Д. З. Назмутдинов (студ.), Н. Н. Порошина (студ.), Н. И. Петухова (к.биол.н., доц.)

***DEBARYOMYCES HANSENII* Д-43-1 – НОВЫЙ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЙ ДЕСТРУКТОР ФЕНОЛА**

Уфимский государственный нефтяной технический университет
450062, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1; тел. (347)2431935, e-mail: biocatNP@yandex.ru

D. Z. Nazmutdinov, N. N. Poroshina, N. I. Petukhova

***DEBARYOMYCES HANSENII* D-43-1 – NEW HALOTOLERANT PHENOL DESTRUCTOR**

Ufa State Petroleum Technological University
1, Kosmonavtov Str., 450062, Ufa, Russia; ph. (347)2431935, e-mail: biocatNP@yandex.ru

Из почвы, загрязненной нефтепродуктами, выделен новый штамм галотолерантных дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Д-43-1. Установлено, что при культивировании на жидких средах, содержащих минеральные соли и 0.5% дрожжевого автолизата, штамм растет и деградирует фенол в концентрации 500–1000 мг/л. Показано, что при концентрации фенола 750 мг/л штамм способен расти и деградировать ксенобиотик не только в слабосоленых (1–3 % хлорида натрия) средах, но и в гиперсоленых условиях (5% соли). Выявлено промежуточное соединение, максимально поглощающее свет при длине волны 255 нм, соответствующей *цис-цис*-муконовой кислоте – интермедиату пути *орто*-расщепления ароматического кольца.

Ключевые слова: биodeградация; дрожжи *Debaryomyces hansenii*; очистка сточных вод; фенол.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания сфере научной деятельности (№4.6451.2017/8.9).

Фенол является одним из наиболее часто встречающихся техногенных загрязнителей окружающей среды. Сточные воды, содержащие фенол, образуются во многих промышленных процессах, в том числе при производстве нефтепродуктов, бумаги, пластика, лекарственных соединений, красителей, пестицидов, резины, лаков, кокса, стали, взрывчатых веществ^{1–3}. При этом многие фенольные стоки являются гиперсолеными^{4–11}.

Для очистки слабосоленых стоков от фенола широко используются биологические методы с применением микроорганизмов, способ-

New strain of halotolerant yeasts *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 was isolated from soil contaminated by petroleum products. It is found that on liquid media containing mineral salts and 0.5% of yeast autolysate the strain is able to grow and degrade phenol at concentrations 500–1000 mg/l. It is shown that at 750 mg/l phenol concentration the strain is able to grow and degrade xenobiotic not only in low saline media (1–3 % of NaCl) but also in hypersaline ones (5% of salt). The intermediate with absorbance maximum of 255 nm which is relevant to *cys-cys*-muconic acid – the intermediate of aromatic ring *ortho*-degradation pathway – was found.

Key words: biodegradation; *Debaryomyces hansenii*; phenol; wastewater treatment.

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the state assignment to the sphere of science (No. 4.6451.2017/8.9).

ных полностью деградировать это соединение^{1, 3, 12}. Присутствие в сточных водах солей в высоких концентрациях (в основном хлорида натрия) существенно снижает эффективность биологической очистки, поскольку большинство известных микроорганизмов-деструкторов фенола не растут в гиперсоленых условиях, вызывающих обезвоживание и плазмолиз клеток¹³. Для эффективной биологической очистки гиперсоленых стоков с участием таких микроорганизмов необходимо предварительно снижать содержание в них солей путем обессоливания или разбавления пресной водой. Однако обессоливание стоков является дорогостоя-

Дата поступления 20.04.18

щим процессом, а их разбавление приводит к значительному увеличению объема сточных вод.

Перспективным подходом для увеличения эффективности биологической очистки гиперсоленых стоков является использование галотолерантных микроорганизмов, не только хорошо растущих в присутствии 1% хлорида натрия, но и способных также расти при более высокой солености среды (до 15%), или галофильных микробов, требующих для активного роста присутствия в среде соли в высокой концентрации (до 30%)⁴. В литературе описано несколько микроорганизмов, в том числе *Halomonas organivorans*, *Arhodomonas aquaeolei*, *Modicisalibacter tunisiensis*⁵, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pseudomallei*^{6,7}, *Rhodococcus sp.*⁸, *Debaryomyces sp.* JS4^{9,10}, *Penicillium chrysogenum*¹¹, которые могут утилизировать фенол в присутствии высоких концентраций хлорида натрия.

В настоящей работе исследована способность новой галотолерантной дрожжевой культуры Д-43-1, выделенной из почвы загрязненной нефтепродуктами, деградировать фенол в средах различной солености.

Изучение роста дрожжей Д-43-1 на агаризованных средах с различными концентрациями фенола позволило выявить высокую устойчивость дрожжей к этому соединению. На минеральной среде, содержащей 0.5% дрожжевого автолизата (среда СР-2), микроорганизмы растут в присутствии 500–1000 мг/л фенола. Более высокие концентрации ксенобиотика подавляют рост дрожжей. Однако в присутствии в среде 1% глюкозы (среда СР-1) микроорганизмы растут даже при концентрации фенола 2000 мг/л.

Исследование трансформации фенола (1000 мг/л) в 0.1 М фосфатном буфере в присутствии трехсуточной биомассы микроорганизмов (200 мг/л по сырому весу), полученной на агаризованной среде СР-2, содержащей 750 мг/л ксенобиотика, показало, что дрожжи Д-43-1 способны синтезировать ферменты для его деградации. С помощью энзиматически активной дрожжевой массы фенол практически полностью трансформируется в фосфатном буфере в течение 3 ч, в то время как в присутствии инактивированной кипячением биомассы его концентрация в реакционной смеси снижается незначительно, вероятно, вследствие адсорбции клетками дрожжей (рис. 1).

Известно, что первой стадией аэробной деградации фенола **1** микроорганизмами является его гидроксילирование с помощью фенолгидроксилазы с образованием пирокатехина **2**¹².

Рис. 1. Трансформация фенола (1000 мг/л) при 30 °С в 0.1 М фосфатном буфере, содержащем 200 мг/мл сырой биомассы дрожжей

В зависимости от вида микроорганизма ароматическое кольцо образовавшегося пирокатехина может расщепляться двумя альтернативными способами^{12,14}. В случае *орто*-расщепления пирокатехина под действием 1,2-диоксигеназы образуется *цис*, *цис*-муконовая кислота **3**, поглощающая свет при 255 нм¹⁴. При *мета*-расщеплении пирокатехина с помощью 2,3-диоксигеназы получается полуальдегид 2-оксимуконовой кислоты **4**, имеющий максимум поглощения при 375 нм¹⁴. В дальнейшем эти соединения превращаются в интермедиаты цикла трикарбоновых кислот¹².

Анализ УФ-спектров супернатантов проб, отобранных при трансформации фенола в фосфатном буфере, показали, что в ходе деградации субстрата в среде накапливается соединение с максимумом поглощения 255 нм (рис. 2а), соответствующим *цис*, *цис*-муконовой кислоте¹⁴. В то же время полуальдегид 2-оксимуконовой кислоты, поглощающий в области 375 нм¹⁴, не обнаруживается. Аналогичные результаты получены при трансформации пирокатехина (рис. 2б). Это указывает на функционирование в клетках дрожжей Д-43-1 пути *орто*-расщепления ароматического кольца пирокатехина.

Рис. 2. УФ-спектры супернатантов проб, отобранных при трансформации фенола (А) и пирокатехина (Б) в присутствии биомассы дрожжей Д-43-1

В экспериментах с жидкими культурами, растущими на среде СР-2, было установлено, что дрожжи Д-43-1 активно растут при концентрации фенола в среде 500–750 мг/л (рис. 3). В этих условиях за 18–32 ч культивирования происходит практически полная деградация ксенобиотика (рис. 4).

Рост дрожжей значительно замедляется при содержании фенола в среде 1000 мг/л, а при 1300 мг/л отсутствует (рис. 3). В течение 72 ч удается деградировать ксенобиотик полностью при концентрации 1000 мг/л и только на 12.6 % при 1300 мг/л (рис. 4).

Обнаружено, что увеличение солености среды СР-2, содержащей 750 мг/л фенола, в результате внесения 1% хлорида натрия, подавляет рост дрожжей незначительно (рис. 5). Более высокие концентрации хлорида натрия (3–7.5 %) оказывают существенное отрицательное влияние на рост дрожжей, а при 10%-ном содержании соли в среде культура не растет.

Рис. 3. Рост дрожжей при культивировании на жидкой среде СР-2 в присутствии различных концентраций фенола

Рис. 4. Дегградация фенола при культивировании дрожжей на жидкой среде СР-2 при разных концентрациях ксенобиотика

Рис. 5. Влияние хлорида натрия на рост дрожжей при культивировании на жидкой среде СР-2 в течение 48 ч

В тоже время установлено, что в присутствии 1% хлорида натрия дрожжи деградируют субстрат практически с такой же высокой

скоростью, как и в контрольном варианте без соли (рис. 6). В средах, содержащих 3–7.5 % хлорида натрия, также происходит существенное снижение концентрации фенола в среде. Однако активная деструкция фенола наступает только через 32 ч культивирования, что указывает на необходимость адаптации культуры к высоким концентрациям соли. При 3–5 %ном содержании соли в среде полная деградация фенола достигается через 72 и 120 ч соответственно.

Таким образом, дрожжевой штамм Д-43-1 является перспективным деструктором фенола не только в слабосоленых средах (1–3 % хлорида натрия), но и в гиперсоленых условиях (5% соли).

Рис. 6. Деградация фенола при культивировании дрожжей на жидкой среде СР-2 при разных концентрациях хлорида натрия

В экспериментах по идентификации культуры Д-43-1 было установлено, что дрожжи

представляют собой клетки круглой или овальной формы, вегетативно размножающиеся путем множественного многостороннего почкования, способные формировать псевдомицелий, образуют аски, содержащие 1 сферическую аскоспору, путем конъюгации между клеткой и ее почкой, не окрашиваются диазониевым синим красителем, не растут на среде без витаминов, не образуют крахмал и уреазу, не сбраживают сахара. На основании этих свойств, а также результатов исследования аэробного роста микроорганизмов на средах с различными источниками углерода и азота, представленными в табл. 1, было установлено, что культура Д-43-1 близка по описанию к виду *Debaryomyces hansenii*¹⁵.

Известно, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* благодаря своей гало- и осмоотолерантности, а также способности синтезировать практически важные продукты (липиды, полиолы, экзопептидазы, гликозидазы, токсины против патогенных микроорганизмов и др.), обладают значительным потенциалом в биотехнологии^{16–18}. Особый интерес представляет способность дрожжей *Debaryomyces hansenii* окислять широкий спектр различных субстратов, что делает перспективным их использование для решения экологических задач, в частности, для экспресс-мониторинга загрязнения водных объектов органическими соединениями¹⁹, деградации ксенобиотиков^{20, 21}.

Недавно было показано, что штамм дрожжей *Debaryomyces sp.* JS4, близкий по результатам сравнительного анализа нуклеотидной

Таблица 1

Рост дрожжей на различных источниках углерода и азота

Источник углерода/азота	Д-43-1	<i>Debaryomyces hansenii</i> ¹⁵	Источник углерода/азота	Д-43-1	<i>Debaryomyces hansenii</i> ¹⁵
глюкоза	+	+	метанол	-	-
инулин	+	v	этанол	+	+/w
сахароза	+	+	глицерин	+	+
галактоза	+	+	миоинозит	-	-
лактоза	-	v	дульцит	-	v
трегалоза	+	+	маннит	+	+
мальтоза	+	+	сорбит	+	+/w
растворимый крахмал	-	v	10% NaCl и 5% глюкозы	+	+
целлобиоза	+	+	лактат	w	v
салицин	+	+	сукцинат	+	+
l-рамноза	-	v	цитрат	w	v
d-ксилоза	+	+	d-глюконат	+	+/w
l-арабиноза	+	+/w	гексадекан	+	v
d-рибоза	-	v	нитраты	-	-
1,2-пропандиол	+	n	нитрит	+	n
50% глюкозы	w	-	l-лизин	+	n

Примечание: (-) — результат отрицательный; (+) — результат положительный; v — признак варьирует, w — результат слабый; n — данные отсутствуют

последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS-регионов) рДНК к виду *Debaryomyces hansenii*, способен деградировать фенол в присутствии 1–5 % хлорида натрия^{10, 21}.

Механизмы галотолерантности у дрожжей *Debaryomyces hansenii* в настоящее время недостаточно изучены, однако выявлено, что ключевыми факторами, влияющими на способность дрожжей расти при высоких концентрациях соли, являются: состав мембраны (стерол:фосфолипидное соотношение), наличие транспортных белков (поддерживающих определенный уровень ионов Na^+ и K^+ в клетках, транспортирующих глицерин), активность ряда ферментов и органелл^{17, 18, 22}.

Можно ожидать, что предварительная адаптация культуры дрожжей *Debaryomyces hansenii* Д-43-1 к росту при высоких концентрациях соли позволит существенно сократить время биodeградации фенола в присутствии 5% хлорида натрия.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлись дрожжи *Debaryomyces hansenii* Д-43-1, выделенные из почвы, загрязненной нефтепродуктами. Дрожжи хранили путем периодического пересева на агаризованной среде СР-1, содержащей глюкозу – 10 г/л, дрожжевой автолизат – 5 г/л, NaCl – 0.5 г/л, MgSO_4 – 0.4 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3 г/л, KH_2PO_4 – 1 г/л, K_2HPO_4 – 0.1 г/л, агар микробиологический – 15 г/л.

Идентификацию дрожжей осуществляли в соответствии с определителем¹⁵.

Исследование способности дрожжей деградировать фенол в ростовых условиях осуществляли в конических колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл жидкой среды, при 30 °С и

перемешивании (180 об./мин) в ротационно-орбитальном шейкере Environmental Shaker-Incubator ES 20/60. Использовали жидкую среду СР-2, содержащую фенол – 500, 750, 1000 или 1300 мг/л, дрожжевой автолизат – 5 г/л, NaCl – 0.5 г/л, MgSO_4 – 0.4 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3 г/л, KH_2PO_4 – 1 г/л, K_2HPO_4 – 0.1 г/л. Фенол в среду вносили после стерилизации питательной среды автоклавированием в течение 30 мин при температуре 121 °С. В экспериментах по влиянию солености среды на деградацию фенола в среду вносили хлорид натрия в концентрации 1, 3, 5, 7.5 или 10%.

Биотрансформацию фенола и пирокатехина проводили в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 1000 мг/л субстрата и 300 мг/мл биомассы дрожжей (по сырому весу), при 30 °С и перемешивании (180 об./мин) на ротационно-орбитальном шейкере Environmental Shaker-Incubator ES 20/60. Биомассу для трансформации получали культивированием дрожжей в чашках Петри на агаризованной среде СР-2, содержащей 500 мг/л фенола. Выраченную биомассу собирали в центрифужные стаканчики и дважды промывали фосфатным буфером. В качестве контроля использовали биомассу, инактивированную кипячением в течение 5 мин.

Остаточную концентрацию фенола определяли в супернатантах, полученных после центрифугирования проб при 5000 об./мин в течение 10 мин, фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина²³.

УФ-спектры супернатантов, полученных при трансформации фенола и пирокатехина, записывали на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 220–450 нм.

Рост дрожжей в жидких культурах оценивали турбодиметрически на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм.

Литература

1. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives // Eng. Life Sci.— 2013.— V.13.— Pp. 76-87.
2. Singh N., Balomajumder C. Simultaneous removal of phenol and cyanide from aqueous solution by adsorption onto surface modified activated carbon prepared from coconut shell // J. Water Process Engineering.— 2016.— V.9.— Pp.26136-26152.
3. Al-Khalid T., El-Naas M.H. Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review // Critical Reviews in Environmental Science and Technology.— 2012.— V.42.— P.1631-1690.

References

1. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H. [Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives]. Eng. Life Sci, 2013, vol.13, pp.76-87.
2. Singh N., Balomajumder C. [Simultaneous removal of phenol and cyanide from aqueous solution by adsorption onto surface modified activated carbon prepared from coconut shell]. J. Water Process Engineering, 2016, vol.9, pp.26136-26152.
3. Al-Khalid T., El-Naas M.H. [Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012, vol.42, pp.1631-1690.
4. Shi K., Zhou W., Zhao H., Zhang Y. [Performance of halophilic marine bacteria inocula on

4. Shi K., Zhou W., Zhao H., Zhang Y. Performance of halophilic marine bacteria inocula on nutrient removal from hypersaline wastewater in an intermittently aerated biological filter // *Biore-source Technology*.— 2012.— V.113.— P.280-287.
5. Bonfa M.R.L., Grossman M.J., Piubeli F., Mellado E., Durrant L.R. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments // *Biodegradation*.— 2013.— V.24.— Pp.699-709.
6. Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z.M. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei* // *J. Hazard. Mater.*— 2007.— V.149.— Pp.60-66.
7. Jiang, Y., Yang, K., Wang, H., Shang, Y., Yang, X. Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge // *Mar. Pollut. Bull.*— 2015.— V.99.— Pp.230-234.
8. Chen F., Jiang D., Tang Y. Effects of additional stimulants on phenol degradation by a halotolerant *Rhodococcus sp.* JDD1H // *Applied Mechanics and Materials*.— 2013.— V.253-255.— Pp.914-920
9. Jiang Y., Shang Y., Yang K., Wang H. Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*— 2016.— V.100.— Pp.1883-1890.
10. Jiang Y., Deng T., Shang Y., Yang K., Wang H. Biodegradation of phenol by entrapped cell of *Debaryomyces sp.* with nano-Fe₃O₄ under hypersaline conditions // *Int. Biodeter. & Biodegr.*— 2017.— V.123.— Pp.37-45.
11. Leitao A.L., Duarte M.P., Oliveira J.S. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum* // *Int. Biodeter. Biodegr.*— 2007.— V.59.— Pp.220-225.
12. Van Schie P.M., Young L.Y. Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications // *Bioremediation Journal*.— 2000.— V.4.— №1.— Pp.1-18.
13. Shen Q., Gong Y., Fang W., Bi, Z., Cheng L., Xu X., Chen H. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency // *Bioresource Technology*.— 2015.— V.193.— Pp.68-75.
14. Hamzah R.Y., Al-Baharna B.S. Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of ortho and meta pathways // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*— 1994.— V.41.— Pp.250-256.
15. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. *The Yeasts*.— Elsevier Science, 2011.— 2354 p.
16. Breuer U., Harms H. *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential // *Yeast*.— 2006.— V.23.— Pp.415-437.
17. Prista C., Michan C., Miranda I.M., Ramos J. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts // *Yeast*.— 2016.— V.33.— Pp.523-533.
18. Yaguchi A., Rives D., Blenner M. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance // *AIMS Microbiology*.— 2017.— V.3(2).— Pp.227-247.
- nutrient removal from hypersaline wastewater in an intermittently aerated biological filter]. *Biore-source Technology*, 2012, vol.113, pp.280-287.
5. Bonfa M.R.L., Grossman M.J., Piubeli F., Mellado E., Durrant L.R. [Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments]. *Biodegradation*, 2013, vol.24, pp.699-709.
6. Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z.M. [Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*]. *J. Hazard. Mater.*, 2007, vol.149, pp.60-66.
7. Jiang, Y., Yang, K., Wang, H., Shang, Y., Yang, X. [Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge]. *Mar. Pollut. Bull.*, 2015, vol.99, pp.230-234.
8. Chen F., Jiang D., Tang Y. [Effects of additional stimulants on phenol degradation by a halotolerant *Rhodococcus sp.* JDD1H]. *Applied Mechanics and Materials*, 2013, vol.253-255, pp.914-920.
9. Jiang Y., Shang Y., Yang K., Wang H. [Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol.100, pp.1883-1890.
10. Jiang Y., Deng T., Shang Y., Yang K., Wang H. [Biodegradation of phenol by entrapped cell of *Debaryomyces sp.* with nano-Fe₃O₄ under hypersaline conditions]. *Int. Biodeter. & Biodegr.*, 2017, vol.123, pp.37-45.
11. Leitao A.L., Duarte M.P., Oliveira J.S. [Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*]. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2007, vol.59, pp.220-225.
12. Van Schie P.M., Young L.Y. [Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications]. *Bioremediation Journal*, 2000, vol.4, no.1, pp.1-18.
13. Shen, Q., Gong, Y., Fang, W., Bi, Z., Cheng, L., Xu, X. & Chen, H. [Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency]. *Bioresource Technology*, 2015, vol.193, pp.68-75.
14. Hamzah R.Y., Al-Baharna B.S. [Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of ortho and meta pathways]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, vol.41, pp.250-256.
15. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. [The Yeasts]. Elsevier Science, 2011, 2354 p.
16. Breuer U., Harms H. [*Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential]. *Yeasts*, 2006, vol.23, pp.415-437.
17. Prista C., Michan C., Miranda I.M., Ramos J. [The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts]. *The Yeast*, 2016, vol.33, pp.523-533.
18. Yaguchi A., Rives D., Blenner M. [New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance]. *AIMS Microbiology*, 2017, vol.3, pp.227-247.

19. Arlyapov V., Kamanin S., Ponamoreva O., Reshetilov A. Biosensor analyzer for {BOD} index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *C. blankii*, and *Debaryomyces hansenii* // Enzyme Microb. Technol.— 2012.— V.50.— №4-5.— Pp.215-220.
20. Mandal S.K., Selvi A., Das N. A novel approach on degradation of Benzo[a]pyrene by yeast consortium isolated from contaminated soil // Der. Pharmacia Lettre.— 2016.— V.8, №7.— Pp.80-93.
21. Jiang Y., Shang Y., Yang K., Wang H. Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals // Appl. Microbiol. Biotechnol.— 2016.— V.100.— Pp.1883-1890.
22. Prista C., Loureiro-Dias M.C., Montiel V., Garci R., Ramos J. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii* // FEMS Yeast Research.— 2005.— V.5.— Pp. 693-701.
23. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод .— М.: Химия, 1984.— 448 с.
19. Arlyapov V., Kamanin S., Ponamoreva O., Reshetilov A. [Biosensor analyzer for {BOD} index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *C. blankii*, and *Debaryomyces hansenii*]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2012, vol.50, no.4-5, pp.215-220.
20. Mandal S.K., Selvi A., Das N. [A novel approach on degradation of Benzo[a]pyrene by yeast consortium isolated from contaminated soil]. *Der. Pharmacia Lettre*, 2016, vol.8, no.7, pp.80-93.
21. Jiang Y., Shang Y., Yang K., Wang H. [Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals] *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol.100, pp.1883-1890.
22. Prista C., Loureiro-Dias M.C., Montiel V., GarciR., Ramos J. [Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*]. *FEMS Yeast Research*, 2005, vol.5, pp.693-701.
23. Лурье Ю.Ю., *Analiticheskaya khimiya promyshlennykh stochnykh vod* [Analytical chemistry of industrial wastewater]. Moscow, Khimiya Publ., 1984, 448 p.