинредуктазу. Фермент катализирует начальную оксигенацию бифенила, превращая бифенил в дигидродиол, который затем превращается в дигидрокси-соединение с помощью дегидрогеназы, кодируемой *bphB*. Затем дигидроксисоединение расщепляется до 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновой кислоты с помощью диоксигеназы расщепления кольца (RHD), кодируемой *bphC*. Затем соединение с мета-

расщеплением кольца расщепляется на бензойную кислоту и 2-гидроксипента-2,4-диеновую кислоту гидролазой (кодируемой *bphD*). *BphX1X2X3* (неизвестные гены) отвечают за дальнейшую деградацию 2-гидроксипента-2,4-диеновой кислоты до ацетил-КоА. Эти структурные гены *bph* регулируются регуляторным геном *bphR*, расположенным внутри общего кластера. Среди этих генов *bphA1* критически важен для субстратной специфичности, то есть способности к биоразложению различных ароматических соединений, включая ПХБ [Hirose *et al*, 2019].

1.4 Применение штаммов микроорганизмов для ремедиации почвы

Исследуемые в данной работе штаммы являются частью коммерческого микробного препарата «Абориген» производимого группой компаний «Дарвин» в г. Томск. Он состоит из шести штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, отобранных для работы в консорциуме. «Абориген» показал свою эффективность в лабораторных и полевых испытаниях на загрязненных территориях в северных районах нефтегазодобычи [Франк и др.,2020]. Биоремедиация с применением таких препаратов аборигенных микроорганизмов является экологичным и относительно недорогим решением. Тем не менее, этот процесс занимает не менее года, а удаление такого многокомпонентного загрязнителя как нефть, никогда не бывает полным. Хотя микроорганизмы на загрязненных участках могут приобрести способность к деградации в результате эволюционного или адаптивного процесса, эффективность удаления загрязняющих веществ может быть очень низкой. Чтобы повысить метаболическую эффективность микроорганизмов для целей биоремедиации можно попробовать воспользоваться приемами молекулярной инженерии, сконструировав микрорганизм с желаемыми катаболическими путями, либо модифицировав имеющиеся гены ферментов путем сайт-направленного мутагенеза. При этом интересна локализация выбранных последовательностей. Катаболические пути, кодируемые плазмидами, обладают особым преимуществом, заключающемся в облегчении горизонтального переноса генов, что в природе приводит к быстрой адаптации микроорганизмов в присутствии новых соединений в среде. Создание гибридных штаммов, способных ассимилировать расширенный спектр соединений путем переноса плазмид, содержащих гены катаболизма подробно описано в литературе [Cao *et al*; Reineke, 1998; van der Meer *et al*, 1992]. Во многих случаях, кодируемые плазмидами гены позволяли преодолеть метаболические препятствия, обеспечивая полное разрушение ранее непокорного соединения. Такой подход, объединяющий ферменты из двух или более существующих путей метаболизма, известен в литературе как «лоскутный» [Copley, 2000]. Первым шагом в рамках сложной

задачи может быть выяснение природного потенциала исследуемых штаммов и выделение последовательностей, которые могут быть использованы в дальнейшей работе по созданию универсального агента для биоремедиации.

2 Материалы и методы

2.1 Получение образцов плазмидной ДНК

Штаммы *Pseudomonas* sp. 2H, *Bacillus subtiles* B10, *Acinetobacter calcoaceticus* B1318 консорциума «Абориген» предоставлены лабораторией «ООО Дарвин». Полученные штаммы культивировали на среде следующего состава: 1,5 г/л KH_2PO_4, 0,75 г/л K_2HPO_4, 1 г/л NH_4Cl, 2,5 г/л NaCl, 0,2 г/л $MgSO_4*7H_2O$ и 1 % сырой нефти при 28°С с качанием в течение 6 суток. Далее штаммы пересаживались на жидкую среду, содержащую 5 г/л пептона, 5 г/л NaCl, 2,5 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л D-глюкозы моногидрата. На этой среде штаммы растили в течение 2 суток без пересевов для сохранения плазмид биодеградации. Выделение плазмидной ДНК проводилось набором Plasmid Miniprep фирмы Eurogen (Россия) по протоколу производителя.

2.2 Получение образцов хромосомной ДНК

Полученные штаммы культивировали на среде следующего состава: 1,5 г/л KH_2PO_4, 0,75 г/л K_2HPO_4, 1 г/л NH_4Cl, 2,5 г/л NaCl, 0,2 г/л $MgSO_4*7H_2O$ и 1 % сырой нефти при 28°С с качанием в течение 6 суток. Далее штаммы пересаживались на жидкую среду, содержащую 5 г/л пептона, 5 г/л NaCl, 2,5 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л D-глюкозы моногидрата. На этой среде штаммы инкубировали при 28°С с качанием в течение 6 суток с 3 пересевами. Пересевы на богатой среде осуществлялись с целью элиминации плазмид биодеградации на среде лишенной сложных источников углерода и энергии. Выделение хромосомной ДНК проводилось набором D-Cells фирмы Biolabmix (Россия).

2.3 Выделение образцов хромосомной ДНК из геля

Для получения хромосомной ДНК изучаемых штаммов без примесей плазмид использовался прием выделения хромосомной ДНК штаммов из геля с помощью набора CleanUp Standart фирмы Eurogen (Россия). Для этого образцы разгоняли в агарозном геле, и «бэнды» соответствующие размеру хромосомы штамма вырезаются тонким шпателем . Далее добавляли трехкратный объём буфера, в котором при 50 °С растворяется агарозный гель. Дальнейшие манипуляции включают выделение ДНК на колонке по протоколу производителя. Концентрация ДНК после данной процедуры составляла от 1,5 до 5,5 нг/мкл. Полученные образцы использовались для дальнейшего ПЦР-анализа. Данный подход позволил избавиться от примесей плазмидной ДНК в анализируемой матрице хромосомной ДНК.

2.4 ПЦР-анализ штаммов на наличие генов биодеградации углеводородов нефти

В состав 20 мкл ПЦР-смеси входили 1×буфера для полимеразы, 10 мкМ dNTP, 10 мкм праймера F, 10 мкм праймера R, 50 нг/мкл матрицы, 5 ед./ мкл Taq-полимеразы, вода. Программа амплификации генов ферментов была следующей: 5 минут первичная денатурация при 95 °С - денатурация 4 минуты при 94 °С - отжиг 45 сек - элонгация 1 минуту при 72 °С. Количество циклов от 21 до 25; конечная элонгация 5 мин при 72°С. Подобранные экспериментально температуры отжига праймеров, при которых получены продукты указанной длины, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Температуры отжига праймеров, подобранная для оптимальной наработки продукта методом ПЦР

Праймер	**Штамм**					
	B1318		***2H***		***B10***	
	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК
AlkB	53	–	57	–	53	–
cat-12	53	53	53	55	53	53
cat23	53	–	–	–	53	–
npCB	55	55	53	–	55	55
bphA4	–	53	53	–	53	62

2.5 Электрофорез образцов ДНК

Визуализацию хромосомной и плазмидной ДНК проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашенном SYBR Green. Программа длилась 60 минут при 80 Вт.

3 Результаты и их обсуждение

3.1 Получение чистых фракций штаммов

Культивирование штаммов *Acinetobacter calcoaceticus* B1318, *Pseudomonas sp.* 2H, и *Bacillus subtiles* B10 консорциума «Абориген» осуществлялось на селективной среде с добавлением 1% нефти.

Для получения чистой хромосомной ДНК штаммы пересаживали на богатую среду и делали три пересева с целью элиминации плазмид деградации, которые могли присутствовать в среде с нефтью. После смены поколений, уменьшалась вероятность получить при выделении геномную ДНК вместе с плазмидной.

Для получения чистой фракции плазмидной ДНК штаммы также пересаживали на богапую среду. Для получения чистой фракции плазмидной ДНК штаммы культивировали без пересевов, чтобы сохранить плазмиды деградации для дальнейшего анализа. Из селективной среды содержащей нефть выделить образцы плазмидной ДНК не получалось из-за флотации клеточного дебриса.

Результатом культивирования штаммов на селективной среде и выделения хромосомной ДНК из геля были образцы ДНК, выделенные коммерческими наборами. Концентрация и качество образцов плазмидной ДНК и хромосомной ДНК представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Концентрация и качество образцов ДНК

Штамм	B10		B1318		2H	
	х	п	х	п	х	п
Концентрация, нг/мкл	3.8 5.5 2.0	37.2 41.0 35.0	4.9 3.3 2.5	44.7 27.0 38.5	5.6 4.0 3.9	16.7 23.7 23.5
260/280	1.94 1.98 2.03	1.74 1.84 1.94	1.92 2.18 2.04	1.94 1.75 1.54	2.20 2.21 1.69	1.55 1.69 1.54
260/230	0.94 0.83 0.88	0.58 1.73 0.83	0.95 0.04 0.06	1.68 0.36 1.26	0.03 0.48 0.72	0.66 0.3 1.14
Примечание – «х» – хромосомная ДНК, «п» – плазмидная ДНК.						

3.2 Поиск ферментов для анализа деградации фракций нефти

ПЦР-анализ штаммов *Pseudomonas* sp. 2H, *Bacillus subtiles* B10, *Acinetobacter calcoaceticus* B1318 консорциума «Абориген» проводился с использованием праймеров, наиболее часто встречающихся в литературных источниках по данной теме. Были выбраны гены, отвечающие за метаболизм алифатических, ароматических и полициклических углеводородов, содержащиеся в нефти и продуктах ее переработки, выделяющиеся при их сжигании. Праймеры, использованные в работе приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Праймеры, использованные в работе

Фермент	Нуклеотидная последовательность (5`→3`)	Размер продукта, пн	Источник
Алкангидроксилаза (AlkB)	F:ATCAAYRCVGCVCAYGARYTVGGBCACAAG R:SGGRTTCGCRTGRTGRTCRCTGTGNSGYTG	558	Делеган, 2016
Катехол-1,2-диоксигеназа (CatA)	F:GCCGCCACCGACAAGTT R:CACCATGAGGTGCAGGTG	550	Táncsics *et al.*, 2014
Катехол-2,3-диоксигеназа (nahH)	F:ATGAAAAAAGGCGTAATGCGC R:AGCACGGTCATGAAACGTTCGTTC	700	Temitayo O. Olowomofe *et al.*, 2019

В чистой фракции хромосомной ДНК штамма B10 обнаружены гены алкангидроксилазы, катехол-1,2-диоксигеназы и катехол 2,3-диоксигеназы. В плазмидной ДНК этого штамма обнаружены гены катехол-1,2-диоксигеназы.

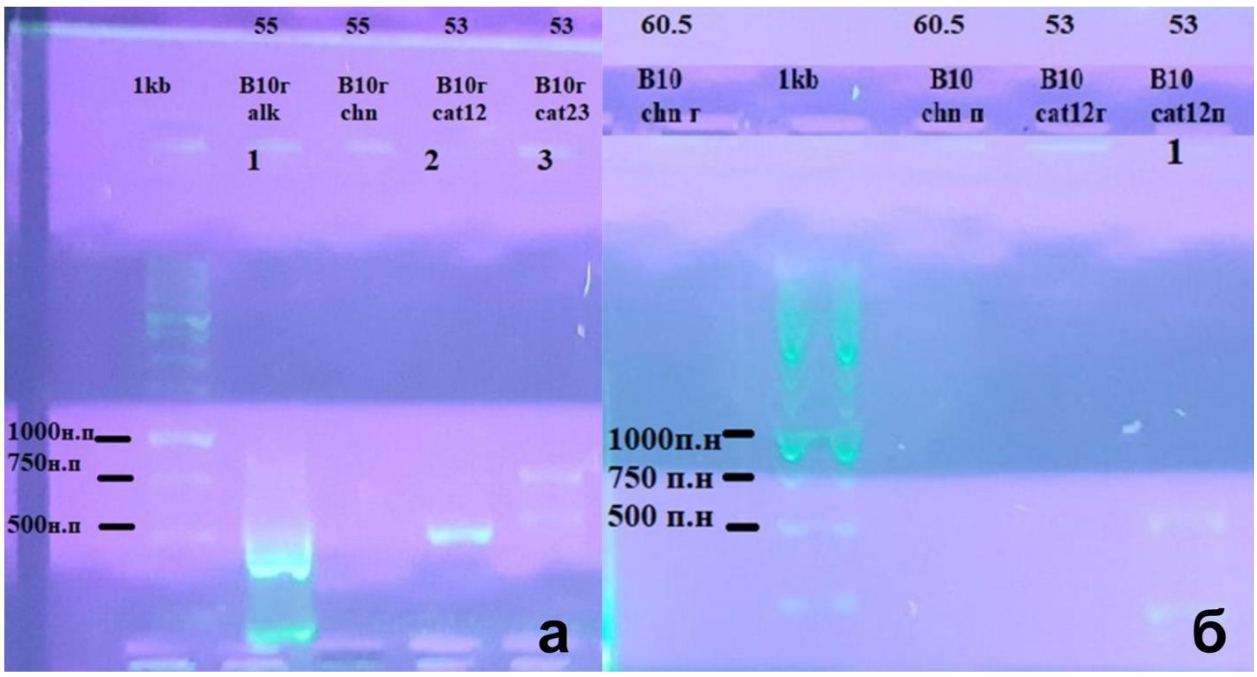


Рисунок 8 – Электрофореграммы продуктов ПЦР с хромосомной и плазмидной ДНК штамма B10. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену алкангидроксилазы, 2 – к гену катехол-1,2-диоксигеназы, 3 – катехол-2,3-диоксигеназы. На рисунке б: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену катехол-1,2-диоксигеназы. В хромосомной ДНК штамма 2Н обнаружены гены алкангидроксилазы и катехол-1,2-диоксигеназы, а в плазмидной ДНК штамма 2Н только ген катехол-1,2-диоксигеназы.

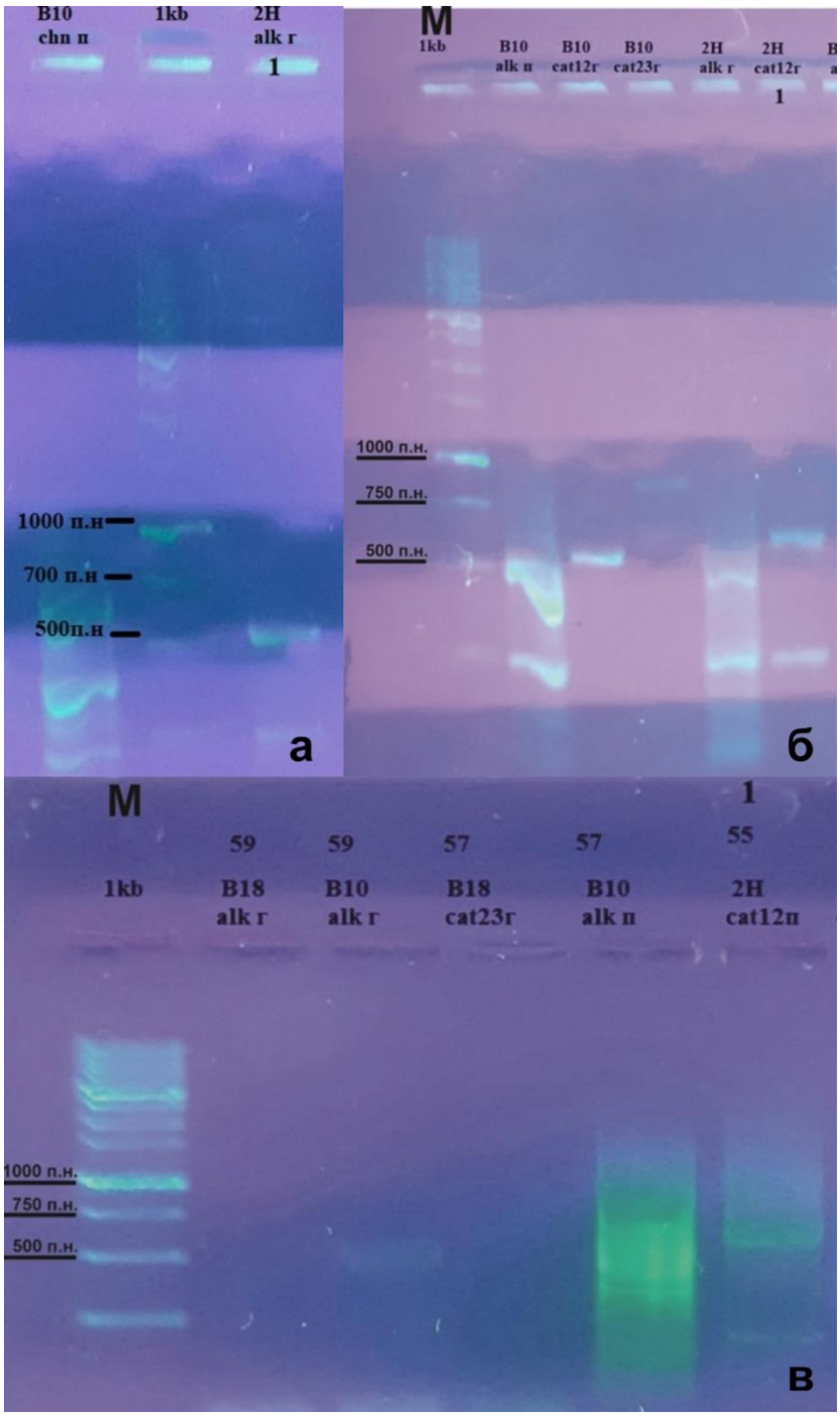


Рисунок 9 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с хромосомной и плазмидной ДНК штамма 2Н. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену алкангидроксилазы. На рисунке б: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену катехол-1,2-диоксигеназы. На рисунке в: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену катехол-1,2-диоксигеназы.

В ДНК, выделенной из штамма В1318 препарата «Абориген» обнаружены гены алкангидроксилазы, катехол-1,2-диоксигеназы и катехол-2,3-диоксигеназы. Ген катехол-1,2-диоксигеназы обнаружен как в хромосомной, так и в плазмидной ДНК штамма.

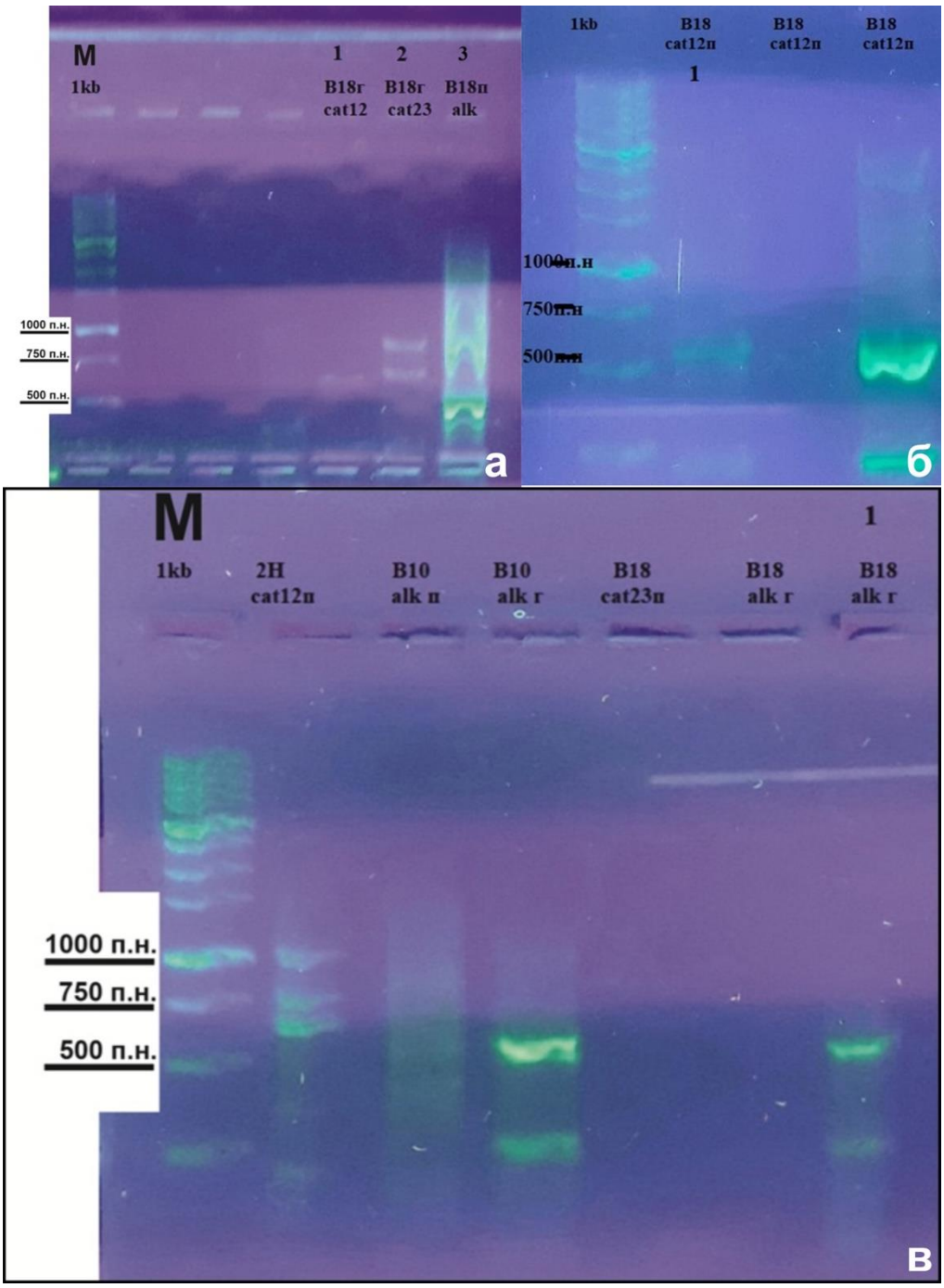


Рисунок 10 – Электрофореграммы продуктов ПЦР с ДНК штамма В1318. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену катехол-1,2-диоксигеназы, 2 – к гену катехол-2,3-диоксигеназы, 3 – продукт наработки гена с праймерами к гену алкангидроксилазы. На рисунке б: 1 –продукт наработки гена с праймерами к гену катехол-1,2-диоксигеназы. На рисунке в: 1 – продукт праймера к гену алкагидроксилазы.

Обобщение результатов по генам деградации соединений нефти в таблице 5.

Таблица 5 – Гены деградации соединений нефти, обнаруженные в штаммах *Acinetobacter calcoaceticus* B1318, *Pseudomonas sp.* 2H, и *Bacillus subtiles* B10

Фермент (ген)	Штамм консорциума «Абориген»					
	B1318		*2H*		*B10*	
	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК
Алкангидроксилаза *(AlkB)*	+	–	+	–	+	–
Катехол-1,2-диоксигеназы *(Cat12)*	+	+	+	+	+	+
Катехол-2,3-диоксигеназа*(Cat23)*	+	–	–	–	+	–

Ген катехол-1,2-диоксигеназы осуществляет мета-расщепление ароматического кольца катехола с образованием цис-цис-муконовой кислоты и является ключевым ферментом в аэробных путях деградации многих ароматических соединений. Ген, кодирующий этот фермент обнаружен во всех трех штаммах, и во всех имеет двойную локализацию. Алкангидроксилазы – ферменты, функционирующие на первых стадиях окисления n-алканов у многих микроорганизмов обнаружены лишь в хромосомной ДНК, исследуемых штаммов B10, 2H и B1318.

3.3 Поиск генов ферментов, участвующих в деградации органических загрязнителей в штаммах консорциума «Абориген»

Для расширения анализа на другие органические загрязнители, вызывающие опасения при нахождении в природной среде были выбраны нитрофенол и полихлорированный бифенил. Нитрофенол – продукт разложения пестицида фосфоорганической природы паратиона, широко применяющегося в сельском хозяйстве.

Полихлорированный бифенил (ПХБ) - широко известное вещество, относящееся к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), имеющих длительный период разложения и серьезное влияние на живые организмы.

Таблица 6 – Праймеры к генам деградации иных органических загрязнителей

Фермент	Нуклеотидная последовательность (5`→3`)	Размер продукта, пн	Источник
Редуктазный домен 4-нитрофенол-монооксигеназы (*npcB*)	F:TCGGACACTTCGCAAGTGG R:CGGTAGTACGACAGTGGATTGC	409	Subashchandrabose *et al*,2019
Ферредоксин редуктазный домен бифенил-2,3-диоксигеназы (*bphA4*)	F:GCCAGCATCGTGATTGTCGG R:CCTGGTCCGCCGCGTTTTGGTAGG	1000	Wongwongsee *et al*, 2013

По результатам такого анализа в штамме B10 обнаружены гены 4-нитрофенол монооксигеназы, бифенил-2,3-диоксигеназы в хромосомной и плазмидной ДНК, а также 4-нитрофенол гидроксилазы в плазмидной ДНК.

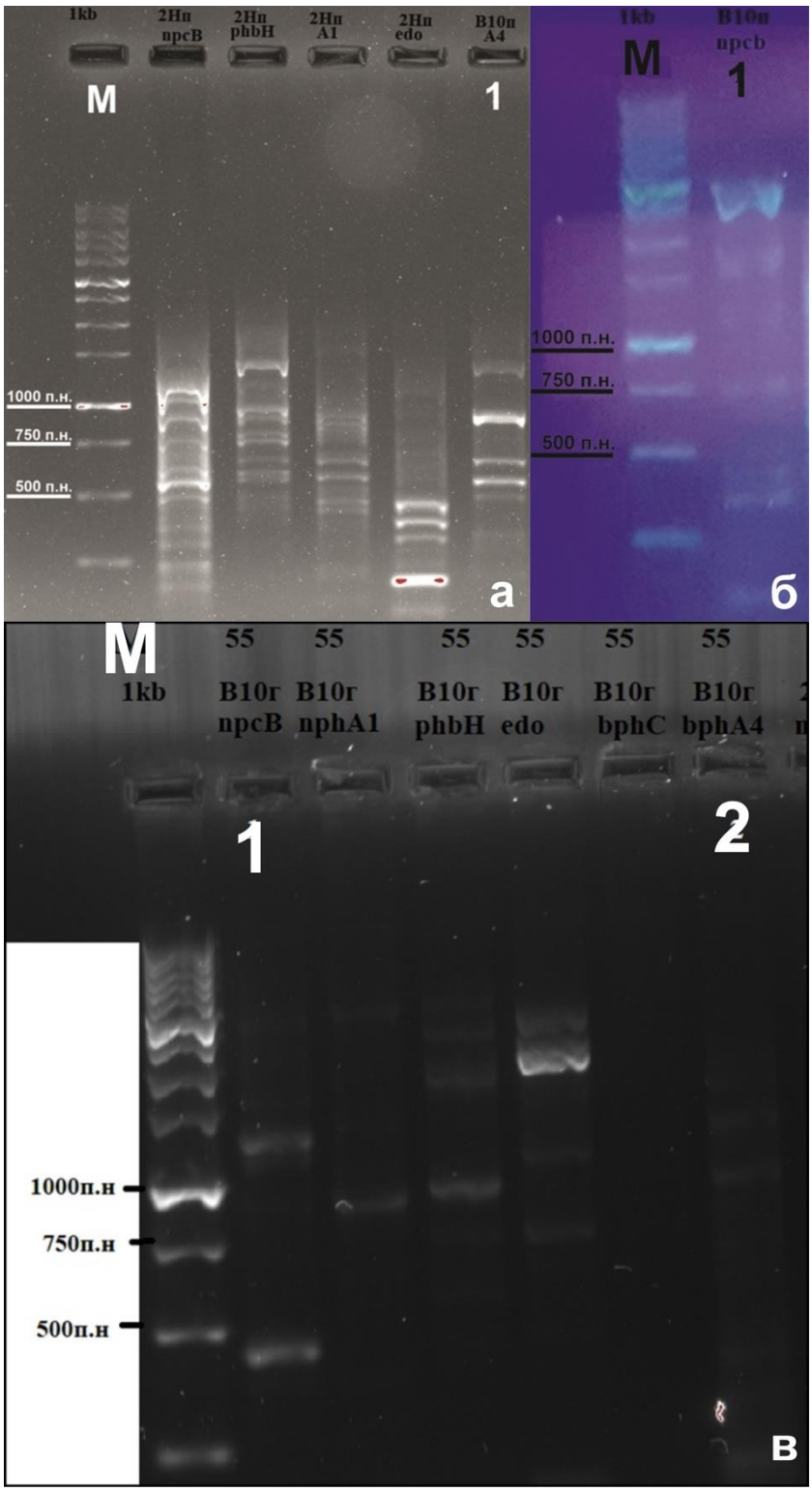


Рисунок 11 – Электрофореграммы продуктов ПЦР с плазмидной и хромосомной ДНК штамма В10. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену бифенил-2,3-диоксигеназы. На рисунке б: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену 4-нитрофенол-монооксигеназы. На рисунке в:1 – продукт наработки гена с праймерами к гену 4-нитрофенол-монооксигеназы, 2 – продукт наработки гена с праймерами к гену бифенил-2,3-диоксигеназы.

В штамме 2Н обнаружены следующие гены ферментов метаболизма полиароматических углеводородов: 4-нитрофенол монооксигеназа и бифенил-2,3-диоксигеназа в хромосомной ДНК.

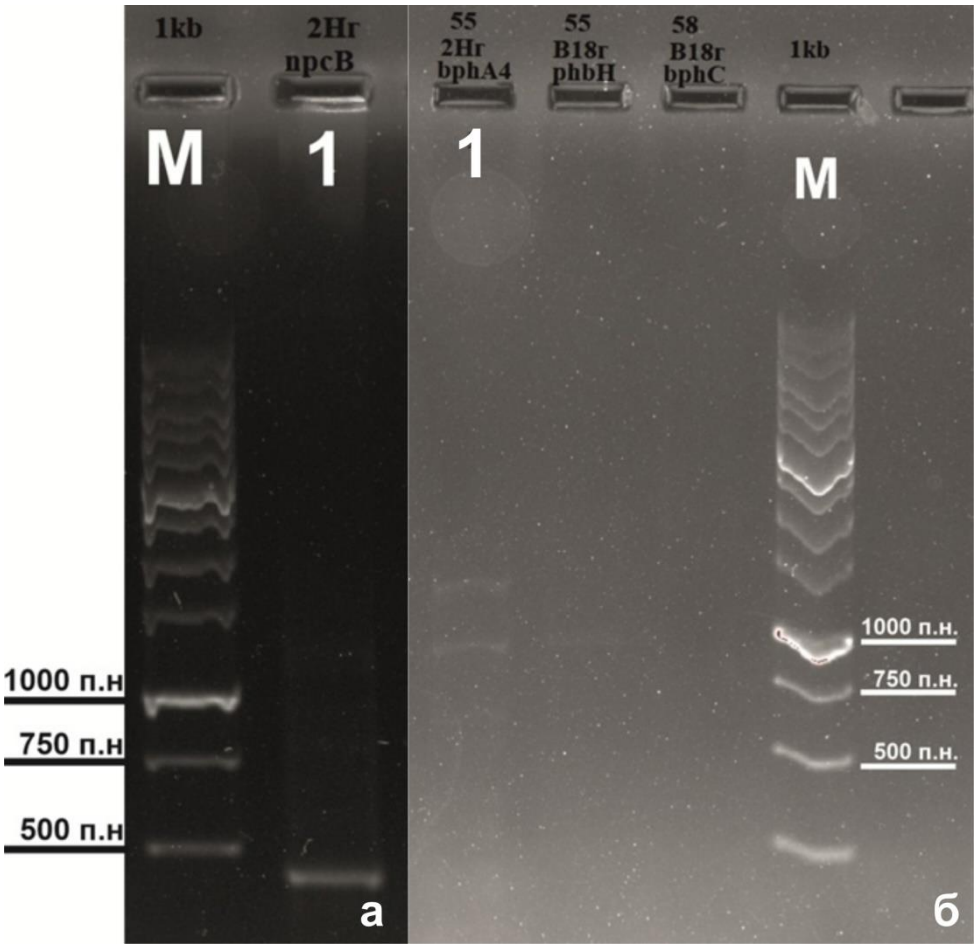


Рисунок 12 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с хромосомной ДНК штамма 2Н. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену 4-нитрофенол монооксигеназы. На рисунке б: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену бифенил-2,3-диоксигеназы.

Для штамма В1318 получены следующие результаты: ген 4-нитрофенол монооксигеназы в хромосомной и плазмидной ДНК, ген бифенил-2,3-диоксигеназы в плазмидной ДНК штамма В1318.

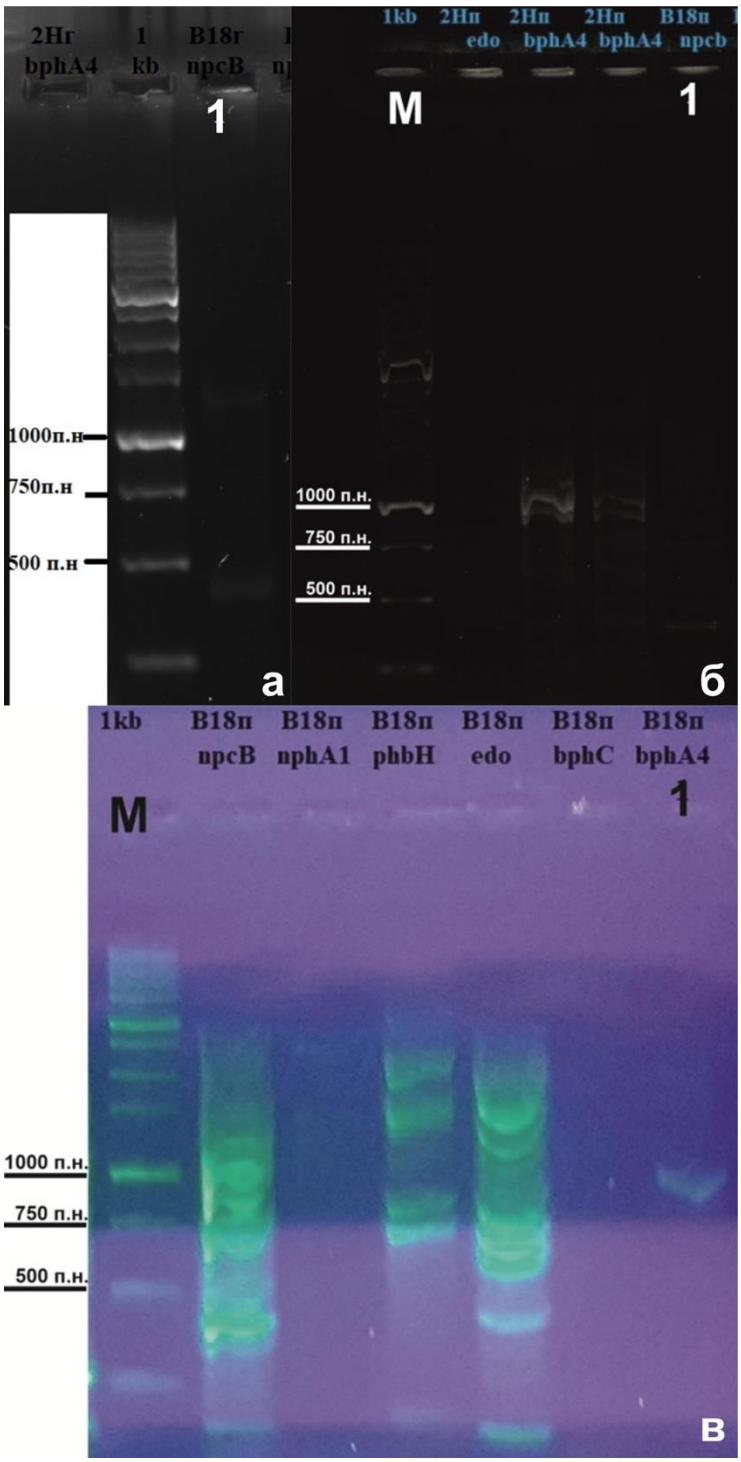


Рисунок 13 – Электрофореграммы продуктов ПЦР с хромосомной и плазмидной ДНК штамма B1318. На рисунке а: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену 4-нитрофенол монооксигеназы. На рисунке б; 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену 4-нитрофенол монооксигеназы. На рисунке в: 1 – продукт наработки гена с праймерами к гену бифенил-2,3-диоксигеназы.

Нитрофенол является широко распространенным веществом в химической промышленности, а также выделяется при разложении пестицидов. Ген 4-нитрофенол-2-монооксигеназы (*NpcB*), отвечающей за окисление нитрофенола до нитрокатехола, обнаружен во всех исследуемых штаммах. Это может служить возможному расширению

области применения препарата после соответствующих тестов. В геноме всех изучаемых штаммов также обнаружен ген бифенил-2,3-диоксигеназы, участвующей в первой реакции окисления полихлорированного бифенила – высокотоксичного и персистентного органического загрязнителя. Таким образом, в штаммах консорциума обнаружены гены ферментов деградации не только нефти, но и других опасных органических загрязнителей. Обобщеннные результаты ПЦР-анализа представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Гены деградации персистентных органических загрязнителей, обнаруженные в штаммах *Acinetobacter calcoaceticus* B1318, *Pseudomonas sp.* 2H, и *Bacillus subtiles* B10

Фермент (ген)	Штамм					
	B1318		2H		B10	
	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК	Хромосомная ДНК	Плазмидная ДНК
4-Нитрофенол монооксигеназа *(npcb)*	+	+	+	–	+	+
Бифенил-2,3-диоксигеназа *(bpha4)*	–	+	+	–	+	+

ВЫВОДЫ

1. В результате культивирования штаммов биодеградации углеводородов на селективной среде и последующих методов выделения ДНК и очистки с помощью гель-электрофореза получены чистые фракции хромосомной и плазмидной ДНК штаммов *Pseudomonas* sp. 2Н, *Bacillus subtiles* В10, *Acinetobacter calcoaceticus* В1318 консорциума «Абориген».

2. Методом ПЦР выявлены гены ферментов, участвующих в деградации нефти (аренов и алканов) у штаммов 2Н, В10, В1318 консорциума «Абориген». Ген деградации алифатических углеводородов (*AlkB*) обнаружен в хромосомной ДНК всех исследуемых штаммов. В плазмидной ДНК штаммов В10, 2Н и В1318 *AlkB* не выявлен. Ген деградации ароматических соединений по орто-механизму расщепления кольца (катехол-1,2-диоксигеназа) обнаружен как в плазмидной, так и в хромосомной ДНК всех трёх штаммов. Ген деградации ароматических соединений по мета-механизму расщепления кольца (катехол-2,3-диоксигеназа) обнаружен в штаммах В1318 и В10, только в хромосомной ДНК.

3. Выявлены гены ферментов, участвующих в деградации органических загрязнителей в штаммах 2Н, В10, В1318 консорциума «Абориген» . Во всех исследуемых штаммах обнаружен ген окисления п-нитрофенола. Ген бифенил-2,3-диоксигеназы (*BphA4)* по результатам ПЦР найден в хромосомной ДНК штаммов В10 и 2Н и плазмидной ДНК штаммов В1318 и В10.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Auger R. L. Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: Assessment of toxicity and overflow metabolism potential/ R. L.Auger, A. M.Jacobson, M. M.Domach //Journal of hazardous materials. – 1995. – Т. 43. – №. 3. – С. 263-272.

2. Baboshin M. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas sp. VKM B-2434. / M. Baboshin, V. Akimov, B. Baskunov, T.L. Born, S.U. Khan, L. Golovleva // Biodegradation – 2008 – V.4 – p.567-576.

3. Balashova N.V. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain Pseudomonas putida BS202-P1/ N.V. Balashova, A. Stolz, H.J. Knackmuss, I.A. Kosheleva, A.V. Naumov, A.M. Boronin // Biodegradation. – 2001 – V.3 – p.179-188.

4. Baptist J.N. Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of octane oxidation. / J.N.Baptist, R.K.Gholston, M. J.Coon // Biochim Biophys Acta. – 1963 – V.69–p.40-47.

5. Barbe V. Unique features revealed by the genome sequence of Acinetobacter sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium / V. Barbe, D. Vallenet, N. Fonknechten, A. Kreimeyer, S. Oztas, L. Labarre, S. Cruveiller, C. Robert, S. Duprat, P. Wincker, L.N. Ornston, J. Weissenbach, P. Marlière, G.N. Cohen, C.Médigue // Nucleic Acids Res. – 2004 – V19–p.5766-5779.

6. Bidja Abena M.T. Microbial diversity changes and enrichment of potential petroleum hydrocarbon degraders in crude oil-, diesel-, and gasoline-contaminated soil / M.T. Bidja Abena, G. Chen, Z. Chen, X. Zheng , S. Li , T. Li, W. Zhong. // Biotech. – 2020 –V.2– p.42.

7. Cao B. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches/ B. Cao, K. Nagarajan, K.C. Loh // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009 – V.85 – p.207-228.

8. Cébron A. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDalpha) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples/ A. Cébron, M.P. Norini, T. Beguiristain, C.Leyval // J Microbiol Methods. – 2008 – V.73 – p.148-59.

9. Cheng Q. Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in Acinetobacter sp. Strain SE19 by in vitro transposition / Q. Cheng, S.M.Thomas, K. Kostichka, J.R. Valentine, V. Nagarajan // J Bacteriol. – 2000. – V.182.–p.4744-4751.

10. Copley SD. Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach / S.D. Copley // Trends Biochem Sci. – 2000 – V.25–p.261-265.

11. Dean-Ross D. Metabolism of anthracene by a Rhodococcus species / D.Dean-Ross, J.D. Moody, J.P. Freeman, D.R. Doerge, C.E. Cerniglia // FEMS Microbiol Lett. – 2001 – V.204–p.205-211.

12. Dennis J. J. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from Pseudomonas putida strain NCIB 9816-4/ J. J.Dennis, G. J. Zylstra //Journal of molecular biology. – 2004. – V. 341. – №. 3. – C. 753-768.

13. Denome S.A. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in Pseudomonas strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway/ S.A. Denome, D.C. Stanley, E.S. Olson, K.D. Young // J Bacteriol. – 1993 –V.175–p.6890-6901.

14. Ecker S. et al. Catabolism of 2, 6-dinitrophenol by Alcaligenes eutrophus JMP 134 and JMP 222 //Archives of microbiology. – 1992. – V. 158. – p. 149-154.

15. Feng, L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading Geobacillus thermodenitrificans NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir / L. Feng, W.Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao et al. // Proc Natl Acad Sci USA – 2007 – V.104 – p.5602–5607.

16. Fuenmayor S.L. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in Pseudomonas sp. strain U2/ S.L. Fuenmayor, M. Wild, A.L. Boyes, P.A. Williams – J Bacteriol. – 1998 – V180–p.2522-2530.

17. Funhoff E.G. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane-hydroxylation / E.G. Funhoff, U. Bauer, I. García-Rubio, B. Witholt, J.B, van Beilen // J Bacteriol – 2006 – V.188 – p.5220–5227.

18. Furukawa K. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in Pseudomonas pseudoalcaligenes/ K. Furukawa, T. Miyazaki // J Bacteriol. – 1986 – V.166–p.392-398.

19. Furukawa K. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features/ K. Furukawa, H. Fujihara // J Biosci Bioeng. – 2008 – V.105–p.433-449.

20. George, K. W. Bacterial Strategies for Growth on Aromatic Compounds / George, K. W // Advances in Applied Microbiology – 2011 – V. 74 – p.1–33.

21. Gianfreda L. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes/ L.Gianfreda, F.Xu, J. M. Bollag //Bioremediation journal. – 1999. – V. 3. – №. 1. – p. 1-26.

22. Gibson D.T. Formation of (+)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by Pseudomonas putida / D.T. Gibson, M. Hensley, H.Yoshioka, T.J. Mabry// Biochemistry – 1970 – V.9–p.1626-1630.

23. Gibson, D.T. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons / D.T. Gibson, and V.Subramanian // Marcel Dekker – 1984 – New York – p.181-252.

24. Goyal A.K. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosterone*/ A.K. Goyal, G.J. Zylstra // J Ind Microbiol Biotechnol – 1997 – V.19– p.401-407.

25. Goyal A.K. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. / A.K. Goyal, G.J. Zylstra //Appl Environ Microbiol. – 1996 – V.62–p.230-236.

26. Groenewegen P.E. Novel degradative pathway of 4-nitrobenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10 / P.E.Groenewegen, P. Breeuwer, J.M. van Helvoort, A.A. Langenhoff, F.P. de Vries, J.A. de Bont // J Gen Microbiol. – 1992 – V.138–p.1599-1605.

27. Habe H. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria / H.Habe, T.Omori //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2003. – V. 67. – №. 2. – p. 225-243.

28. Haigler B. E. Degradation of 1, 2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas sp.* / B.E. Haigler, S. F. Nishino, J. C. Spain //Applied and Environmental Microbiology. – 1988. – V. 54. – №. 2. – p. 294-301.

29. Hara A. Cloning and functional analysis of AlkB genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2/ A.Hara, S.H.Baik, K.Syutsubo, N.Misawa, T.H.Smits, J.B. van Beilen, S.Harayama //Environ Microbiol. – 2004 – V.3–p.191-197.

30. Harayama S. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products/ S.Harayama, M. Rekik, M. Wubbolts, K. Rose, R.A. Leppik, K.N. Timmis // J Bacteriol. – 1989 – V.171– p.5048-5055.

31. Harwood, C. S. The β-ketoadipate pathway and the biology of self-identity / C. S. Harwood, R. E. Parales // Annual Review of Microbiology – 1996 – V.50 – p.553–590.

32. Hirose J. Biphenyl/PCB Degrading bph Genes of Ten Bacterial Strains Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil in Kitakyushu, Japan: Comparative and Dynamic Features as Integrative Conjugative Elements (ICEs)/ J. Hirose, H. Fujihara, T. Watanabe, N. Kimura, H. Suenaga, T. Futagami, M. Goto, A. Suyama, K.Furukawa // Genes – 2019 – V.10 – p. 404.

33. Jakoncic J. The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1/ J. Jakoncic, Y. Jouanneau, C. Meyer, V. Stojanoff // Biochem Biophys Res Commun. – 2007 – V.352–p.861-866.

34. Jouanneau Y. Purification and characterization of a three-component salicylate 1-hydroxylase from Sphingomonas sp. strain CHY-1 / Y. Jouanneau, J. Micoud, C. Meyer // Appl Environ Microbiol. – 2007 – V.73–p.7515-7521.

35. Kim S.I. Proteome analysis of Pseudomonas sp. K82 biodegradation pathways/ S.I. Kim, J.Y. Kim, S.-H. Yun, J.H. Kim, S.-H. Leem, C.-H. Lee// Proteomics – 2004 – V4 – p.3610–3621.

36. Kim Y.H. Analysis of aromatic catabolic pathways in Pseudomonas putida KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis / Y.H. Kim, K .Cho, S.H. Yun, J.Y. Kim, K.H. Kwon, J.S. Yoo, S.I. Kim // Proteomics – 2006 – V.6–p.1301-1318.

37. Kitagawa W. A novel p-nitrophenol degradation gene cluster from a gram-positive bacterium, Rhodococcus opacus SAO101/ W. Kitagawa, N. Kimura, Y. Kamagata// J Bacteriol – 2004 – V.186–p.4894-4902.

38. Kiyohara H. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by Pseudomonas putida OUS82/ H. Kiyohara, S.Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Iida, H. Hayashi, N.Takizawa // J Bacteriol. – 1994 – V.176–p.2439-2443.

39. Laczi K. New Frontiers of Anaerobic Hydrocarbon Biodegradation in the Multi-Omics Era/ K.Laczi, Á. Erdeiné Kis, Á. Szilágyi, N. Bounedjoum, A. Bodor, G.E. Vincze, T. Kovács, G. Rákhely, K. Perei// Front. Microbiol. – 2020 – V16.–p.590-595.

40. Lenke H. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2 / H.Lenke, H. J. Knackmuss //Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – №. 9. – p. 2933-2937.

41. Li, L. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase/ L.Li, X. Liu, W. Yang, F. Xu, W. Wang, L. Feng et al.// J Mol Biol – 2008 – V.376 – p.453–465.

42. Lily M.K. Degradation of Benzo [a] Pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447)/ M.K. Lily, A. Bahuguna, K. Dangwal, V.Garg // Braz J Microbiol. – 2009– V.40–p.884-892.

43. Lloyd-Jones, G. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils/ G.Lloyd-Jones, A. D.Laurie, D. W.Hunter, & R. Fraser// FEMS Microbiology Ecology – 1999 – V.29 – p.69-79.

44. Lu, X. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria/ X.Lu , T.Zhang, H. H. P. Fang, K. M.Leung, & G.Zhang, // International Biodeterioration & Biodegradation – 2011 – V.65 – p.204-211.

45. Maeng, J.H. Diversity of dioxygenases that catalyze the first step of oxidation of long-chain n-alkanes in Acinetobacter sp. strain M-1 / J.H Maeng, Y. Sakai , T. Ishige, Y.Tani and N. Kato // FEMS Microbiol Lett – 1996 – V.141 – p.177–182.

46. Marchant R. The degradation of n-hexadecane in soil by thermophilic geobacilli / R. Marchant, F.H. Sharkey, I.M. Banat, T.J. Rahman, A. Perfumo //FEMS Microbiol Ecol. – 2006 – V.56–p.44-54.

47. McKew B. A. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary / B. A. McKew; F.Coulon; A. M.Osborn; K.N. Timmis; T. J. McGenity// UK. Environ Microbiol. – 2007 – V.9–p.165-176.

48. Moody J.D. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium sp.* strain PYR-1. / J.D. Moody, J.P. Freeman, D.R. Doerge, C.E. Cerniglia //Appl Environ Microbiol. – 2001 – V.67–p.1476-1483.

49. Nakai C. Cloning, DNA sequencing, and amino acid sequencing of catechol 1,2-dioxygenases (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 and *Pseudomonas arvilla* C-1/ C. Nakai, H. Uyeyama, H. Kagamiyama, T. Nakazawa, S. Inouye, F. Kishi, A. Nakazawa, M. Nozaki //Arch Biochem Biophys. – 1995 – V.321–p.353-362.

50. Nie Y. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments/ Y. Nie, C.Q. Chi, H. Fang, J.L. Liang, S.L. Lu, G.L. Lai, Y.Q. Tang, X.L. Wu //Sci Rep. – 2014 – V.15–p.4968.

51. Nie Y. Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain n-alkane degradation/ Y. Nie, J. Liang, H. Fang, Y.Q. Tang, X.L. Wu //Appl Environ Microbiol – 2011 – V.77–p.7279-7288.

52. Ohtsubo Y. Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax sp.* strain KKS102, which are located on an integrative and conjugative element/ Y. Ohtsubo, Y. Ishibashi, H. Naganawa, S. Hirokawa, S. Atobe, Y. Nagata, M.Tsuda //J Bacteriol. – 2012 – V.192–p.4237-4248.

53. Olsen R.H. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1/ R.H. Olsen, J.J.Kukor, B. Kaphammer //Bacteriol. – 1994 – V.176–p.3749-3756.

54. Ostrem Loss E.M. Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene /Ostrem Loss E.M. and Yu J.-H. // Molecular Microbiology – 2018 – V.109 – p.433-444.

55. Parales R.E. Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity / R.E. Parales, J.V. Parales, D.T. Gibson // J Bacteriol. – 1999 – V.182– p.1831-1837.

56. Phale P.S. Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds/ P.S. Phale, A. Basu, P.D. Majhi, J. Deveryshetty, C. Vamsee-Krishna, R. Shrivastava // OMICS: A Journal of Integrative Biology – 2007 – V.11 – p.252–279.

57. Procópio L. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamea* P4 strain/ L. Procópio, M. de Cassia Pereira e Silva, J.D. van Elsas, L. Seldin // Braz J Microbiol. – 2013 – V.44–p.633-641.

58. R.Boopathy Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio sp.*(B strain) isolated from an anaerobic digester / R.Boopathy, C. F. Kulpa //Current microbiology. – 1992. – V. 25. – p. 235-241.

59. Ramos J.L. Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding meta-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by Pseudomonas / J.L. Ramos, N. Mermod, K.N.Timmis //Mol Microbiol. – 1987 – V.3 – p.293-300.

60. Ratajczak A. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter sp.* strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases/ A. Ratajczak, W. Geissdörfer, W.Hillen // Appl Environ Microbiol. – 1998 – V.64 – p.1175-1179.

61. Raymond D. G. M. Microbial metabolism and cometabolism of nitrophenols / D. G. M.Raymond, M. Alexander//Pesticide Biochemistry and Physiology. – 1971. – V. 1. – №. 2. – p. 123-130.

62. Reineke W. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly/ W. Reineke //Annu Rev Microbiol. – 1998 – V.52 –p. 287-331.

63. Rentz, J. A. Benzo [a] pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02/ J. A. Rentz, P. J.Alvarez & J. L.Schnoor, // Environmental pollution – 2009 – 151(3), 669-677.

64. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // Environ Microbiol. – 2009 – V.11– p.2477-2490.

65. Ronchel M.C. Retrotransfer of DNA in the rhizosphere/ M.C. Ronchel, M.A. Ramos-Díaz, J.L. Ramos // Environ Microbiol. – 2000 – V.3–p.319-323.

66. Ronson C.W. Symbiosis islands/ C.W. Ronson, M.F. Hynes, J.P. Ramsay, and J.T. Sullivan // Brenner's Encyclopedia of Genetics (2nd edition) – 2013 – Elsevier publishers – pp 598-600.

67. Saito A. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides sp*. strain KP7: expression in Escherichia coli / A.Saito, T.Iwabuchi, S. Harayama //Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – №. 8. – p. 2134-2141.

68. Sakshi. A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation/ Sakshi, A.K. Haritash, // Arch Microbiol – 2022 – V.202 – p.2033–2058.

69. Salamanca, D. Novel cyclohexane monooxygenase from *Acidovorax sp.* CHX100/ D. Salamanca, R. Karande, A. Schmid, et al. // Appl Microbiol Biotechnol – 2015 – V.99 – p.6889–6897.

70. Seo J.S. Bacterial degradation of aromatic compounds / J.S. Seo, Y.S.Keum, Q.X. Li // Int J Environ Res Public Health. – 2009 – V.6–p.278-309.

71. Shaw J.P. Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida* / J.P.Shaw, S.Harayama // Eur J Biochem. – 1990 – V.191–p.705-714.

72. Shields M.S. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium g4 / M.S. Shields, S.O. Montgomery, P.J. Chapman, S.M. Cuskey, P.H. Pritchard // Appl Environ Microbiol. – 1989 – V.55–p.1624-1629.

73. Shields M.S. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4/ M.S. Shields, M.J. Reagin, R.R.Gerger, R.Campbell, C. Somerville//Appl Environ Microbiol. – 1995 – V.61–p.1352-1356.

74. Shimizu S. Characterization of the 450-kb linear plasmid in a polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus sp.* strain RHA1/ S. Shimizu, H. Kobayashi, E. Masai, M.Fukuda //Appl Environ Microbiol. - 2001 – V.67–2021-2028.

75. Shrivastava R. Purification and characterization of benzyl alcohol-and benzaldehyde-dehydrogenase from *Pseudomonas putida* CSV86 / R. Shrivastava, A. Basu, P. S. Phale //Archives of microbiology. – 2011. – V. 193. – p. 553-563.

76. Shrivastava, R. Biodegradation of Mono-aromatic Compounds by Bacteria / R. Shrivastava, P.S. Phale // Microorganisms in Environmental Management – 2012 – V.55 – p.97-105.

77. Simon M.J. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4/ M.J. Simon, T.D. Osslund, R. Saunders, B.D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W.C. Suen, D.L. Cruden, D.T. Gibson, G.J. Zylstra // Gene. – 1993 – V.127 – p.31-37.

78. Simon MJ. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in Pseudomonas putida strains G7 and NCIB 9816-4 / M.J. Simon, T.D. Osslund, R.Saunders, B.D.

Ensley, S.Suggs, A.Harcourt, W.C. Suen, D.L. Cruden, D.T. Gibson, G.J. Zylstra // Gene – 1993 – V.127 – p.31-37.

79. Smith C.B. Alkane hydroxylase gene (*AlkB*) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton/ C.B. Smith, B.B. Tolar, J.T. Hollibaugh, G.M. King // Front Microbiol. – 2013 – V.12 – p.370.

80. Smith M.R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria //Biodegradation. – 1990 – V.2 – p.191-206.

81. Smits, T. H. M. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria / T. H. M.Smits, S. B.Balada, B.Witholt, and J. B. van Beilen // J. Bacteriol. – 2002 – V.184 – p.1733–1742.

82. Solyanikova I.P. Dioxygenases of Chlorobiphenyl-Degrading Species *Rhodococcus wratislaviensis* G10 and Chlorophenol-Degrading Species *Rhodococcus opacus* 1CP Induced in Benzoate-Grown Cells and Genes Potentially Involved in These Processes/ I.P. Solyanikova, O.V. Borzova, E.V. Emelyanova, E.S. Shumkova, N.V. Prisyazhnaya, E.G. Plotnikova, L.A. Golovleva // Biochemistry (Mosc) – 2016 –V.81 – p.986-998

83. Sota M. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase/ M. Sota, H. Yano, A. Ono, R. Miyazaki, H. Ishii, H. Genka, EM. Top, M.Tsuda // J Bacteriol. – 2006 – p.188 – p.4057-4067.

84. Sowada, J. Degradation of benzo [a] pyrene by bacterial isolates from human skin/ J.Sowada, A.Schmalenberger, I.Ebner, A.Luch, T.Tralau // FEMS microbiology ecology – 2014 – V.88 – p.129-139.

85. Stach J. E. M. Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities/ J. E. M.Stach, R. G. Burns //Environmental Microbiology. – 2002. – V. 4. – №. 3 – p.12-17.

86. Steffen K.T. Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase/ K.T. Steffen, A. Hatakka, M.Hofrichter //Appl Environ Microbiol. – 2003 – V.69 – p.3957-3964.

87. Subashchandrabose S. R. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP/ S. R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, R. Naidu, M. Megharaj// Science of The Total Environment – V. 651 – p. 813-821.

88. Táncsics A. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA-DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus*

qingshengii / A. Táncsics, T. Benedek, M. Farkas, // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2014. - V.64 – p.298-301.

89. Tani, A. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter sp*. strain M-1 / T. Ishige , Y. Sakai and N. Kato // J Bacteriol – 2001 – V.183 – p.1819–1823.

90. Temitayo O. Olowomofe. Degradation of poly aromatic fractions of crude oil and detection of catabolic genes in hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Agbabu bitumen sediments in Ondo State / Temitayo O. Olowomofe, J. O. Oluyege, B.I. Aderiye, O. A. Oluwole // AIMS Microbiol. – 2019. – V.5. – p.308–323.

91. Throne-Holst M. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter sp*. strain DSM 17874 / M. Throne-Holst, A. Wentzel, T.E. Ellingsen, H.K. Kotlar, and S.B. Zotchev // Appl Environ Microbiol – 2007 – V.73– p.3327–3332.

92. Top E.M. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters/ E.M. Top, D. Springael, N.Boon // FEMS Microbiol Ecol. – 2002 – V.42. – p.199-208.

93. Toussaint A. The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids/ A. Toussaint, C. Merlin, S. Monchy, M.A. Benotmane, R. Leplae, M. Mergeay, D. Springael// Appl Environ Microbiol. – 2003 – V.69 – p.4837-4845.

94. van Beilen J.B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes/ J.B. van Beilen, S. Panke, S. Lucchini, A.G. Franchini, M. Röthlisberger, B. Witholt // Microbiology (Reading) – 2001 –V.147 – p.1621-1630.

95. van Beilen J.B. Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral-membrane alkane hydroxylases// J.B. van Beilen, T.H. Smits, S.B. Balada, F.F. Roos, T. Brunner, B. Witholt// J Bacteriol – 2005 –V.187–p.85–91.

96. van Beilen, J.B. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation / J.B.van Beilen, E.G.Funhoff // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007 – V.74 – p.13–21

97. van der Meer J.R. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria/ J.R. van der Meer, V. Sentchilo // Curr Opin Biotechnol. – 2003 – V.14 – p.248-254.

98. van der Meer JR. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds/ J.R. van der Meer, W.M. de Vos, S. Harayama, A.J. Zehnder // Microbiol Rev. - 1992 –V.56 – p.677-694.

99. van Herwijnen R. Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas sp.* LB126 / R. van Herwijnen, P. Wattiau, L. Bastiaens, L. Daal, L. Jonker, D. Springael, H.A. Govers, J.R. Parsons // Res Microbiol. – 2003 – V.154 –p.199-206.

100. Vašíčková J. Ecological risk assessment of pesticide residues in arable soils of the Czech Republic/ J. Vašíčková, M. Hvězdová, P. Kosubová, J. Hofman//Chemosphere – 2019 – V.216 – p.479-487.

101. Viggor S. Occurrence of diverse alkane hydroxylase *AlkB* genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water/ S. Viggor, M. Jõesaar, E. Vedler, R. Kiiker, L. Pärnpuu, A. Heinaru // Mar Pollut Bull. – 2015 –V.101 – p.507-516.

102. Vomberg, A. Distribution of *AlkB* genes within n-alkane-degrading bacteria/ A.Vomberg and U.Klinner // J. Appl. Microb. – 2000 – V.89 – p. 339–348.

103. Wang H. Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures/ H. Wang, B. Wang, W. Dong, X. Hu // Sci Rep. 2016 - V.6 – p.345-351.

104. Whited G.M. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1/ G.M. Whited, D.T. Gibson // J Bacteriol. – 1991 –V.173 – p.3017-3020.

105. Williams P.A. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in Pseudomonas / P.A. Williams, J.R. Sayers // Biodegradation. – 1994 – V.5 – p.195-217.

106. Wongwongsee W. Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand/ W. Wongwongsee, P. Chareanpat, O.Pinyakong // Mar Pollut Bull. – 2013 –V.74 – p.95-104.

107. Worsey MJ. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid / M.J. Worsey, P.A.Williams // J Bacteriol. – 1975 – V.124 – p.7-13.

108. Yadav J.S. P450ome of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters/ J.S. Yadav, H. Doddapaneni, V.Subramanian // Biochem Soc Trans. – 2006 – V.34 – p.1165-1169.

109. Yi T. Novel biodegradation pathways of cyclohexane by *Rhodococcus sp.* EC1/ T. Yi, E.H. Lee, Y.G. Ahn, G.S. Hwang, K.S. Cho // J Hazard Mater. – 2011 – Jul –V.191 – p.393-396.

110. Yoon Y.H. Characterization of a new catechol branch of the beta-ketoadipate pathway induced for benzoate degradation in *Acinetobacter lwoffii* K24/ Y.H. Yoon S.H. Yun,

S.H. Park, S.Y. Seol, S.H. Leem, S.I. Kim //Biochem Biophys Res Commun. – 2007 – V.360 – p.513-519.

111. Zeyer J. Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a *Pseudomonas putida* /J. Zeyer, P. C. Kearney //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1984. – V. 32. – №. 2. – p. 238-242.

112. Zeyer J. Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2 / J. Zeyer, H.P. Kocher, K.N. Timmis // Appl Environ Microbiol – 1986 – V.52 – p.334-339.

113. Zhou, H. W. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments/ H. W. Zhou, C. L.Guo, Y. S.Wong & N. F. Y. Tam // FEMS microbiology letters – 2006 – V.262 – p.148-157.

114. Ветрова А. А. Биодеградация углеводородов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами : автореф. дис. … канд. биол. наук / Биологический ф-т МГУ им. М. В. Ломоносова. – М., 2010. – 26 с.

115. ГОСТ Р 51858-2002. Нефть. Общие технические условия: нац. стандарт Российской Федерации: принят и введен в действие постановлением Госстандарта России от 8.01.2002 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. URL: https://docs.cntd.ru/document/1200028839 (дата обращения 14.02.2023).

116. Назаров А.В. Эколого-микробиологическая оценка грунтов, загрязненных полихлорированными бифенилами/ А.В. Назаров, Д.О. Егорова, А.А.Макаренко, В.А.Демаков, Е.Г. Плотникова. // Экология человека. 2016. №3. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/ekologo-mikrobiologicheskaya-otsenka-gruntov-zagryaznennyh-polihlorirovannymi-bifenilami (дата обращения: 14.01.2023).

117. Неустроев М.М. Экологическая оценка нефтезагрязненных мерзлотных почв и разработка способов их биоремедиации. Дисс.на соиск. уч.ст. к.б.н., Якутск, - 2015. – 129 с.

118. Плотникова Н.И. Фракционный состав нефти и методы его изучения: Учебно-методическое пособие // Казань - Казанский университет, 2012. – 30 с.

119. Путилина В. С. Трансформация нефти и нефтепродуктов в почвах, горных породах, подземных водах. Загрязнение, инфильтрация, миграция, деградация. Метаболиты / В. С. Путилина, И. В. Галицкая, Т. И. Юганова // Экология. Серия аналитических обзоров мировой литературы. – 2019. – № 108. – С. 1-112.

120. Франк Ю. А.Повышение эффективности ремедиации нефтезагрязненных почв в природно-климатических условиях севера Томской области и сопредельных регионов с применением аборигенных микроорганизмов / Ю. А.Франк, К. Л.Никитчук, А.

А.Сапега, Е. А. Лукьянова, Д. А. Ивасенко, А. В. Косов, А. Л. Герасимчук, Н.С.Евсеева // Известия ТПУ - 2020. - №9. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/povyshenie-effektivnosti-remediatsii-neftezagryaznennyh-pochv-v-prirodno-klimaticheskih-usloviyah-severa-tomskoy-oblasti-i (дата обращения: 07.04.2023).

121. Химия нефти и газа: учеб. пособие для вузов / В.А.Проскуряков, Драпкина Е.Е.// Санкт-Петербург : Химия, 1996. – 446с.

122. Шамраев А. В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды/ А. В. Шамраев, Т. С. Шорина // Вестник ОГУ. 2009. №6. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-nefti-i-nefteproduktov-na-razlichnye-komponenty-okruzhayuschey-sredy (дата обращения: 18.03.2023).

123. Шелепова В.С. Бензапирен - химико-биологическая проблемы современности (c20h12)/ В.С. Шелепова, А.В. Звягинцева // Пожарная безопасность: проблемы и перспективы. 2017. №8. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/benzapiren-himiko-biologicheskaya-problemy-sovremennosti-s20h12 (дата обращения: 02.02.2023).

124. Янкевич М.И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра/ М.И. Янкевич, В.В. Хадеева, В.П. Мурыгина // Биосфера. 2015. №2. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/bioremediatsiya-pochv-vchera-segodnya-zavtra (дата обращения: 07.12.2022).

АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

СПРАВКА

Томский Государственный Университет

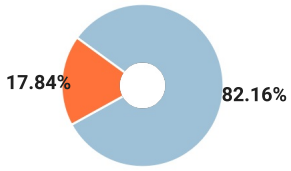
о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Сагдеева Стелла Артемовна
Самоцитирование рассчитано для: Сагдеева Стелла Артемовна
Название работы: Bez_Literatury_Sagdeeva_AA
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВПАДЕНИЯ	17.84%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	82.16%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 06.06.2023

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.2, 5-51

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Переводные заимствования издательства Wiley ; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразирования по коллекции

Работу проверил: Большакова Наталия Павловна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.