
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 579.23; 579.22; 579.25; 579.8; 579.06

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ДЕГРАДАЦИЮ ФЕНОЛА, В ГЕНОМЕ БАКТЕРИЙ ШТАММА *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

М. И. МАНДРИК¹⁾, А. Э. ОХРЕМЧУК²⁾, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ²⁾,
Э. В. ТРУШЛИС¹⁾, А. Ю. ЛАРЧЕНКО¹⁾, С. Л. ВАСИЛЕНКО¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Беларусь

Образец цитирования:

Мандрик МИ, Охремчук АЭ, Валентович ЛН, Трушлис ЭВ, Ларченко АЮ, Василенко СЛ. Характеристика генетических локусов, определяющих деградацию фенола, в геноме бактерий штамма *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;1:27–40.

EDN: HMLZLH

For citation:

Mandryk MI, Akhremchuk AE, Valentovich LN, Trushlis EV, Larchenka AYU, Vasylenko SL. Characteristics of phenol degradation genetic loci in the genome of bacteria *Rhodococcus pyridinivorans* strain 5Ap. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;1:27–40. Russian.

EDN: HMLZLH

Авторы:

Мария Ивановна Мандрик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры микробиологии биологического факультета.

Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Элла Вячеславовна Трушлис – стажер младшего научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Алина Юрьевна Ларченко – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета. Научный руководитель – М. И. Мандрик.

Светлана Леонидовна Василенко – кандидат биологических наук; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Maryia I. Mandryk, PhD (biology), docent; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology.

charynmi@bsu.by

Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

akhremchuk@bio.bsu.by

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

valentovich@mbio.bas-net.by

Ella V. Trushlis, junior researcher trainee at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.

trushlisella@gmail.com

Alina Yu. Larchenka, postgraduate student at the department of microbiology, faculty of biology.

larch.alina@gmail.com

Svetlana L. Vasylenko, PhD (biology); head of the department of microbiology, faculty of biology.

vasylenko@tut.by



Охарактеризована динамика роста бактерий штамма *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap в среде с фенолом (200 мг/л). Бактерии достигают стационарной фазы через 24 ч культивирования. К этому времени происходит полная утилизация фенола. В результате полногеномного секвенирования установлено, что геном бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap представлен кольцевой хромосомой размером 5 220 735 пар нуклеотидов (номер в базе данных GenBank CP063450.1) и тремя кольцевыми мегаплазмидами – pSID размером 250 428 пар нуклеотидов (CP063453.1), pRh5Ap-243 размером 243 288 пар нуклеотидов (CP063452.1) и pNAPH размером 207 815 пар нуклеотидов (CP063451.1). Сравнение организации генов β-кетoadипатного пути биodeградации фенола в геномах 78 бактерий рода *Rhodococcus* групп В (подгруппы В1 и В2), С и D показало, что, несмотря на высокий уровень синтении в целом, каждая группа обладает особенностями в строении исследуемых локусов. В отличие от остальных групп у бактерий группы С опероны *pheA2A1* и *catABC* разделены тремя генами, в том числе генами *fadA* и *fadI*, которые определяют альтернативную возможность окисления фенола с образованием сукцинил-КоА (у других групп, по всей вероятности, образуется только ацетил-КоА). У родококков группы С и подгруппы В1 в геноме присутствует дополнительный локус, включающий гены *pheA2*, *pheA1* и *catA*. Второй локус у бактерий подгруппы В1, групп С и D представлен оперонами *pcaIJ* и *pcaHGBLRF*, тогда как у бактерий подгруппы В2 он включает опероны *pcaIJ* и *pcaBLRF*, а оперон *pcaHG*, кодирующий компоненты пирокатехин-3,4-диоксигеназы, расположен в ином локусе хромосомы. Регуляторные области оперонов *pheA2A1* и *catABC* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap сходны с известными и содержат сайты связывания как специфических регуляторных белков PheR и CatR соответственно, так и глобального регулятора катаболизма CRP. В результате анализа межгенной области *pcaI* – *pcaB* бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap выявлены шесть потенциальных сайтов связывания белка PcaR. Характер расположения данных сайтов может свидетельствовать о двойной роли регуляторного белка PcaR: как репрессора в не связанном с эффектором состоянии и как активатора в связанном с эффектором состоянии.

Ключевые слова: *Rhodococcus*; бактерии-деструкторы; фенол; генетические локусы; гены биodeградации; регуляция.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» на 2021–2025 гг. (задание 3.6.2) при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Министерства образования Республики Беларусь (грант № Б22МВ-029).

CHARACTERISTICS OF PHENOL DEGRADATION GENETIC LOCI IN THE GENOME OF BACTERIA *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* STRAIN 5Ap

M. I. MANDRYK^a, A. E. AKHREMCHUK^b, L. N. VALENTOVICH^b,
E. V. TRUSHLIS^a, A. Yu. LARCHENKA^a, S. L. VASYLENKO^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Akademika Kuprevicha Street, Minsk 220084, Belarus

Corresponding author: M. I. Mandryk (charynyi@bsu.by)

The growth dynamics of the bacteria *Rhodococcus pyridinivorans* strain 5Ap in a medium with phenol (200 mg/L) was characterised. The bacteria reach the stationary phase after 24 h of cultivation. By this time phenol is completely utilised. As a result of whole-genome sequencing, it was established that the genome of bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap is represented by a circular chromosome with a size of 5 220 735 base pairs (number in the GenBank database CP063450.1) and three circular megaplasmids – pSID with a size of 250 428 base pairs (CP063453.1), pRh5Ap-243 with a size of 243 288 base pairs (CP063452.1) and pNAPH with a size of 207 815 base pairs (CP063451.1). A comparison of the organisation of genes of the β-ketoadipate phenol degradation pathway in the genomes of 78 bacteria of the genus *Rhodococcus* of groups В (subgroups В1 and В2), С and D showed that, despite the high level of synteny in general, each group has characteristic features in the structure of the studied loci. Unlike other groups, in genomes of group С bacteria the *pheA2A1* and *catABC* operons are separated by three genes, including *fadA* and *fadI* genes, which determine the alternative possibility of phenol oxidation with the formation of succinyl-CoA (in other groups, likely, only acetyl-CoA is formed). Rhodococci of group С and subgroup В1 have an additional locus in their genome, including the *pheA2*, *pheA1* and *catA* genes. The second locus in bacteria of the subgroup В1, groups С and D includes the *pcaIJ* and *pcaHGBLRF* operons, while in bacteria of the subgroup В2 it includes the *pcaIJ* and *pcaBLRF* operons, and the *pcaHG* operon, encoding the components of protocatechuate-3,4-dioxygenase, is located in a different chromosomal locus. The regulatory regions of the *pheA2A1* and *catABC* operons in the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap are similar to the known ones and contain binding sites for both the specific regulatory proteins PheR and CatR, respectively, and for the global catabolism regulator CRP. As a result of analysis of the *pcaI* – *pcaB* intergenic region of *R. pyridinivorans* strain 5Ap, six potential

binding sites for the protein PcaR were identified. The nature of the location of these sites may indicate a dual role of the regulatory protein PcaR: as a repressor in a state unbound to the effector and as an activator in a state bound to the effector.

Keywords: *Rhodococcus*; phenol-degrading bacteria; phenol; genetic loci; genes of biodegradation; regulation.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of the state programme of scientific research «Biotechnologies-2» for 2021–2025 (assignment 3.6.2) with financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research and the Ministry of Education of the Republic of Belarus (grant No. B22MV-029).

Введение

Бактерии – деструкторы фенола являются важными объектами исследования по нескольким причинам. Во-первых, фенол широко используется в различных отраслях промышленности и, попадая в окружающую среду с выбросами, становится токсичным загрязнителем. Его концентрация в стоках может значительно превышать предельно допустимую концентрацию (ПДК) (установленная Всемирной организацией здравоохранения ПДК фенола в водах хозяйственного назначения составляет 1 мкг/л) [1].

Во-вторых, некоторые фенолмонооксигеназы обладают расширенным спектром субстратной специфичности, окисляя не только фенол, но и его производные: 2-хлорфенол, 4-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 4-метилфенол [2]. Хлорированные производные фенола относятся к приоритетным загрязнителям, так как, помимо непосредственного токсичного воздействия на живые организмы, они являются предшественниками полихлорированных диоксинов – суперэкоотоксикантов с канцерогенным действием [3].

В-третьих, ряд ферментов β -кетoadипатного и пирокатехинового путей деградации фенола вовлечены в деградацию других моноциклических ароматических соединений, в частности бензойной кислоты и фталатов [4; 5], которые входят в состав пластификаторов и являются одними из приоритетных загрязнителей экосистем [6].

В-четвертых, фенольные соединения образуются при обработке лигноцеллюлозы (дешевого и возобновляемого источника углеводов) в процессе получения потенциального сырья для микробного синтеза биотоплива. Но не все микроорганизмы, способные утилизировать образовавшиеся углеводы, обладают устойчивостью к фенолам. В связи с этим рассматриваются варианты предварительного удаления фенольных соединений бактериями-деструкторами [7].

Во всех перечисленных направлениях одними из наиболее перспективных являются бактерии рода *Rhodococcus*. Они имеют крупные и пластичные геномы. Гены биodeградации (в том числе фенола) чаще всего представлены несколькими копиями, которые кодируют изоформы ферментов, обладающие разной субстратной специфичностью или активные в разных условиях [2; 7]. Кроме того, родококки могут приспосабливаться к неблагоприятным условиям: путем адаптивной селекции добивались ускорения деградации фенола при различных температурах, высокой концентрации загрязнителя [1; 6; 8; 9].

Важным условием для направленной работы по увеличению деградативного потенциала (путем адаптивной селекции и генно-инженерных манипуляций [10]) является знание генетической организации путей биodeградации фенола и их регуляторных областей. К настоящему времени известно, что гены биodeградации фенола у бактерий рода *Rhodococcus* имеют хромосомную локализацию, что крайне выгодно при использовании бактерий этого рода, так как они не потеряют своих свойств в случае утраты плазмиды. Регуляция экспрессии генов биodeградации фенола осуществляется на уровне транскрипции несколькими регуляторами (как активаторами, так и репрессорами), при этом фенол выступает индуктором (по ряду данных, единственным [11; 12], однако есть сведения, что катехол и некоторые другие ароматические соединения также могут служить индукторами, хотя и более слабыми [13]). Одним из наиболее распространенных у родококков является путь ортоокисления фенола, включающий две ветви – β -кетoadипатную и пирокатехиновую. Гены, кодирующие ферменты биodeградации фенола по ортопути, собраны в опероны *pheA2A1*, *catABC*, *pca(HG)BLRF*, *pcaIJ*. И если о регуляции оперонов *pheA2A1* и *catABC* уже известно [11; 12], то регуляция оперонов *pca(HG)BLRF* и *pcaIJ* в клетках бактерий рода *Rhodococcus* мало исследована.

Целью работы были изучение способности бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать фенол и характеристика генетических детерминант, обеспечивающих эту способность.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. Объектом исследования являлись бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером БИМ В-939 Г).

Среды и растворы. Для получения ночных культур бактерии культивировали в жидкой питательной среде ПДБ (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л (pH 7,0–7,2)). Способность утилизировать фенол изучали при выращивании в жидкой минеральной среде К [14] с добавлением раствора микроэлементов по Постгейту [15]. Для определения титра клеток проводили высев на агаризованную среду ПДА (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л, агар – 15 г/л (pH 7,0–7,2)).

Изучение динамики роста бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap при культивировании с фенолом. В колбы с минеральной средой К, дополненной раствором микроэлементов и водным раствором фенола до конечной концентрации (200 мг/л), вносили дважды отмытую в физиологическом растворе ночную культуру до достижения оптической плотности при длине волны 600 нм, равной 0,05 оптической единицы (о. е.). Культивировали на орбитальном шейкере при температуре 28 °С и скорости перемешивания 140 об/мин в течение 28 ч. Каждый час измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм. Каждые 2 ч готовили серию разведений и производили высевы на среду ПДА для определения титра клеток, а также отбирали 2 мл культуральной жидкости для измерения концентрации фенола. Эксперимент проводили в двух биологических повторах, каждый из них – в двух технических повторах.

Оценка концентрации фенола. Определение концентрации фенола осуществляли с помощью спектрофотометрического метода по калибровочному графику (рис. 1). Для построения калибровочного графика использовали водные растворы фенола с известной концентрацией в диапазоне 2–30 мг/л (при более высокой концентрации фенола график теряет линейную зависимость). Определяли оптическую плотность растворов при длине волны 270 нм. Центрифугировали культуральную жидкость при скорости 10 000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеток. Измеряли оптическую плотность полученного супернатанта при длине волны 270 нм (при необходимости супернатант разводили). Отсутствие неспецифических соединений, обладающих спектром поглощения, сходным со спектром поглощения фенола, определяли при культивировании бактерий в минеральной среде К с добавлением сукцината натрия (0,2 %) в качестве источника углерода.

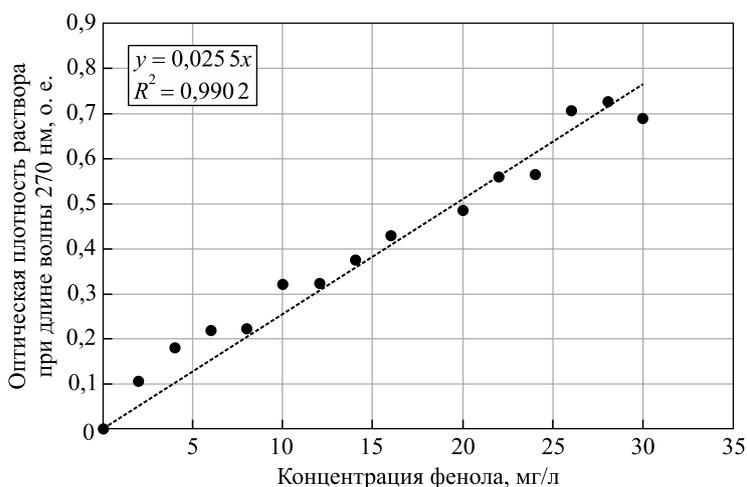


Рис. 1. Калибровочный график для определения концентрации фенола спектрофотометрическим методом

Fig. 1. Calibration graph for determining the concentration of phenol by the spectrophotometric method

Определение эффективности деградации фенола. Эффективность деградации фенола рассчитывали по формуле

$$\Theta = 100 - \frac{c_i}{c_0} \cdot 100,$$

где Θ – эффективность деградации фенола, %; c_i – текущая концентрация фенола, мг/л; c_0 – начальная концентрация фенола, мг/л.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью встроенной программы Excel (пакет Microsoft Office 2013).

Выделение тотальной ДНК. Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозидовым методом [16].

Проведение полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование выполняли на приборах MiSeq (Illumina, США) и MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Для подготовки библиотек ДНК использовали наборы Nextera XT (артикул FC-131-1024) (Illumina) и Ligation Sequencing

Kit (артикул SQK-LSK109) (*Oxford Nanopore Technologies*). Прочтения, полученные на приборе MinION, были отфильтрованы с помощью программы *Barapost* (версия 2020-09-21), а затем собраны в одну кольцевую хромосому и три кольцевые плазмиды с применением программы *Flye* (версия 2.8-b1674). Высококачественные прочтения, полученные на приборе MiSeq, использовались для проверки результатов нанопорового секвенирования и исправления ошибок с помощью программ *SPAdes* (версия 3.14.1) и *Pilon* (версия 1.24). Собранные нуклеотидные последовательности хромосомы и плазмид бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap были депонированы в базу данных GenBank под номерами CP063450.1–CP063453.1.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Для анализа нуклеотидных последовательностей хромосомы и плазмид бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap использовали программу *SnapGene Viewer* (версия 5.0.8), интернет-ресурс blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi, а также базы данных GenBank и Protein Национального центра биотехнологической информации (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

Оценка синтении генов. Синтению генов, определяющих способность утилизировать фенол, оценивали с помощью веб-сервера *SyntTax* (archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/) [17]. Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности хромосом бактерий рода *Rhodococcus* с известным таксономическим статусом (группа В – *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*, *R. gordoniae* (подгруппа В2), *R. aetherivorans*, *R. ruber* (подгруппа В1), группа С – *R. opacus*, *R. jostii*, группа D – *R. erythropolis*, *R. qingshengii*), для которых установлена способность деградировать фенол [1; 12; 18–22]. Результаты визуализировали с помощью интернет-ресурса cran.r-project.org/web/packages/gggenes/index.html.

Поиск консервативных белковых доменов. Для поиска консервативных белковых доменов использовали интернет-ресурс blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi и инструмент BLASTP.

Поиск регуляторных последовательностей. Для поиска регуляторных последовательностей и идентификации сайтов связывания транскрипционных факторов применяли программу *SigmoID* (версия 1.0.4) [23].

Результаты и их обсуждение

Бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap являются эффективными деструкторами широкого спектра углеводородных субстратов, в том числе фенола [24]. В работе был изучен рост бактерий в среде с концентрацией фенола 200 мг/л, что в 200 000 раз превышает ПДК данного соединения в водах бытового назначения¹.

При росте в среде К с фенолом (200 мг/л) у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap наблюдается выраженная лаг-фаза продолжительностью около 16–18 ч (рис. 2), затем следует экспоненциальная фаза роста, через 24 ч бактерии достигают стационарной фазы (количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл к этому времени возрастает на порядок, а оптическая плотность культуры – приблизительно на 0,25 о. е.), спустя 28 ч культивирования начинается фаза отмирания, о чем свидетельствует снижение количества КОЕ (см. рис. 2, а) и оптической плотности культуры (см. рис. 2, б).

Значимое уменьшение концентрации фенола наблюдается через 16–18 ч (рис. 3), что соответствует началу экспоненциальной фазы роста, а через 24 ч эффективность деградации фенола достигает 100%. Способность деградировать фенол описана для многих бактерий рода *Rhodococcus*, при этом на эффективность деградации данного соединения влияют его начальная концентрация в среде, количество вносимой культуры деструктора, состав минеральной среды, температура культивирования и др. В частности, бактерии штамма *Rhodococcus* sp. SKC (начальная оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм составляла около 0,03 о. е.) утилизировали 210 мг/л фенола более чем за 30 ч [25], бактерии штамма *R. ruber* C1 (начальная оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм достигала 0,05 о. е.) утилизировали 226 мг/л фенола менее чем за 10 ч [1], бактерии штамма *R. aetherivorans* UCM Ac-602 (начальная оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм была равна 0,1 о. е.) утилизировали 200 мг/л фенола за 8 ч [20]. Существенно сократить время утилизации фенола можно путем первичной адаптации бактериальной культуры: для бактерий штамма *R. erythropolis* SKO-1 время полной утилизации 500 мг/л фенола в этом случае уменьшалось с 48 до 24 ч [8].

С целью выяснить особенности организации пути биodeградации фенола и его генетической регуляции у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap была определена нуклеотидная последовательность их генома. Данные бактерии содержат одну кольцевую хромосому размером 5 220 735 пар нуклеотидов (п. н.) и три кольцевые мегаплазмиды – pSID размером 250 428 п. н., pRh5Ap-243 размером 243 288 п. н. и pNAPH размером 207 815 п. н.

¹Об установлении нормативов качества воды поверхностных водных объектов : постановление М-ва природ. ресурсов и охраны окружающей среды Респ. Беларусь от 30 марта 2015 г. № 13 // Нац. правовой интернет-портал Респ. Беларусь. 25 апр. 2015 г. № 8/29808.

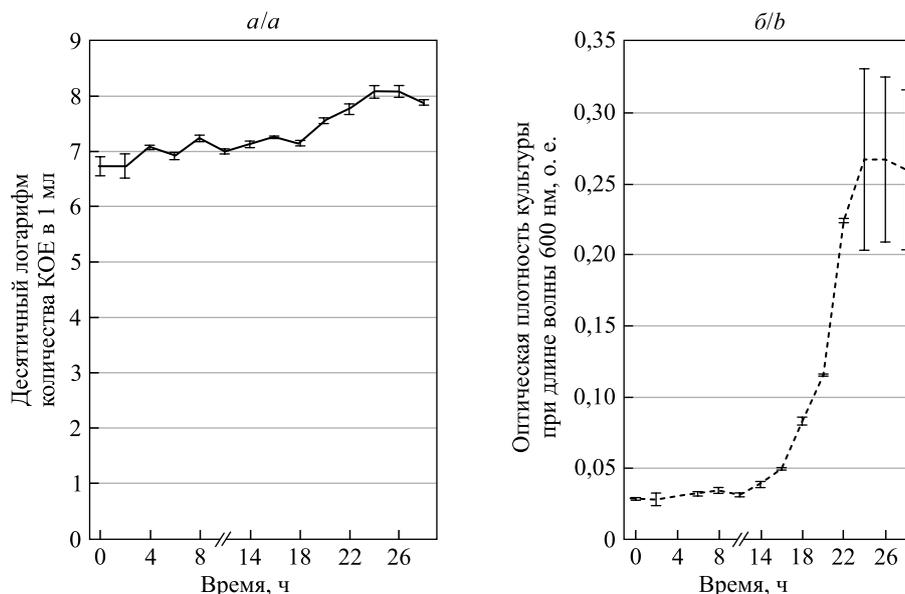


Рис. 2. Динамика роста бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap в жидкой минеральной среде с фенолом (200 мг/л):
 а – десятичный логарифм количества КОЕ в 1 мл;
 б – оптическая плотность культуры при длине волны 600 нм.

При построении графиков использованы средние значения, планки погрешности отражают среднеквадратичное отклонение

Fig. 2. Dynamics of growth of bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap in a liquid mineral medium with phenol (200 mg/L):
 а – decimal logarithm of the number of CFU in 1 mL;
 б – optical density of the culture at a wavelength of 600 nm.

When plotting the graphs, average values were used, error bars reflect the standard deviation

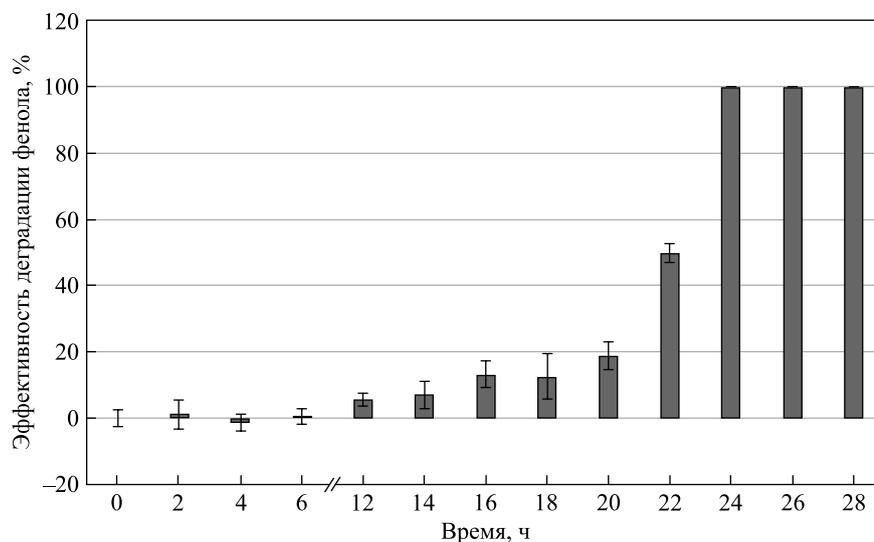


Рис. 3. Эффективность деградации фенола (200 мг/л) бактериями штамма *R. pyridinivorans* 5Ap.

При построении графиков использованы средние значения, планки погрешности отражают среднеквадратичное отклонение

Fig. 3. Phenol (200 mg/L) degradation effectiveness for bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap. When plotting the graphs, average values were used, error bars reflect the standard deviation

R. gordoniae), тогда как родококки подгруппы В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), группы С (*R. opacus*, *R. jostii*) и группы D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*) обладают более значительными отличиями.

Первый локус, включающий опероны *pheA2A1* и *catABC*, имеет идентичное строение и окружение внутри группы В (рис. 4). Во всех проанализированных геномах данной группы к оперону *pheA2A1* прилегают гены, кодирующие гипотетический белок, регулятор семейства AraC, цитохром Р450 (ген *cypX*) и его редуктазу (ген *cypY*), а затем следует оперон *benABCD*, определяющий деградацию бензоата (есть предположения, что гены *cypX* и *cypY* также входят в его состав [4]). К оперону *catABC* прилегают гены щелочной фосфатазы и гидролазы.

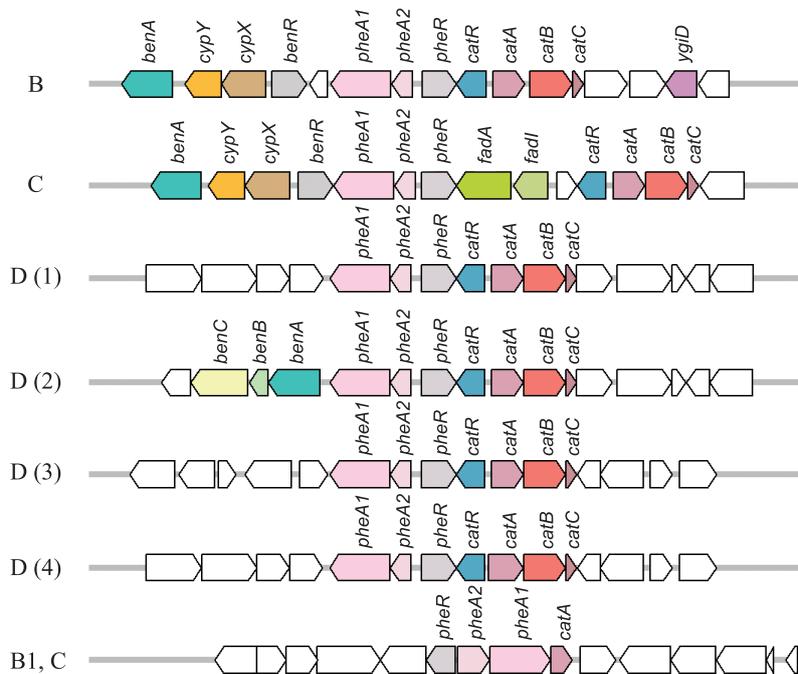


Рис. 4. Организация кластера биodeградации фенола, содержащего опероны *pheA2A1* и *catABC*, в геномах бактерий рода *Rhodococcus* различных групп

Fig. 4. Organisation of phenol degradation cluster consisting of *pheA2A1* and *catABC* operons in bacteria *Rhodococcus* genomes of different groups

В группе D можно выделить четыре подгруппы (см. рис. 4) в зависимости от окружения локусов *pheA2A1* и *catABC*. В первой и второй подгруппах представлены штаммы видов *R. erythropolis* и *R. qingshengii*. За опероном *catABC* у них следуют ген белка, содержащего НТН-домен, и ген бензальдегиддегидрогеназы. После оперона *pheA2A1* в геномах первой подгруппы располагается оперон *benABCD*, а в геномах второй подгруппы находятся гены фитаноил-КоА-диоксигеназы и оксидоредуктазы. В третью и четвертую подгруппы входят только штаммы вида *R. erythropolis*. Перед опероном *catABC* у них располагаются ген регулятора и ген гистидинкиназы/АТФазы. К оперону *pheA2A1* в геномах третьей подгруппы примыкают гены, кодирующие белки с неизвестной функцией, а в геномах четвертой подгруппы – гены фитаноил-КоА-диоксигеназы и оксидоредуктазы.

У бактерий группы С опероны *pheA2A1* и *catABC* разделены тремя генами (см. рис. 4), в том числе генами *fadA* и *fadI*, кодирующими ферменты, которые определяют альтернативную терминальную реакцию в пути окисления фенола: ацетилтрансфераза (PcaF) обеспечивает образование ацетил-КоА из β-кетoadипил-КоА, а тиоэстераза (FadA, FadI) – образование сукцинил-КоА [27]. У других групп родококков гомологи генов *fadA* и *fadI* не обнаруживаются. Кластер биodeградации бензоата у бактерий группы С прилегает непосредственно к оперону *pheA2A1*. За опероном *catABC* следует ген регулятора семейства ROK, а затем оперон, кодирующий ферменты пути Энтнера – Дудорова.

Стоит отметить, что у бактерий подгруппы В1 и группы С в геноме обнаруживается дополнительный локус (см. рис. 4, снизу), включающий гены *pheA2*, *pheA1* и *catA*, по всей вероятности объединенные в один оперон. Для бактерий штамма *R. opacus* PD630 было показано, что экспрессия генов этого оперона усиливается при высокой концентрации фенола [6]. Окружение оперона *pheA2A1catA* сходно внутри групп, но значительно отличается между подгруппой В1 и группой С. У родококков подгруппы В2 и группы D подобный локус отсутствует.

У бактерий подгруппы В2 второй локус включает опероны *pcaIJ* и *pcaBLRF*, а у бактерий подгруппы В1, групп С и D – опероны *pcaIJ* и *pcaHGBLRF* (рис. 5). У родококков подгруппы В2 оперон *pcaHG*,

кодирующий компоненты пирокатехин-3,4-диоксигеназы, располагается в ином локусе хромосомы (его координаты у исследуемых бактерий 1 955 313–1 956 736 п. н.) и имеет идентичное окружение у всех ее представителей. Несмотря на то что у бактерий подгруппы В1, групп С и D гены *pcaH* и *pcaG* расположены рядом с опероном *pcaBLRF*, их транскрипция, вероятно, разобщена либо они подвержены различной посттранскрипционной регуляции [4].

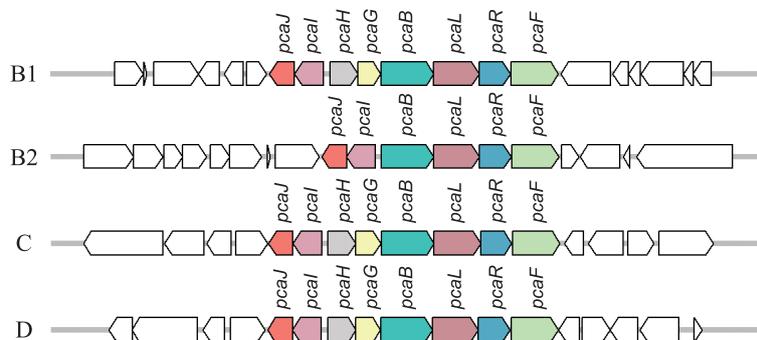


Рис. 5. Организация локуса, содержащего опероны *pcaIJ* и *pca(HG)BLRF*, в геномах бактерий рода *Rhodococcus* различных групп

Fig. 5. Organisation of locus consisting of *pcaIJ* and *pca(HG)BLRF* operons in bacteria *Rhodococcus* genomes of different groups

У бактерий подгруппы В2 к оперону *pcaIJ* прилегают гены транспортера семейства АI-E2 и метиониновой тРНК, тогда как у бактерий подгруппы В1 между опероном *pcaIJ* и указанными генами находятся еще три гена, кодирующие карбоксимуконлактондекарбоксилазу, регулятор семейства MarR и алкилпероксидазу. В геномах бактерий группы С к оперону *pcaIJ* примыкают ген формиатдегидрогеназы (однако у ряда штаммов вида *R. opacus* он отсутствует или является дефектным) и ген пурамицин-N-ацетилтрансферазы, в геномах бактерий группы D – гены регулятора семейства AraC и редуктазы карбоксипероксидазы.

К оперону *pcaBLRF* в геномах бактерий подгруппы В2 прилегает ген, кодирующий гипотетический белок (отсутствует у штаммов вида *R. gordoniae*), а затем следует ген НАДФ-зависимой оксидоредуктазы. У бактерий подгруппы В1 к оперону *pcaHGBLRF* примыкают гены MFS-транспортера и белка семейства RidA, у бактерий группы D – гены регулятора семейства MarR и оксидоредуктазы семейства SDR, у бактерий группы С – гены фосфоэстеразы и шикиматдегидрогеназы (хотя у ряда штаммов вида *R. opacus* между опероном *pcaHGBLRF* и указанными генами располагаются от одного до четырех дополнительных генов).

Выявленные закономерности позволяют предположить, что формирование локусов, отвечающих за деградацию фенола, так же как и формирование детерминант, определяющих деградацию алканов [7; 28], происходило до видообразования и, вероятно, до разделения на более крупные филогенетические группы.

В регуляции экспрессии генов биodeградации фенола, помимо специфических регуляторных белков (табл. 2), по всей видимости, принимает участие белок – регулятор катаболизма (CRP), о чем говорит наличие сайтов его связывания (выявлены с помощью программы *SigmoID*) вблизи оперонов *pheA2A1* и *catABC*, кодирующих ферменты деградации фенола.

Таблица 2

Транскрипционные факторы, предположительно обеспечивающие регуляцию экспрессии генов биodeградации фенола, у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap

Table 2

Transcription factors that presumably regulate the expression of phenol biodegradation genes in the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap

Регуляторные белки (номер локуса, номер белка в базе данных GenBank, семейство)	Длина, а. о.; молекулярная масса, кДа	Координаты, а. о.		Регулируемые гены или опероны
		ДНК- связывающий домен	Эффектор- связывающий домен	
PheR (INP59_22630, QOW01403.1, AraC)	306; 33,7	219–304	13–182	<i>pheA2A1</i>
CatR (INP59_22625, QOV98577.1, IclR)	265; 29,0	17–77	78–262	<i>catABC</i> , <i>catR</i>
PcaR (INP59_22495, QOV98552.1, IclR)	274; 29,4	23–83	84–266	<i>pcaIJ</i> , <i>pcaBL</i> , <i>pcaF</i>
PcaQ (INP59_09105, QOW00458.1, LysR)	323; 34,6	30–70	107–310	<i>pcaHG</i>

Примечание. Используются сокращения: а. о. – аминокислотные остатки.

Регуляция оперонов *pheA2A1* и *catABC* у бактерий рода *Rhodococcus* достаточно хорошо изучена. Известно, что индукция экспрессии оперонов *pheA2A1* и *catABC* происходит в присутствии фенола, при этом белок PheR является активатором оперона *pheA2A1*, а белок CatR выполняет функцию репрессора оперона *catABC* и собственного гена [11; 12]. Строение регуляторных областей оперонов *pheA2A1* и *catABC* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap сходно с таковым у других родококков. С использованием программы *SigmoID*, а также на основании сравнения с известными регуляторными последовательностями [11; 12] в межгенной области *pheR – pheA2* выявлен сайт связывания белка PheR, в межгенной области *catR – catA* – сайт связывания белка CatR. В обеих областях обнаружены сайты связывания белка CRP (рис. 6 и 7).

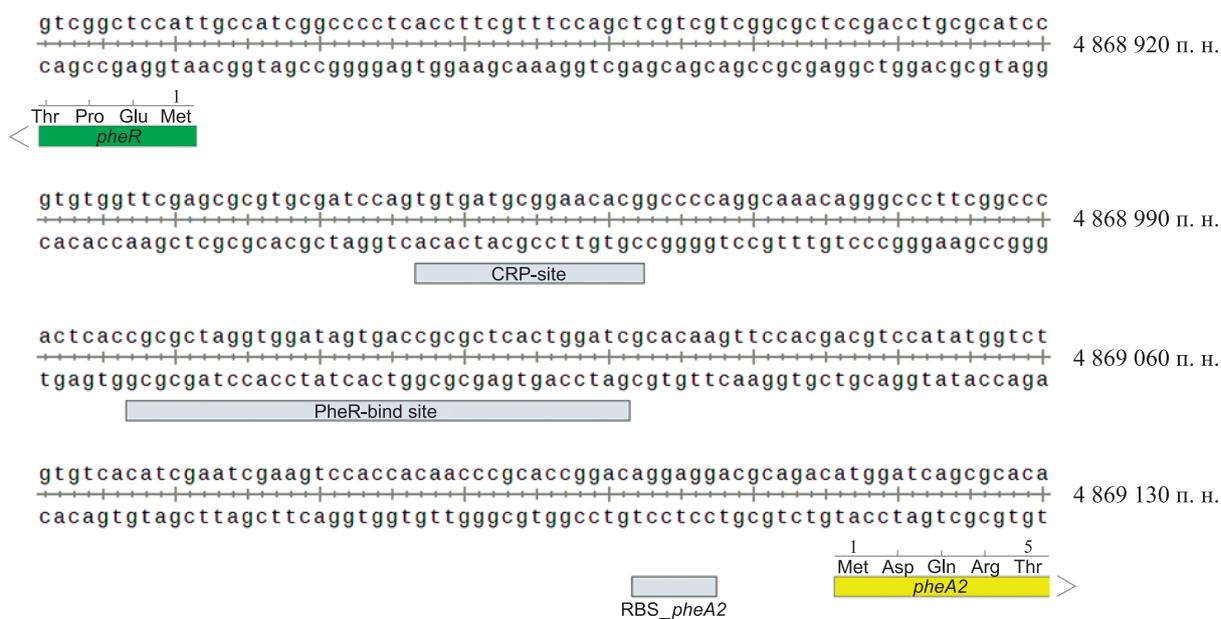


Рис. 6. Регуляторные последовательности оперона *pheA2A1* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap
 Fig. 6. Regulatory regions of the *pheA2A1* operon in the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap genome



Рис. 7. Регуляторные последовательности оперона *catABC* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap
 Fig. 7. Regulatory regions of the *catABC* operon in the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap genome

Регуляция оперонов *pcaIJ* и *pca(HG)BLRF* у бактерий рода *Rhodococcus* охарактеризована в меньшей степени. В отличие от оперонов *pheA2A1* и *catABC* *pca*-опероны не подвержены непосредственной регуляции белком CRP [29]. Об этом свидетельствует отсутствие соответствующих сайтов связывания в регуляторных областях. Для бактерий рода *Rhodococcus* не описаны сайты связывания регуляторного белка PcaR [30]. Как и у бактерий родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Corynebacterium*, регулятор *pca*-генов (оперона *pca(HG)BLRF*) у бактерий рода *Rhodococcus* относится к семейству IclR. Однако у исследуемого штамма (и всех представителей подгруппы B2) расположенный отдельно оперон *pcaHG*, по всей видимости, подвержен регуляции белком PcaQ (семейство LysR), ген которого находится перед опероном и транскрибируется дивергентно.

И. А. Суворова и М. С. Гельфанд [30] разделили транскрипционные факторы семейства IclR на три группы в зависимости от строения сайтов связывания. В соответствии с предложенной ими классификацией белки PcaR, их гомологи PcaU, PcbR, а также белок CatR входят в одну группу с мотивом сайта связывания GTNCG-N₅₋₆-CGNAC.

Некоторые особенности в строении сайтов связывания можно отметить как для различных белков, так и для промоторов разных генов, регулируемых одним и тем же белком. Так, для белка PcaU бактерий *Acinetobacter baylyi* установлена необходимость присутствия дополнительного внешнего полусайта [30; 31]. Белок PcaR бактерий *Pseudomonas putida* перед геном *pcaR* имеет сайт связывания из одного мотива, а перед опероном *pcaIJ* – сайт связывания, образованный двумя незначительно отличающимися по составу мотивами [32]. Как видно из рис. 7, сайт связывания белка CatR также образован двумя мотивами с небольшими вариациями в составе. Связывание белка PcaR бактерий *P. putida* со вторым мотивом происходит только после связывания белка в первом сайте. Такое тандемное связывание белков-регуляторов характерно для промоторов, имеющих нестандартное расстояние между областями –35 и –10 (предположительно, для того чтобы его компенсировать) [32].

В межгенной области *pcaI* – *pcaB* бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap выявлены шесть потенциальных мотивов (рис. 8), которые могут служить сайтами связывания белка PcaR.

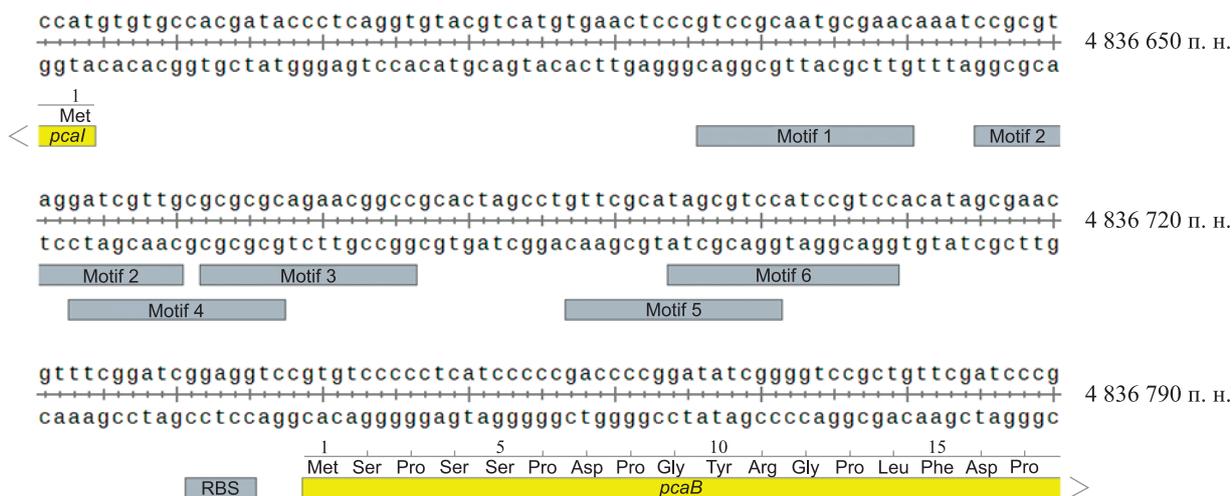


Рис. 8. Структура межгенной области *pcaI* – *pcaB* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap
 Fig. 8. Structure of the *pcaI* – *pcaB* intergenic region in the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap genome

Наиболее вероятно, что белок PcaR в клетках бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap выполняет двойную функцию (репрессора и активатора) и связывается с разными мотивами в зависимости от условий, что свойственно регуляторам семейства IclR. Например, при связывании с мотивами 1 и 5 (или 6) он играет роль репрессора, при связывании с мотивами 2–4 – роль активатора. Для бактерий штамма *R. opacus* PD630 установлено, что белок PcaR [33] работает как репрессор в не связанном с лигандом состоянии. Сравнение межгенной области *pcaI* – *pcaB* бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap с межгенной областью *pcaI* – *pcaH* бактерий штамма *R. opacus* PD630 показало, что по протяженности они отличаются всего на 2 п. н. Наиболее сходные области наблюдаются в районе мотивов 1 и 5 (по три замены), тогда как в районе мотивов 2–4 сходств крайне мало. Таким образом, бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap, по всей вероятности, обладают регуляцией экспрессии *pca*-генов, отличной от ее регуляции у бактерий штамма *R. opacus* PD630.

Заключение

Бактерии штамма *R. pyridinivorans* 5Ap могут использоваться как перспективные агенты природоохранных биотехнологий для удаления фенола из загрязненных сред, поскольку полная деструкция 200 мг/л фенола неадаптированной культурой осуществляется за 24 ч.

Геном бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap представлен кольцевой хромосомой размером 5 220 735 п. н. (номер в базе данных GenBank CP063450.1) и тремя кольцевыми мегаплазмидами – pSID размером 250 428 п. н. (CP063453.1), pRh5Ap-243 размером 243 288 п. н. (CP063452.1) и pNAPH размером 207 815 п. н. (CP063451.1).

Детерминанты, определяющие способность исследуемых бактерий утилизировать фенол по β -кетoadипатному пути, находятся в двух локусах хромосомы: первый локус включает опероны *pheA2A1* и *catABC* (координаты на хромосоме 4 864 493–4 871 330 п. н.), а также их регуляторные гены, второй локус представлен оперонами *pcaIJ* и *pcaBLRF* (4 835 194–4 841 309 п. н.). Внутри вида *R. pyridinivorans* данные локусы, в том числе окружение целевых оперонов, характеризуются высоким уровнем синтении. Сходную организацию обнаруживают и близкородственные виды, входящие в подгруппу B2 (*R. rhodochrous*, *R. gordoniae*), тогда как родококки подгруппы B1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), группы C (*R. opacus*, *R. jostii*) и группы D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*) обладают более значительными отличиями. В частности, у бактерий группы C опероны *pheA2A1* и *catABC* разделены тремя генами, в том числе генами *fadA* и *fadI*, которые определяют альтернативную возможность окисления фенола с образованием сукцинил-КоА. У других групп, по всей вероятности, образуется только ацетил-КоА. Кроме того, у родококков группы C, равно как и у родококков подгруппы B1, в геноме присутствует дополнительный локус, включающий гены *pheA2*, *pheA1* и *catA*.

Второй локус у бактерий подгруппы B2 включает опероны *pcaIJ* и *pcaBLRF*, а у бактерий подгруппы B1, групп C и D – опероны *pcaIJ* и *pcaHGBLRF*. У бактерий подгруппы B2 оперон *pcaHG*, кодирующий компоненты пирокатехин-3,4-диоксигеназы, расположен в ином локусе хромосомы (его координаты у исследуемых бактерий 1 955 313–1 956 736 п. н.).

Регуляторные области оперонов *pheA2A1* и *catABC* у бактерий штамма *R. pyridinivorans* 5Ap сходны с известными и содержат сайты связывания как специфических регуляторных белков PheR и CatR соответственно, так и глобального регулятора катаболизма CRP.

Расположение сайтов связывания регуляторных белков в межгенной области *pcaI* – *pcaB* у бактерий рода *Rhodococcus* ранее описано не было. В результате анализа данного участка выявлены шесть потенциальных сайтов связывания белка PcaR. Характер их расположения может свидетельствовать о двойной роли регуляторного белка PcaR: как репрессора в не связанном с эффектором состоянии и как активатора в связанном с эффектором состоянии.

Библиографические ссылки

1. Zhao T, Gao Y, Yu T, Zhang Y, Zhang Z, Zhang L, et al. Biodegradation of phenol by a highly tolerant strain *Rhodococcus ruber* C1: biochemical characterization and comparative genome analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;208:111709. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111709.
2. Gröning JAD, Eulberg D, Tischler D, Kaschabek SR, Schlömann M. Gene redundancy of two-component (chloro)phenol hydroxylases in *Rhodococcus opacus* 1CP. *FEMS Microbiology Letters*. 2014;361(1):68–75. DOI: 10.1111/1574-6968.12616.
3. Покрышкин СА, Косяков ДС, Кожевников АЮ, Лахманов ДЕ, Ульяновский НВ. Высокочувствительное определение хлорфенолов в морской воде методом газовой хроматографии – тандемной масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии*. 2018;73(10):768–775. DOI: 10.1134/s0044450218100092.
4. Patrauchan MA, Florizone C, Dosanjh M, Mohn WW, Davies J, Eltis LD. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(12):4050–4063. DOI: 10.1128/jb.187.12.4050-4063.2005.
5. Basu S, Dhar R, Bhattacharyya M, Dutta TK. Biochemical and multi-omics approaches to obtain molecular insights into the catabolism of the plasticizer benzyl butyl phthalate in *Rhodococcus* sp. strain PAE-6. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(4):e04801-22. DOI: 10.1128/spectrum.04801-22.
6. Yoneda A, Henson WR, Goldner NK, Park KJ, Forsberg KJ, Kim SJ, et al. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(5):2240–2254. DOI: 10.1093/nar/gkw055.
7. Bukliarevich HA, Gurinovich AS, Filonov AE, Titok MA. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monooxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus*. *Microbiology*. 2023;92(2):242–255. DOI: 10.1134/s0026261722603311.
8. Soudi MR, Kolahchi N. Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Progress in Biological Sciences*. 2011;1(1):31–40. DOI: 10.22059/pbs.2011.22457.
9. Margesin R, Fonteyne P-A, Redl B. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in Microbiology*. 2005;156(1):68–75. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.08.002.
10. Rucká L, Nešvera J, Pátek M. Biodegradation of phenol and its derivatives by engineered bacteria: current knowledge and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(9):174. DOI: 10.1007/s11274-017-2339-x.

11. Veselý M, Knoppová M, Nešvera J, Pátek M. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;76(1):159–168. DOI: 10.1007/s00253-007-0997-6.
12. Szókö J, Rucká L, Šimčíková M, Halada P, Nešvera J, Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(19):8267–8279. DOI: 10.1007/s00253-014-5881-6.
13. Čejková A, Masák J, Jirků V, Veselý M, Pátek M, Nešvera J. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21(3):317–321. DOI: 10.1007/s11274-004-2152-1.
14. Ившина ИБ, Каменских ТН, Ляпунов ЯЭ, составители. *Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов*. Ившина ИБ, редактор. Москва: Наука; 1994. 163 с.
15. Романенко ВИ, Кузнецов СИ. *Экология микроорганизмов пресных водоемов*. Стрелков АА, Буторин НВ, Вайнштейн БА, Камшилов ММ, Мордухай-Болтовской ФД, Поддубный АГ и др., редакторы. Ленинград: Наука; 1974. 194 с.
16. te Riele H, Michel B, Ehrlich SD. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *PNAS*. 1986; 83(8):2541–2545. DOI: 10.1073/pnas.83.8.2541.
17. Oberto J. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:4. DOI: 10.1186/1471-2105-14-4.
18. Przybulewska K, Wiczorek A, Nowak A, Pochrzyszcz M. The isolation of microorganisms capable of phenol degradation. *Polish Journal of Microbiology*. 2006;55(1):63–67.
19. Jones AL, Brown JM, Mishra V, Perry JD, Steigerwalt AG, Goodfellow M. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54(2):407–411. DOI: 10.1099/ijs.0.02756-0.
20. Nogina T, Fomina M, Dumanskaya T, Zelena L, Khomenko L, Mikhailovsky S, et al. A new *Rhodococcus aetherivorans* strain isolated from lubricant-contaminated soil as a prospective phenol-biodegrading agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; 104(8):3611–3625. DOI: 10.1007/s00253-020-10385-6.
21. Roell GW, Carr RR, Campbell T, Shang Z, Henson WR, Czajka JJ, et al. A concerted systems biology analysis of phenol metabolism in *Rhodococcus opacus* PD630. *Metabolic Engineering*. 2019;55:120–130. DOI: 10.1016/j.ymben.2019.06.013.
22. Shahabivand S, Mortazavi SS, Mahdavinia GR, Darvishi F. Phenol biodegradation by immobilized *Rhodococcus qingshengii* isolated from coking effluent on Na-alginate and magnetic chitosan-alginate nanocomposite. *Journal of Environmental Management*. 2022;307:114586. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114586.
23. Nikolaichik Y, Damienian AU. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. *PeerJ*. 2016;4:e2056. DOI: 10.7717/peerj.2056.
24. Charniauskaya MI, Bukliarevich AA, Delegan YaA, Akhremchuk AE, Filonov AE, Titok MA. Biodiversity of hydrocarbon-oxidizing soil bacteria from various climatic zones. *Microbiology*. 2018;87(5):699–711. DOI: 10.1134/s0026261718050065.
25. Wen Y, Li C, Song X, Yang Y. Biodegradation of phenol by *Rhodococcus* sp. strain SKC: characterization and kinetics study. *Molecules*. 2020;25(16):3665. DOI: 10.3390/molecules25163665.
26. Pathak A, Chauhan A, Blom J, Indest KJ, Jung CM, Stothard P, et al. Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* strain M213 particularly for naphthalene degradation. *PLOS One*. 2016;11(8):e0161032. DOI: 10.1371/journal.pone.0161032.
27. Lee GLY, Zakaria NN, Futamata H, Suzuki K, Zulkharnain A, Shaharuddin NA, et al. Metabolic pathway of phenol degradation of a cold-adapted Antarctic bacteria, *Arthrobacter* sp. *Catalysts*. 2022;12(11):1422. DOI: 10.3390/catal12111422.
28. Nie Y, Chi C-Q, Fang H, Liang J-L, Lu S-L, Lai G-L, et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*. 2014;4:4968. DOI: 10.1038/srep04968.
29. Moreno R, Rojo F. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(5):1539–1545. DOI: 10.1128/jb.01604-07.
30. Suvorova IA, Gelfand MS. Comparative analysis of the IclR-family of bacterial transcription factors and their DNA-binding motifs: structure, positioning, co-evolution, regulon content. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:675815. DOI: 10.3389/fmicb.2021.675815.
31. Jerg B, Gerischer U. Relevance of nucleotides of the PcaU binding site from *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology*. 2008;154(3): 756–766. DOI: 10.1099/mic.0.2007/013508-0.
32. Guo Z, Houghton JE. PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the –35 and the –10 promoter elements. *Molecular Microbiology*. 1999;32(2):253–263. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01342.x.
33. Diao J, Carr R, Moon TS. Deciphering the transcriptional regulation of the catabolism of lignin-derived aromatics in *Rhodococcus opacus* PD630. *Communications Biology*. 2022;5:1109. DOI: 10.1038/s42003-022-04069-2.

References

1. Zhao T, Gao Y, Yu T, Zhang Y, Zhang Z, Zhang L, et al. Biodegradation of phenol by a highly tolerant strain *Rhodococcus ruber* C1: biochemical characterization and comparative genome analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;208:111709. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111709.
2. Gröning JAD, Eulberg D, Tischler D, Kaschabek SR, Schlömann M. Gene redundancy of two-component (chloro)phenol hydroxylases in *Rhodococcus opacus* 1CP. *FEMS Microbiology Letters*. 2014;361(1):68–75. DOI: 10.1111/1574-6968.12616.
3. Pokryshkin SA, Kosyakov DS, Kozhevnikov AYU, Lakhmanov DE, Ul'yanovskii NV. [Highly sensitive determination of chlorophenols in sea water by gas chromatography – tandem mass spectrometry]. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2018;73(10):768–775. Russian. DOI: 10.1134/s0044450218100092.
4. Patrauchan MA, Florizone C, Dosanjh M, Mohn WW, Davies J, Eltis LD. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(12):4050–4063. DOI: 10.1128/jb.187.12.4050-4063.2005.
5. Basu S, Dhar R, Bhattacharyya M, Dutta TK. Biochemical and multi-omics approaches to obtain molecular insights into the catabolism of the plasticizer benzyl butyl phthalate in *Rhodococcus* sp. strain PAE-6. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(4):e04801-22. DOI: 10.1128/spectrum.04801-22.

6. Yoneda A, Henson WR, Goldner NK, Park KJ, Forsberg KJ, Kim SJ, et al. Comparative transcriptomics elucidates adaptive phenol tolerance and utilization in lipid-accumulating *Rhodococcus opacus* PD630. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(5):2240–2254. DOI: 10.1093/nar/gkw055.
7. Bukliarevich HA, Gurinovich AS, Filonov AE, Titok MA. Molecular genetic and functional analysis of the genes encoding alkane 1-monoxygenase synthesis in members of the genus *Rhodococcus*. *Microbiology*. 2023;92(2):242–255. DOI: 10.1134/s0026261722603311.
8. Soudi MR, Kolahchi N. Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. *Progress in Biological Sciences*. 2011;1(1):31–40. DOI: 10.22059/pbs.2011.22457.
9. Margesin R, Fonteyne P-A, Redl B. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in Microbiology*. 2005;156(1):68–75. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.08.002.
10. Rucká L, Nešvera J, Pátek M. Biodegradation of phenol and its derivatives by engineered bacteria: current knowledge and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;33(9):174. DOI: 10.1007/s11274-017-2339-x.
11. Veselý M, Knoppová M, Nešvera J, Pátek M. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;76(1):159–168. DOI: 10.1007/s00253-007-0997-6.
12. Szököl J, Rucká L, Šimčíková M, Halada P, Nešvera J, Pátek M. Induction and carbon catabolite repression of phenol degradation genes in *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus jostii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(19):8267–8279. DOI: 10.1007/s00253-014-5881-6.
13. Čejková A, Masák J, Jirků V, Veselý M, Pátek M, Nešvera J. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005;21(3):317–321. DOI: 10.1007/s11274-004-2152-1.
14. Ivshina IB, Kamenskikh TN, Lyapunov YaE, compilers. *Katalog shtammov Regional'noi profilirovannoi kollekcii alkanotrofnikh mikroorganizmov* [Catalog of strains of the Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms]. Ivshina IB, editor. Moscow: Nauka; 1994. 163 p. Russian.
15. Romanenko VI, Kuznetsov SI. *Ehкологиya mikroorganizmov presnykh vodoemov* [Ecology of freshwater microorganisms]. Strelkov AA, Butorin NV, Vainshtein BA, Kamshilov MM, Mordukhai-Boltovskoi FD, Poddubnyi AG, et al., editors. Leningrad: Nauka; 1974. 194 p. Russian.
16. te Riele H, Michel B, Ehrlich SD. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *PNAS*. 1986; 83(8):2541–2545. DOI: 10.1073/pnas.83.8.2541.
17. Oberto J. SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:4. DOI: 10.1186/1471-2105-14-4.
18. Przybulewska K, Wieczorek A, Nowak A, Pochrzyszcz M. The isolation of microorganisms capable of phenol degradation. *Polish Journal of Microbiology*. 2006;55(1):63–67.
19. Jones AL, Brown JM, Mishra V, Perry JD, Steigerwalt AG, Goodfellow M. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54(2):407–411. DOI: 10.1099/ijs.0.02756-0.
20. Nogina T, Fomina M, Dumanskaya T, Zelena L, Khomenko L, Mikhalevsky S, et al. A new *Rhodococcus aetherivorans* strain isolated from lubricant-contaminated soil as a prospective phenol-biodegrading agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; 104(8):3611–3625. DOI: 10.1007/s00253-020-10385-6.
21. Roell GW, Carr RR, Campbell T, Shang Z, Henson WR, Czajka JJ, et al. A concerted systems biology analysis of phenol metabolism in *Rhodococcus opacus* PD630. *Metabolic Engineering*. 2019;55:120–130. DOI: 10.1016/j.ymben.2019.06.013.
22. Shahabivand S, Mortazavi SS, Mahdavinia GR, Darvishi F. Phenol biodegradation by immobilized *Rhodococcus qingshengii* isolated from coking effluent on Na-alginate and magnetic chitosan-alginate nanocomposite. *Journal of Environmental Management*. 2022;307:114586. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114586.
23. Nikolaichik Y, Damienikan AU. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals. *PeerJ*. 2016;4:e2056. DOI: 10.7717/peerj.2056.
24. Charniauskaya MI, Bukliarevich AA, Deleган YaA, Akhremchuk AE, Filonov AE, Titok MA. Biodiversity of hydrocarbon-oxidizing soil bacteria from various climatic zones. *Microbiology*. 2018;87(5):699–711. DOI: 10.1134/s0026261718050065.
25. Wen Y, Li C, Song X, Yang Y. Biodegradation of phenol by *Rhodococcus* sp. strain SKC: characterization and kinetics study. *Molecules*. 2020;25(16):3665. DOI: 10.3390/molecules25163665.
26. Pathak A, Chauhan A, Blom J, Indest KJ, Jung CM, Stothard P, et al. Comparative genomics and metabolic analysis reveals peculiar characteristics of *Rhodococcus opacus* strain M213 particularly for naphthalene degradation. *PLOS One*. 2016;11(8):e0161032. DOI: 10.1371/journal.pone.0161032.
27. Lee GLY, Zakaria NN, Futamata H, Suzuki K, Zulkharnain A, Shaharuddin NA, et al. Metabolic pathway of phenol degradation of a cold-adapted Antarctic bacteria, *Arthrobacter* sp. *Catalysts*. 2022;12(11):1422. DOI: 10.3390/catal12111422.
28. Nie Y, Chi C-Q, Fang H, Liang J-L, Lu S-L, Lai G-L, et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Scientific Reports*. 2014;4:4968. DOI: 10.1038/srep04968.
29. Moreno R, Rojo F. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(5):1539–1545. DOI: 10.1128/jb.01604-07.
30. Suvorova IA, Gelfand MS. Comparative analysis of the IelR-family of bacterial transcription factors and their DNA-binding motifs: structure, positioning, co-evolution, regulon content. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:675815. DOI: 10.3389/fmicb.2021.675815.
31. Jerg B, Gerischer U. Relevance of nucleotides of the PcaU binding site from *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology*. 2008;154(3): 756–766. DOI: 10.1099/mic.0.2007/013508-0.
32. Guo Z, Houghton JE. PcaR-mediated activation and repression of *pca* genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the –35 and the –10 promoter elements. *Molecular Microbiology*. 1999;32(2):253–263. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01342.x.
33. Diao J, Carr R, Moon TS. Deciphering the transcriptional regulation of the catabolism of lignin-derived aromatics in *Rhodococcus opacus* PD630. *Communications Biology*. 2022;5:1109. DOI: 10.1038/s42003-022-04069-2.