

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет

На правах рукописи



Шапиро Татьяна Наумовна

**СООБЩЕСТВА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В
НЕФТЕПРОДУКТАХ**

03.02.03-микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Лобакова Елена Сергеевна

Москва – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Нефть и нефтепродукты, как источник загрязнения окружающей среды	14
1.1.1. Нефтепродукты, наиболее подверженные биологической деградации	15
1.2. Признаки микробного поражения нефтепродуктов	17
1.2.1. Факторы, обуславливающие развитие углеводородокисляющих микроорганизмов в нефти и нефтепродуктах	19
1.3. Стратегии микроорганизмов, повышающие доступность использования углеводов нефти и нефтепродуктов	20
1.3.1. Поверхностно-активные вещества углеводородокисляющих микроорганизмов	21
1.4. Механизмы поступления углеводов в бактериальную клетку	25
1.4.1. Поглощение солюбилизированных углеводов	27
1.4.2. Поглощение углеводов путем прямого контакта клеток с гидрофобным субстратом	27
1.5. Разнообразие углеводород окисляющих микроорганизмов	29
1.5.1. Углеводородокисляющие бактерии	29
1.5.2. Углеводородокисляющие микромицеты	34
1.6. Механизмы деградации углеводов	35
1.6.1. Пути биodeградации углеводов бактериями	38
1.6.1.1. Аэробная биodeградация	39
1.6.1.2. Анаэробная биodeградация углеводов	42
1.6.2. Сообщества углеводород окисляющих микроорганизмов	42
1.7. Методы очистки от нефтезагрязнений	45
1.7.1. Биологические препараты для очистки от нефтезагрязнений	46
1.7.2. Биокomпозитные материалы на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, применяемые в биоремедиации	47
1.7.3. Типы сорбентов для иммобилизации углеводородокисляющих микроорганизмов	48

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Исследуемые образцы	51
2.2. Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов	51
2.3. Микроскопия	53
2.3.1. Световая микроскопия	53
2.3.2. Сканирующая электронная микроскопия	54
2.4. Идентификация микроорганизмов молекулярно-генетическими методами	54
2.4.1. Выделение ДНК	54
2.4.2. Полимеразная цепная реакция	55
2.4.3. Электрофорез в агарозном геле	56
2.4.4. Очистка ПЦР-продукта	56
2.4.5. Секвенирование ПЦР-продукта	57
2.4.6. Метабаркодинг некультивируемых бактерии в биомассе микромицетов	57
2.5. Детекция генов окисления углеводов и синтеза биоПАВов	59
2.6. Физиологическая характеристика выделенных штаммов бактерий	60
2.7. Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на среде с углеводородами	61
2.8. Оценка роста изолятов микромицетов на среде с углеводородами	61
2.9. Способность бактериальных штаммов к использованию модельной смеси углеводов	62
2.10. Измерение эмульгирующей активности штаммов углеводородокисляющих бактерий	63
2.11. Измерение величины поверхностного натяжения культуральной жидкости	63
2.12. Измерение степени гидрофобности поверхности клеток	64
2.13. Определение диаметра зоны, свободной от нефти	64
2.14. Изучение субстратного спектра углеводов выделенных штаммов бактерий	64
2.15. Моделирование биополимерного материала	65
2.15.1. Синтез биополимерных материалов	65

2.15.2. Изучение динамики изменения биополимерного материала в присутствии клеток углеводородокисляющих бактерий	66
2.16. Статистическая обработка данных	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1. Световая микроскопия образцов топлив	69
3.2. Выделение и идентификация микроорганизмов из образцов нефтепродуктов	71
3.3. Изучение физиологических свойств выделенных штаммов бактерий	75
3.4. Способность выделенных микроорганизмов к использованию углеводов	76
3.4.1. Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на плотной среде с добавлением модельной смеси углеводов	76
3.4.2. Оценка способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к использованию углеводов модельной смеси	77
3.5. Детекция генов окисления n-алканов у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий	81
3.6. Оценка изменения параметров среды культивирования выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий	84
3.6.1. Индекс эмульгирования штаммов углеводородокисляющих бактерий	85
3.6.2. Определение показателя гидрофобности поверхности клеток штаммов углеводородокисляющих бактерий	86
3.6.3. Определение показателя изменения поверхностного натяжения культуральной жидкости с клетками углеводородокисляющих бактерий и бесклеточного супернатанта	87
3.6.4. Детекция генов синтеза биосурфактантов у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий	91
3.7. Изучение способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к росту на различных углеводородах	93
3.7.1. Определение зоны, свободной от нефти	99
3.8. Выявление наличия грибов в изученных образцах топлива	100
3.8.1. Выделение и идентификация изолятов микромицетов из образца ТС-1	100
3.8.2. Некультивируемые бактерии в биомассе микромицетов	

3.8.3. Способность полученных сообществ углеводородокисляющих микроорганизмов к росту на топливе ТС-1 и нефти	106 113
3.9. Иммобилизация культур углеводородокисляющих бактерий на нетканых полимерных носителях	115
3.9.1. Особенности колонизации полимерных матриц углеводородокисляющими бактериями	115
3.9.2. Иммобилизация монокультур углеводородокисляющих бактерий на полимерном носителе на примере штаммов <i>Ochrobactrum</i> sp. B11 и <i>Deinococcus</i> sp. B17	117
3.10. Биodeградация модельной смеси углеводородов смешанной культурой штаммов <i>Ochrobactrum</i> sp. B11 и <i>Deinococcus</i> sp. B17 в составе полимерного материала (СПАН - свекольный жом)	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
ВЫВОДЫ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	135

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

16S pPHK – ген, кодирующий 16S рРНК

18S pPHK – ген, кодирующий 18S рРНК

АУ – ароматические углеводороды

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ДТ – дизельное топливо

ДЧЗ – диаметр чистой зоны

ИНТ – йодонитротетразолий фиолетовый

ИЭ – индекс эмульгирования

КЖ – культуральная жидкость

НП - нефтепродукты

ОП – оптическая плотность

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПАУ – полиароматические углеводороды

ПГ – показатель гидрофобности

ПН – поверхностное натяжение

рРНК – рибосомальная РНК

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УВ – углеводород

УОБ – углеводородокисляющие бактерии

УОМ – углеводородокисляющие микроорганизмы

СПАН – сополимер акрилонитрила с метилметакрилатом

КОЕ – колониеобразующие единицы

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

NGS – высокопроизводительное секвенирование [Next-Generation Sequencing]

V4 – гипервариабельный участок гена 16S рРНК

VAMPS – онлайн программа для визуализации результатов метагеномного анализа
[Visualization and Analysis of Microbial Population Structures]

ВВЕДЕНИЕ

Способность микроорганизмов ассимилировать углеводороды (УВ) является проблемой для нефтеперерабатывающей промышленности, так как может являться причиной потери качества нефтепродуктов при их транспортировке, хранении и использовании [Gassen et al., 2015]. Сообщения о биологическом загрязнении нефтепродуктов и, в первую очередь, различных видов авиационного и автомобильного топлива значительно возросли в последние годы [Soriano et al., 2015; Martin-Sanchez et al., 2018b]. Повышение среднегодовой температуры, резкие суточные ее перепады увеличивают риск возникновения биоповреждений нефтепродуктов, сопровождающихся образованием в значительных объемах микробных биопленок на дне, на границе раздела фазы углеводород-вода в резервуарах с нефтепродуктами, снижая их качество и увеличивая экономические и экологические потери [Bücker et al., 2014]. До настоящего времени принято считать, что прямые и косвенные потери от микробиологически обусловленной коррозии нефти и нефтепродуктов в промышленно развитых странах составляют от 2% до 5% годового валового внутреннего продукта [Каримова, 2007].

Основными группами микроорганизмов, вызывающих биоповреждение топлив, являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, грибы родов *Hormoconis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и др. [Passman, 2013]. Микробное сообщество, состоящее из бактерии *P. aeruginosa* и гриба *Hormoconis resinae* ("керосиновый гриб") выявлено в большинстве образцов моторных масел, подвергшихся биодеструкции [Матвеева и др., 2011].

При хранении нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ) образуют сообщества, составляющие единую цепь окисления углеводородов [Varjani, 2017]. Каждый микроорганизм в таком сообществе использует преимущественно определенные группы углеводородов по специфическим метаболическим путям. При совместном воздействии УОМ сообществ из нефти и нефтепродуктов извлекается как большее количество, так и более широкий спектр углеводородов [Handley et al., 2017].

Для роста УОМ достаточно тонкой пленки воды на поверхности или в глубине нефти и нефтепродуктов [Dombrowski et al., 2016]. Многие добавки, используемые в

настоящее время в топливной промышленности, содержат минеральные элементы, способствующие росту УОМ и, следовательно, процессу биодеструкции нефти и нефтепродуктов [Scoma et al., 2016].

Биосурфактанты, в частности поверхностно-активные вещества микробного происхождения, являются мощными регуляторами активности сообществ УОМ в деструкции углеводов [Bezza, Chirwa, 2015]. Эмульгирование углеводов поверхностно активными веществами (ПАВ) улучшает приток гидрофобных органических загрязнителей из почвы и воды в микробные клетки и, следовательно, их деградацию. БиоПАВы или микроорганизмы, их продуцирующие, являются необходимым звеном в процессе биологической деструкции нефти и нефтепродуктов [Karlapudi et al., 2018].

Различные фракции УВ обладают разной степенью токсичности для живых организмов. Легкие фракции более токсичны, чем тяжелые, но при этом действуют более короткое время вследствие испарения, рассеивания и биodeградации. Тяжелые фракции при своей меньшей токсичности действуют более продолжительное время, так как опускаются на дно водных акваторий или пропитывают глубокие слои почвы и тем самым осложняют водообмен и обмен газами [Van Hamme et al., 2006].

Существует возможность повысить устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным условиям окружающей среды и при этом повысить способность к биodeградации УВ. Для этого возможно использовать клетки микроорганизмов в составе биопрепаратов в иммобилизованном виде [Revelle, 2011; Podorozhko et.al., 2008]. В связи с этим, большие перспективы имеет создание систем, объединяющих сорбенты и УОМ [Podorozhko et.al., 2008; Лейкин и др., 2009; Dedov et.al., 2017]. Такие биополимеры работают в двух направлениях в случае удаления нефтезагрязнений: сорбенты поглощают нефть и НП, а клетки УОМ – обеспечивают биodeградацию. Важным преимуществом таких биополимеров является способность к саморегенерации, основанной на способности микроорганизмов утилизировать УВ как при контакте с эмульсией вода-нефть, так и в сорбенте, адсорбировавшем нефть и НП, после разделения фаз. Таким образом исключается необходимость отделения НП от сорбента, а также облегчается последующая утилизация отработанных материалов. Подобные системы на основе сорбентов,

являющихся иммобилизующими матрицами для УОМ, могут являться основой при разработке безотходной технологии ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов [Dedov et al., 2017].

В качестве сорбентов-матриц возможно использование полимерных нетканых материалов. Они обладают высокой нефтеемкостью, низким водопоглощением и возможностью регенерации [Wei et al., 2003; Dedov et al., 2017]. В связи с этим создание саморегенерирующихся систем на основе нетканых полимерных материалов и иммобилизованных УОМ представляется перспективным подходом.

Цель работы – изучение сообществ углеводородокисляющих микроорганизмов образцов реактивного (ТС-1) и автомобильного (АИ-95) топлива и возможности создания полифункциональных материалов на основе нетканых полимерных матриц с выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Выделить из образцов реактивного (ТС-1) и автомобильного (АИ-95) топлива культивируемые углеводородокисляющие микроорганизмы (бактерии и грибы); установить их таксономический статус, с использованием морфологических, физиологических и молекулярно-генетических (анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *16S pPHK*) методов;
- Изучить физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий, определить их субстратный спектр с использованием модельных углеводов (предельных, непредельных, ароматических, полициклических), выявить наиболее активные и универсальные штаммы углеводородокисляющих бактерий;
- Определить способность выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий к деструкции модельной смеси углеводов и нефтепродуктов;
- Проанализировать с помощью универсальных праймеров гена *16S pPHK/18S pPHK* и методами высокопроизводительного секвенирования (NGS) на основе библиотек V4 фрагмента гена *16S pPHK* наличие некультивируемых форм бактерий в препаратах ДНК мицелия выделенных штаммов микромицетов;

- Выявить у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий наличие функциональные генов, отвечающих за начальные этапы окисления *n*-алканов (*alkB*, *Cyp153*, *alk1*, *alk2* и *alk3*) и синтеза биоПАВов (*RhlA*, *spf0*);
- Исследовать возможность создания полифункциональных материалов на основе нетканых полимерных матриц с выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий;

Научная новизна работы. Впервые исследована филогенетическая структура сообществ двух типов нефтепродуктов – реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина марки АИ-95. Установлено, что в реактивном топливе ТС-1 присутствуют микроорганизмы двух доменов: *Bacteriae* и *Eukaria (Fungi)*, а в автомобильном бензине только домена *Bacteriae*. Выделены и охарактеризованы из реактивного (ТС-1) и автомобильного (бензина марки АИ-95) топлив 14 штаммов углеводородокисляющих бактерий и 6 изолятов микромицетов, способных к деструкции углеводородов. По способности к росту на модельных углеводородах установлены штаммы а) активных деструкторов углеводородов (*S. mizutaii* Вi9, *Sphingobacterium* sp. Вi8 и *R. erythropolis* Вi6), для которых характерна низкая субстратная специфичность и эффективная деструкция топлив и модельной смеси углеводородов и б) потенциальных деструкторов углеводородов и нефтепродуктов, обладающих высокой субстратной специфичностью и более низкой интенсивностью окисления смеси углеводородов. Штаммы первой группы углеводородокисляющих бактерий рекомендованы для использования при создании биопрепаратов, для биоремедиации окружающей среды. Установлено, что штаммы бактерий второй группы способны к синтезу эндо и экзо биоПАВов.

Впервые молекулярными методами в ДНК мицелия изолятов грибов из реактивного топлива ТС-1 обнаружено присутствие некультивируемых форм бактерий.

Методами СЭМ и цитохимии показано, что как монокультуры, так и смешанные культуры УОБ активно заселяют как поверхности волокон полимерного нетканого сорбента, формируя биопленки, так и межволоконного пространства, образуя микрофлоркулы. В составе биопленок клетки бактерий инкорпорированы во внеклеточном полимерном матриксе, содержащем кислые полисахариды.

Установлено, что УОБ инкорпорированные в нетканом полимерном сорбенте в составе биополимерного материала, как в моно-, так и в смешанной культурах способны более эффективно, чем в планктонной форме деградировать УВ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Знания о функционировании микробных сообществ являются важным шагом в понимании процессов биоповреждения материалов. Полученные в работе данные расширяют представления о механизмах деструкции углеводов нефтепродуктов. Создана коллекция углеводородокисляющих микроорганизмов способных к росту в разных типах топлива.

Выделенные микроорганизмы могут быть использованы как по отдельности, так и в составе модельных сообществ для создания на их основе биополимерных материалов и/или биопрепаратов, применяемых на этапе биологической очистки в случае аварийных разливов нефти и нефтепродуктов в водных средах и почве.

Полученные новые данные о сообществах УОМ топлива могут быть включены в курсы лекций и практических занятий, касающихся биоповреждений нефти и нефтепродуктов.

Объект и предмет исследования. Предметом исследования явилось изучение филогенетической структуры сообществ двух типов нефтепродуктов – реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина марки АИ-95.

Методология исследования. Выделение и культивирование УОМ из образцов топлива проводили традиционными микробиологическими методами с применением процедуры первоначального подбора сред. Идентификация полученных штаммов углеводородокисляющих бактерий (УОБ) проведена на основе фрагментов *16S rPHK*, с использованием алгоритма BLAST и референсной базы данных GenBank NCBI. Изучение способности к деструкции углеводов штаммами УОБ осуществляли как с помощью физиолого-биохимических методов (в особенности изучение каталазной активности) в комбинации с физико-химическими методами (эмульгирующая активность, гидрофобность, снижение поверхностного натяжения среды), так и с помощью молекулярно-биологических методов (определения экспрессии генов окисления н-алканов, синтеза ПАВов). Определение убыли углеводов смеси после культивирования с УОБ проводили

с использованием газо-жидкостной хроматографии. Таксономический состав некультивируемых бактерий в гифосфере изолятов грибов описан с помощью методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) на основе библиотек V4 фрагмента гена *16S rRNA*. Анализ данных NGS был проведен в современных биоинформатических программах. Присутствие кислых полисахаридов в составе матрикса биопленки УОБ оценивали по окрашиванию его красителем рутениевым красным. Морфологические особенности формирующих биопленок УОМ, микромицетов, биополимерных материалов проводили с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии. Наличие генов синтеза биосурфактантов и окисления н-алканов устанавливали с помощью ПЦР на гены *RhlA*, *spf0* и *alkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk3*, соответственно.

Личный вклад автора заключается в анализе данных литературы, проведении экспериментов, получении чистых культур УОМ (бактерий и грибов), выделенных из образцов топлив, изучении их физиолого-биохимических свойств, а также физико-химических характеристик, позволяющих им эффективно деградировать УВ, постановке молекулярно-биологических экспериментов, подготовке и изучении образцов биокompозитных материалов на основе полимерных сорбентов, анализе и оформлении полученных экспериментальных данных и в подготовке публикаций. Участие соавторов соискателя и организации, в которых они работают, обозначены в тексте работы.

Достоверность полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методов, актуальными методами статистического анализа, а также сопоставлением полученных данных с результатами других методов.

Положения, выносимые на защиту:

- Различные виды топлива в зависимости от их углеводородного состава содержат сообщества УОМ способные к конверсии широкого спектра углеводородов. Часть бактериальных компонентов сообществ – универсальных деструкторов - преимущественно специализирована на окислении различных групп углеводородов, а другие – на синтезе биоПАВов;

- В составе биомассы мицелия штаммов микромицетов, способных к росту на топливе, присутствуют некультивируемые формы бактерий. Анализ некультивируемых форм бактерий в препаратах ДНК мицелия грибных изолятов возможен с помощью универсальных праймеров гена *16S rPHK* и методами высокопроизводительного секвенирования (NGS) на основе библиотек V4 фрагмента гена *16S rPHK*.
- В нетканых биополимерных материалах выделенные штаммы УОБ формируют биопленки как на поверхности волокон, так и межволоконном пространстве и осуществляют деградацию углеводов модельной смеси более эффективно, чем в состоянии планктонной культуры.

Апробация работы. Результаты работы представлены на 5 международных конференциях, 3 Всероссийских конференциях с международным участием и 1 Всероссийской конференции. Основные результаты работы изложены в 5 статьях, в том числе 4 в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в Scopus и/или Web of Science.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 398 ссылок. Работа изложена на 175 страницах, содержит 52 рисунка и 18 таблиц.

Автор выражает **благодарность**: заведующему кафедрой ОиНХ профессору, Академику А.Г. Дедову за постоянную помощь, поддержку и доброжелательное отношение, доценту кафедры ОиНХ РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина к.х.н. Е.А. Ивановой за совместную работу по оценке деградирующей способности выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий; в.н.с., д.б.н. кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова А.В. Александровой за совместную работу по идентификации микромицетов; всем сотрудникам кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, особенно, н.с. Г.А. Дольниковой за совместную работу по выделению и определению штаммов бактерий, к.б.н. К.А. Чеканову и к.б.н. О.В. Карповой за консультации по проведению молекулярно-биологических исследований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Нефть и нефтепродукты, как источник загрязнения окружающей среды

Нефтепродукты (НП) представляют собой источник энергии в повседневной и хозяйственной жизни человека. При этом нефть и НП занимают второе место после радиоактивного загрязнения по степени вредного влияния на экосистемы [Вишняков и др. 2005]. Они способны оказывать влияние на разных уровнях организации живого: молекулярном, клеточном, организменном, биоценоотическом, изменяя видовую структуру и трофическую организацию водных и наземных экосистем и, как следствие, нарушение их функционирования, снижение биоразнообразия [Prathyusha et al., 2016]. Утечки и аварийные разливы нефти и НП регулярно происходят во время работ по разведки, добычи, переработки, транспортировки и хранения. Объем естественной утечки сырой нефти оценивается в 600 000 тонн в год [Kvenvolden, Cooper, 2003; Prathyusha et al., 2016]. Случайные выбросы углеводородов (УВ) в окружающую среду, а также выбросы, связанные с деятельностью человека — основная причина загрязнения водных и наземных экосистем [Holliger et al., 1997; Cui et al., 2020]. Почва и вода, загрязненные УВ, вызывают обширные повреждения окружающей среды, в связи с тем, что накопление загрязняющих веществ в животных и растениях может привести к их гибели или мутациям [Alvarez, Vogel, 1991; Guarino et al., 2017].

Все загрязнения нефтью и/или НП можно подразделить на естественные и антропогенные. В основе естественных загрязнений водной среды УВ лежат выходы нефти, метана, газогидратов из осадочной толщи на дне морских акваторий, а также эрозионные процессы [Шахова, Семилетов, 2014].

Антропогенные источники загрязнения среды УВ могут быть морскими (морские суда, военные корабли, установки для добычи нефти, трубопроводы), наземными (различные водные бассейны, почвы куда загрязнения попадают вместе со сточными или грунтовыми водами) и атмосферными (предприятия, транспорт и другие объекты, осуществляющие выбросы УВ в атмосферу).

1.1.1. Нефтепродукты, наиболее подверженные биологической деградации

Из НП, наиболее масштабно используемых человеком в промышленной и повседневной жизни, различные виды топлива занимают лидирующее положение. Существует три основных класса топлива: бензин, авиационный керосин (реактивное топливо) и дизельное топливо, существенно различающихся фракционным составом УВ (табл. 1).

Таблица 1. Топливные фракции, получаемые из сырой нефти [Gaylarde, 1999].

Фракция нефти	Число атомов углерода	Молекулярный вес
Газ	1-4	16-58
Бензин	5-12	72-170
Реактивное топливо (Авиационный керосин)	10-16	156-226
Дизельное топливо	15-22	212-294

Рассмотрим особенности этих типов нефтепродуктов более подробно.

Бензин. Свойства различных марок бензина контролируются спецификациями, обозначающими диапазон температур кипения, летучесть, октановое число, стабильность и различные добавочные компоненты. Присутствие сернистых соединений, состоящих в основном из дисульфидов, сульфидов и тиофенов, в бензине нежелательно и их уровень редко превышает 0,25%. В составе бензина допускаются наличие различных добавочных компонентов:

- 1) антиоксиданты (например, замещенные ароматические амины и фенолы). Они удаляют свободные радикалы, которые являются причиной образования полимерных смол;
- 2) дезактиваторы металлов (хелатирующие агенты, такие как дисалицилал-1,2-пропандиамин), которые ингибируют образование свободных радикалов;
- 3) тетраметил- или тетраэтилсвинец (антидетонационные присадки);

- 4) противообледенители (спирты или поверхностно-активные вещества);
- 5) ингибиторы коррозии (поверхностно-активные вещества).

Также в состав бензина могут быть добавлены красители для идентификации производителя и марки и/или в рекламных целях. В Бразилии, например, бензин может содержать до 17% этилового спирта. Он, как ожидается, будет концентрироваться в водной фазе, ингибируя рост микроорганизмов [Сианавати, 2017; Болтовский, 2020].

Однако, очевидно, что многие из разрешенных добавок (например, ПАВы) могут выступать в качестве источников питательных веществ для микроорганизмов, в то время как другие, такие как антидетонационные и серосодержащие соединения, могут являться ингибиторами их роста.

Диапазон длин углеродных цепей, присутствующих в бензине (табл. 2), также ограничивает рост микроорганизмов. Низкомолекулярные УВ, легко проникающие в клетки, могут быть токсичными из-за воздействия на клеточные мембраны [Morgan, Watkinson, 1994; Habib et al., 2018].

Реактивное топливо (авиационный керосин). Технические характеристики на реактивное топливо являются самыми жесткими. Топливо должно легко воспламеняться и гореть устойчиво без выбросов или вспышек, должно иметь низкое парциальное давление и температуру замерзания [Campos et al., 1974a; Алтынов 2016]. Этим требованиям отвечает парафиновый керосин или смесь керосиновой и бензиновой фракций с содержанием ароматических УВ ниже 25%. К реактивному топливу могут быть добавлены антиобледенители (диэтилен или монометилэфир триэтиленгликоля; 2-метоксиэтанол (2-ME)), обладающие также биостатической активностью [Neihof, Bailey, 1978; Yemashova et al., 2007]. Однако, показано, что *Pseudomonas putida* может использовать 2-ME в процессе роста [Gardner, Williams, 1982]. УВ реактивного топлива легко разлагаются некоторыми видами бактерий и микромицетов [Кривушина и др., 2016].

Дизельное топливо. Дизельное топливо представляет собой УВ продукт с длиной углеродной цепи C_{15} - C_{22} (табл. 1), кипящий в диапазоне температур от 150°C до 400°C. Для повышения стабильности топлива могут быть использованы различные добавки: алифатические амины, хелатирующие агенты, детергенты и ингибиторы коррозии [Batts, Fathoni, 1991; Zhang et al., 2018]. Некоторые из этих

добавок могут выступать в качестве источника питательных веществ для микроорганизмов, поэтому дизельное топливо — это топливо, которое больше всего подвержено микробиологической деструкции и наличию микробных загрязнений [Ветрова, 2010; Zhang et al., 2018].

1.2. Признаки микробного поражения нефтепродуктов

Микробное загрязнение топлива оценивают различными методами. Некоторые методы могут быть выполнены в полевых условиях, другие требуют применения специального оборудования и проводятся в лабораторных условиях. При развитии УОМ в топливе можно наблюдать его визуальные изменения: цвета, прозрачности, запаха, четкости и внешнего вида границы раздела фаз топливо-вода, которые могут быть зафиксированы в результаты рутинной проверки при замене топлива. Также необходимо оценивать все доступные поверхности резервуара на наличие микробных биопленок и/или слизи. Их присутствие может также свидетельствовать о микробном поражении НП. Наконец, требуется наблюдать за наличием границы раздела фаз, содержащей как воду, так и топливо (ГОСТы 305-2013, 2084-77 и 10227-86). Наличие визуальных изменений характеристик топлива требует проведение дополнительных количественных методов оценки его качества, позволяющих определять соотношение компонентов топлива до и после поражения микроорганизмами.

Незагрязненные образцы НП либо не содержат воды, либо имеют только две четкие, прозрачные фазы. Мутность топливной фазы (ASTM D4176 и D4860) может быть связана с микробной активностью, высоким содержанием воды, загрязнением поверхностно-активными веществами или химической нестабильностью. Эмульгированный бурый образец в любой из фаз указывает на присутствие УОМ. Эти цвета отражают присутствие оксида железа или гидроксида железа, либо их смеси. Образование подобных осадков может быть связана с микробной активностью [Матвеева и др., 2011; Passman, 2013].

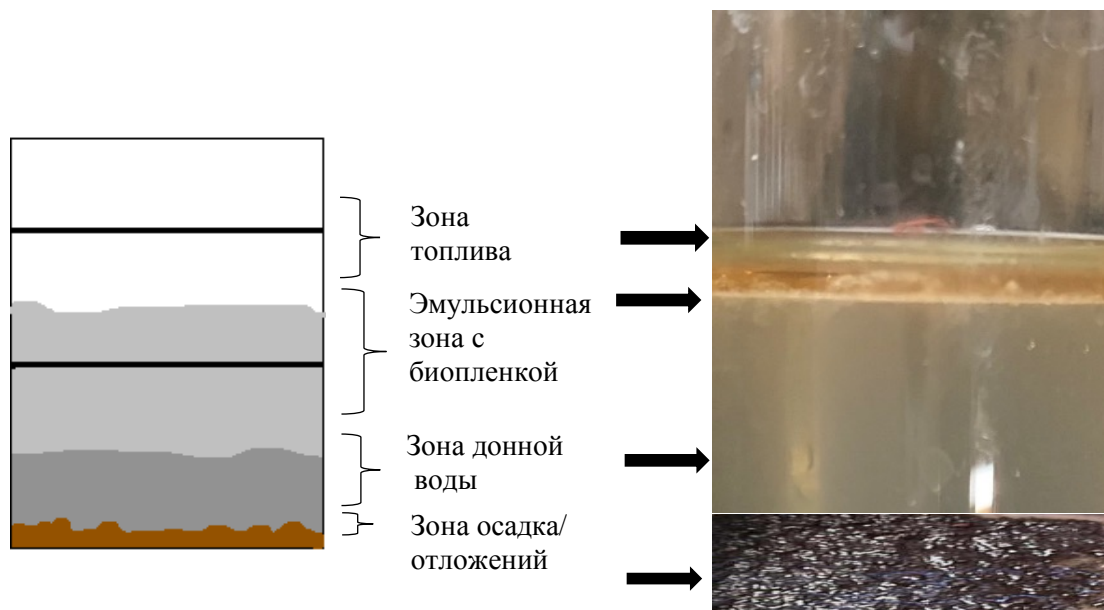


Рисунок 1. Зонирование фаз в топливе.



Рисунок 2. Примеры бактериального повреждения топливных фильтров [Матвеева и др., 2011].



Рисунок 3. Панель топливного бака с микробиологическим загрязнением в виде биопленки [Матвеева и др., 2011].

Наличие третьей фазы между топливом и водой (рис. 1) также свидетельствует о микробной активности, хотя слой, напоминающий ткань, также может быть сформирован из-за полимеризации компонентов топлива или формирования неорганического осадка.

Эмульсионная зона часто содержит сообщество УОМ, формирующих в данном слое биопленку. Биопленка может быть, как в виде равномерной структуры по всей площади поверхности, так и образовывать отдельные хлопья (флоккулы) различного размера, распределенные по поверхности на расстоянии друг от друга (рис. 2, 3).

1.2.1. Факторы, обуславливающие развитие углеводородокисляющих микроорганизмов в нефти и нефтепродуктах

Для развития в топливе УОМ необходимы благоприятные условия. К ним относятся: 1) наличие воды и питательных веществ, 2) температурные показатели в зависимости от физиологических потребностей конкретных микроорганизмов (споры грибов, например, могут оставаться активными при температуре от 5 до 45°C), 3) pH среды, 4) наличие ряда химических элементов (углерода, фосфора, калия, азота, серы, железа). В топливе, лишенном воды УОМ, не развиваются, но такая ситуация в условиях эксплуатации не наблюдается и присутствие 0,01 – 0,02 % или даже следовых ее количеств способствует росту микроорганизмов [Матвеева, 2011].

Биодеградация УВ нефти и НП является сложным процессом, который зависит от состава и соотношения различных классов УВ [Cooney et al. 1985; Al-Hawash et al. 2018]. В связи с этим, можно выделить четыре класса УВ в составе нефти и НП: насыщенные УВ, ароматические УВ, асфальтены (фенолы, жирные кислоты, кетоны, сложные эфиры и порфирины) и смолы (пиридины, хинолины, карбазолы, сульфоксиды и амиды) [Colwell et al., 1977; Chabukdhara et al., 2019]. При этом нефть и НП ограниченно доступны для микроорганизмов, что снижает биодеградацию нефтяных загрязняющих веществ в окружающей среде.

УВ, обладающие свойствами растворителей, оказывают неблагоприятное влияние на УОМ, приводя к угнетению дыхания, ингибированию роста, уменьшению выживаемости и/или лизису клеток [De Carvalho et al., 2009], проявляют сильное токсическое действие [Sei et al., 2003]. Более гидрофобные

соединения, могут накапливаться в поверхностных структурах и клеточной стенке и не являться высокотоксичными для микроорганизмов.

Известно, что именно бактерии играют основную роль в деградации УВ в почве. Об этом свидетельствует количественная оценка углеводородокисляющих бактерий (УОБ) ($\geq 10^6$ клеток/г) в сравнении с количеством микроскопических грибов [Atlas, Bartha, 1992; Marinescu et al., 2017]. Характерными чертами почвенных бактериоценозов хронически подверженных воздействию углеводородов нефти и НП является ограниченное разнообразие, формирование «специализированных» экотрофных групп микроорганизмов, использующих УВ определенного типа. Таким образом, несмотря на большое разнообразие ферментов и метаболических путей деградации УВ нефти и НП, ни один из микроорганизмов не способен использовать все класса УВ, а специализируется, как правило, на определенном их диапазоне [Alvarez, 2003].

Кроме того, УВ нефти и НП отличаются по своей доступности для микробной биodeградации. В целом, ее можно распределить следующим образом: линейные алканы > разветвленные алканы > ароматические соединения > циклические алканы [Ulrici, 2000]. Микробная деградация УВ является конечным природным механизмом, с помощью которого можно очистить окружающую среду от нефтяных загрязнений [Atlas, 1992; Amund, Nwokoye, 1993; Lal, Khanna, 1996; Atlas, Bragg, 2009; Miller et al., 2020].

1.3. Стратегии микроорганизмов, повышающие доступность использования углеводородов нефти и нефтепродуктов

УВ малодоступны для живых организмов и это связано с несколькими физико-химическими параметрами данных молекул: низкой растворимостью и устойчивостью в среде. Однако, УОМ все же способны взаимодействовать с УВ, образуя эмульсии, а затем поглощая их. Для этого микроорганизмы применяют разные стратегии, направленные на преодоление барьера растворимости или увеличение эффективности транспорта УВ в клетку [Bouchez-Naitali et al., 1999; Van Hamme et al., 2003]. В этом случае происходит либо прямой контакт гидрофобной поверхности клеток с УВ, либо клетки используют механизмы, повышающие растворимость УВ, основанные на снижении поверхностного натяжения растворов

при помощи продукции ПАВ (в случае бактерий — это продукция биосурфактантов) [Banat, 1995; Lin, 1996; Ron, Rozenberg, 2001; Deepika et al., 2021].

1.3.1. Поверхностно-активные вещества углеводородокисляющих микроорганизмов

В целом, ПАВы представляют собой амфифильные молекулы, которые синтезируются про- и эукариотами. ПАВы, производимые УОБ, могут быть связанными с клеточной поверхностью или быть внеклеточными. Одной из физиологических ролей ПАВ является метаболизм УВ. Вероятно, можно считать, что данная функция ПАВ связана именно с необходимостью метаболизировать УВ, учитывая, что именно УОМ отличаются высоким потенциалом в синтезе ПАВ.

Молекулы ПАВ имеют полярную и неполярную части, благодаря чему они могут образовывать агрегаты друг с другом, образуя мицеллы или распределяться между фазами, обладающими разной полярностью, принимая участие в образовании биопленок, эмульгировании субстратов и повышении смачиваемости гидрофобных структур [Ron, Rozenberg, 2001; Li et.al., 2014].

Важно отметить, что для биоПАВ характерна активность, сходная с синтетическими молекулами ПАВ, однако, первые при этом менее токсичны, подвергаются метаболизму со стороны живых организмов и их синтез возможен из возобновляемых источников с использованием недорогих субстратов. Кроме того, биоПАВ обладают селективностью и активностью в широком диапазоне условий окружающей среды [Franzetti et al., 2008]. Благодаря перечисленным особенностям, микробные ПАВы могут использоваться для биоремедиации почв и акваторий от загрязнений нефтью и НП.

ПАВы могут быть получены с помощью химического синтеза из УВ нефти, но, они проявляют высокую токсичность и плохо разрушаются микроорганизмами в природе [Franzetti et al., 2008].

Количественной характеристикой ПАВ является критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) — концентрация, при которой образуются молекулярные агрегаты или мицеллы и при которой поверхностное натяжение достигает наименьшего значения [Щукин и др., 2006].

Прокариоты являются самыми активными продуцентами биоПАВ. В состав синтезированных УОМ молекул ПАВ также входят гидрофобная часть, которая

может быть представлена остатками жирных кислот, и гидрофильная часть, включающая остатки фосфорной кислоты, карбоксильные группы органических кислот, аминокислоты, белки, моно-, ди-, полисахариды [Льонг и др., 2018].

ПАВы можно разделить на основании молекулярного веса: низкомолекулярные (биосурфактанты) и высокомолекулярные полимерные молекулы (биоэмульгаторы). Биосурфактанты эффективно снижают поверхностное и межфазное натяжение субстратов, а биоэмульгаторы обладают высокой эмульгирующей активностью, но не обладают высокой поверхностной активностью [Льонг и др., 2018; Deepika et al., 2021].

Микроорганизмы различных систематических групп способны к синтезу биоПАВов разных классов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Типы биосурфактантов и их продуценты [по Льонгу, 2018 с дополнениями].

Типы биоПАВ		Микроорганизмы - продуценты
Низкомолекулярные биоПАВы	<i>Гликолипиды</i> [Sato, 2019]	
	Рамнолипиды [Kumar, 2018]	<i>Pseudomonas Acinetobacter</i>
	Трегалоллипиды [Gein, 2018]	<i>Rhodococcus Tsukamurella</i>
	Софоролипиды	<i>Candida</i>
	Маннозилэритролипиды (МЭЛ)	<i>Pseudozyma</i>
	<i>Липонептиды</i> [Satpute, 2016]	
	Липопептиды	<i>Bacillus, Candida Acinetobacter; Rhodococcus, Arthrobacter</i>
	<i>Другие</i>	
	Жирные кислоты	<i>Corynebacterium</i>
	Триглицериды	<i>Norcadia</i>
	Флаволипиды	<i>Flavobacterium</i>
	Фосфолипиды [Satpute, 2016]	<i>Klebsiella, Pseudomonas</i>
Высокомолекулярные биоПАВы	<i>Биоэмульгаторы</i>	
	<i>Гликопротеины</i> [Jaramillo, 2020]:	
	Аласан Эмульсан	<i>Acinetobacter radioresistens Acinetobacter calcoaceticus</i>
	<i>Полисахариды и липопротеины</i>	
	Липосан	<i>Candida lipolytica</i>

Бактерии р. *Rhodococcus* могут продуцировать внеклеточные и ассоциированные с клеточной стенкой гликолипидные биоПАВы при росте на минимальных минеральных средах в присутствии гидрофобных субстратов как источника углерода и энергии. Например, бактерии штамма *R. wratislaviensis* BN38 способны утилизировать н-алканы с длиной цепи C₈ - C₁₇. При росте на УВ с длиной цепи C₁₁ и более рост бактерий сопровождался снижением поверхностного натяжения среды до 29 – 32 мН/м, а концентрация биоПАВов в среде достигала максимального значения 3,1 г/л [Suzuki et al., 2014].

Кроме того, бактерии р. *Rhodococcus* способны синтезировать трегалолипиды. Эти вещества способны снизить поверхностное натяжение на границе раздела фаз вода-воздух с 72 мН/м до 19 – 43 мН/м, а межфазное натяжение между водой и гидрофобным субстратом (н-гексадеканом, деканом или керосином) – до 1 мН/м, при этом ККМ трегалолипидов находится в пределах 0,7 – 37 мг/л [Tuleva et al., 2008]. Трегалоллипиды обладают также эмульгирующей активностью по отношению к разным гидрофобным субстратам. По имеющимся данным, *R. Ruber* продуцировал биоПАВ, индекс эмульгирования (E₂₄) которых, имел значение в пределах от 20% до 60% в зависимости от класса УВ [Bicca, Ayub, 1999].

В ходе изучения процессов биodeградации н-алканов в клетках бактерий р. *Rhodococcus* обнаруживаются включения, которые содержат УВ, триацилглицериды и воска [Alvarez et al., 2004]. Данные включения находятся в клетках в виде капель и выполняют запасную роль, а также принимают участие в стабилизации и обезвреживании алканов и других токсинов.

Гликолипидные биоПАВ синтезируются некоторыми штаммами р. *Rhodococcus* и могут растворять до 100% сорбированной нефти в песках и горючих сланцах [Ivshina et al., 1998]. В работе [Kanga et al., 1997] было показано, что биоПАВы, продуцируемые штаммом *Rhodococcus sp.* H13-A, солубилизировали циклические ароматические УВ в воде в 35 раз эффективнее, чем синтетический сурфактант Твин 80.

Трегалоллипиды бактерии р. *Rhodococcus* синтезируются, в основном, в клеточносвязанном виде, поэтому достаточно трудны в получении для последующего использования в биотехнологии. Данные биоПАВы возможно

применять в областях, где они используются без очистки и/или выделения, например, при биоремедиации нефтезагрязненных почв [Gein, 2018].

Способность некоторых штаммов бактерий синтезировать биоПАВы подтверждается наличием в геноме соответствующих генов [Делеган, Филонов, 2016; Льюнг, 2018; Турова и др., 2018; Deegan et al., 2019].

Синтез монорамнолипидов у бактерий рода *Pseudomonas* происходит при участии гена *RhlA*. Данный ген кодирует рамнозилтрансферазную субъединицу А (RhlA), которая катализирует синтез димеров жирных кислот. Последние впоследствии служат предшественниками для рамнозилтрансферазы субъединицы В (RhlB) с образованием монорамнолипидов, а синтез дирамнолипидов катализируется рамнозилтрансферазой 2 (RhlC) [Rahim et al. 2001; Deziel et al. 2003; Soberon-Chavez et al. 2005]. Тогда как гены *spf0* и *spfA* отвечают за выработку биогенных ПАВов липопептидной природы [Satpute, 2016].

В литературе обсуждаются данные о том, что процесс окисления алканов представляет собой часть этапов биосинтеза сукциноилтрегалозных липидов (СТЛ) [Inaba et al., 2013], в котором выделяют три основные фазы (рис. 4). Первая фаза метаболизма алканов требует алканмонооксигеназу (AlkB) в качестве начального фермента, а фруктозо-бисфосфат альдолаза (Fda) работает как фермент глюконеогенеза для синтеза трегалозы. На заключительном этапе биосинтеза сукциноилтрегалозных липидов, фермент ацетил-КоА трансфераза (TlsA) переносит ацильные группы на трегалозу или ее производные [Inaba et al., 2013].

Кроме того, белок AlkB, как предполагается, вовлечен в первую стадию метаболизма алканов и последующего синтеза трегалозных биосурфактантов (рис. 4). Общие мотивы алканмонооксигеназ у УОБ сильно консервативны и требуются для превращения алканов в спирты.

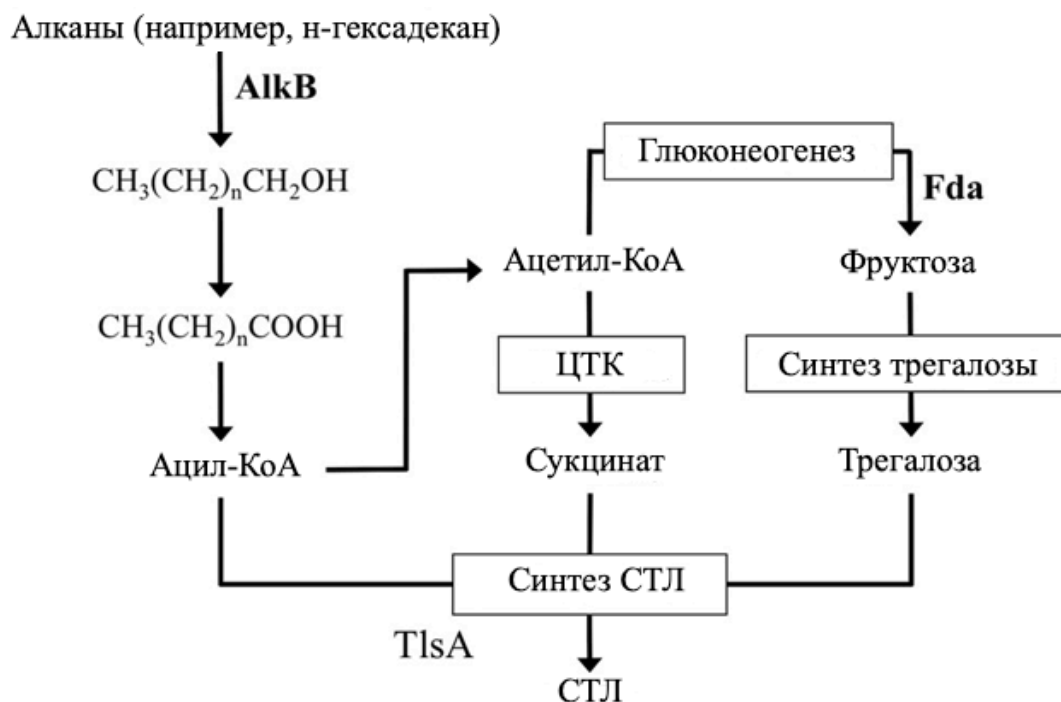


Рисунок 4. Путь биосинтеза сукциноилтрегалозных липидов из алканов. СТЛ – сукциноилтрегалозные липиды; TlsA – ацетил-КоА трансфераза; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; Fda – фруктозо-бисфосфат альдолаза; AlkB – алканмонооксигеназа [Inaba et al., 2013 с дополнениями].

1.4. Механизмы поступления углеводов в бактериальную клетку

Считается, что деструкция УВ состоит из нескольких этапов. На первом этапе экзоферменты оказывают воздействие на сложные органические вещества. Второй этап представляет собой поступление в клетку продуктов метаболизма первого этапа и их дальнейший метаболизм с помощью эндоферментов [Миронов, 2002]. В работах Т.В. Коронелли и соавторов сообщали, что на первом этапе в нефтяной пленке преобладают и активно размножаются бактерии pp. *Micobacterium* и *Arthrobacter*, снижающие концентрацию УВ до нетоксичного уровня. Кроме того, происходит обогащение среды витаминами, липидами и другими органическими соединениями, и, таким образом, создаются все условия для развития других УОМ, усваивающих УВ в процессе кометаболизма [Коронелли, 1980].

Можно выделить несколько способов первичного взаимодействия нефти и НП с клетками УОМ:

- 1) прямой контакт с клеткой, при котором УВ проникают в клетку в виде микрокапель. В этом варианте взаимодействия все зависит от поверхностного аппарата клетки, а именно его гидрофильно-гидрофобных свойств, так как

- наиболее эффективно транспорт УВ происходит за счет адгезии клеток к гидрофобным субстратам на ранней стадии роста [Коронелли, 1980; Никовская и др., 1989; Bouchez-Naitali et al., 1999; Saborimanesh et al., 2019];
- 2) с помощью пермеаз, которые переносят в клетку УВ, растворенные в воде [Коронелли, 1980];
 - 3) путем растворения УВ в липофильной оболочке (клеточной стенке) [Никовская и др., 1989].

Транспорт УВ в клетку может осуществляться по двум путям: 1) за счет простой или облегченной диффузии, что не требует затрат энергии, при этом скорость процесса зависит от концентрации субстрата в среде (транспорт осуществляется из области с большей концентрацией в область с меньшей концентрацией – по градиенту концентрации); 2) активным транспортом, путем движения веществ в клетку против градиента концентрации, что происходит с затратой энергии и требует участия белков-переносчиков [Коронелли, 1996; Kim et al., 2002; Тимергазина, Передохова, 2012]. Поверхностная активность и гидрофобный характер клеточных стенок способствуют взаимодействию между микроорганизмом и нерастворимым субстратом, что дает возможность преодолеть ограниченную диффузию при его транспорте в клетку.

Процесс поглощения УВ клетками эукариот, например, дрожжей также осуществляется в несколько этапов. Первый этап сходен с таковым у прокариот, а второй этап также включает в себя активное поглощение УВ клеткой, при котором создается сорбционный градиент, за счет которого УВ могут непрерывно поступать в клетку [Тимергазина, Переходова, 2012].

Таким образом, для микроорганизмов, способных утилизировать гидрофобные субстраты, характерны три основных способа поглощения УВ [Li et al., 2014]:

- формирование липофильных каналов в клеточной стенке, которые обладают высоким сродством к УВ и заполнены гидрофобным веществом;
- выделение в среду биоПАВ, которые могут эмульгировать и солюбилизовать УВ в водной фазе;
- прямой контакт клеток с каплями УВ за счет гидрофобной клеточной стенки, в состав которой входят липофильные соединения.

1.4.1. Поглощение солюбилизированных углеводов

Поглощение гидрофобных соединений в виде солюбилизированных капель распространено среди УОМ. Продукция биоПАВ повышает растворимость гидрофобных веществ за счет образования эмульсии. Ли с соавторами [2014] предложили, что поглощение н-алканов клетками происходит в виде мицелл. Согласно данной модели, молекулы биоПАВов образовывали мицеллы с УВ [Li et al., 2014] (рис. 5).

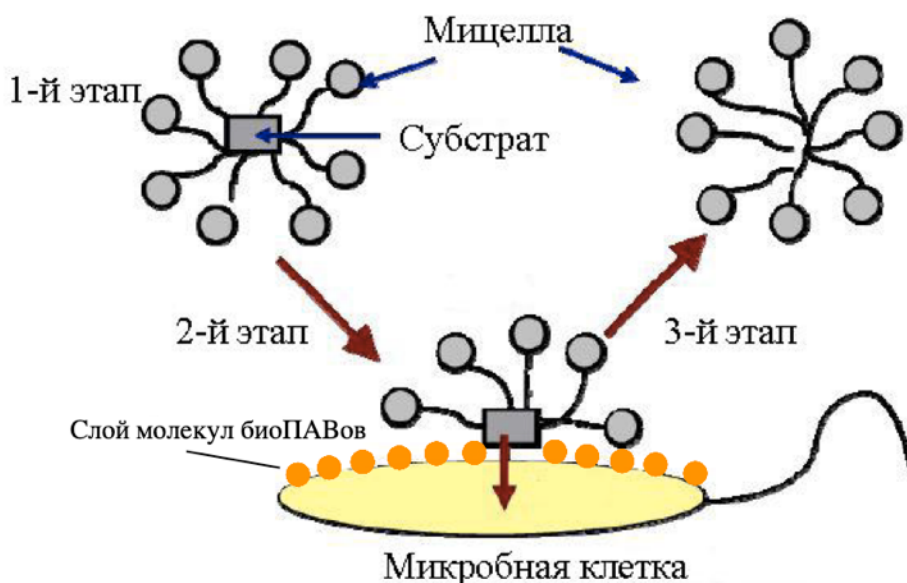


Рисунок 5. Схема поглощения гидрофобного субстрата бактериями в виде мицелл [Li et.al., 2014; Deepika et al., 2021].

Сначала свободноплавающие мицеллы с солюбилизированной каплей УВ концентрируются вокруг клеток, обмениваются с гемимицеллярным слоем биосурфактанта и далее происходит перемещение УВ из гемимицеллярного слоя в клетку. Процесс образования мицелл зависит от кинетики агрегирования мицеллы, за скорость деградации УВ в мицеллярной фазе отвечают второй и третий этапы, которые обычно являются решающими [Li et al., 2009; 2014].

1.4.2. Поглощение углеводов путем прямого контакта клеток с гидрофобным субстратом

Согласно другой гипотезе, поглощению УВ клетками может способствовать наличие у клеток УОМ ассоциированных с клеточной стенкой биоПАВ. В таком случае повышается гидрофобность поверхностного аппарата и повышается адгезия клеток бактерий к УВ нефти и НП [Ron, Rosenberg, 2001].

Для штамма *Rhodococcus equi* Ou2 было показано, что биоПАВ, секретируемый в среду культивирования играл незначительную роль в случае деградации гексадекана, таким образом, можно считать, что основным способом поглощения у клеток данного штамма является как раз прямой контакт со слоем УВ [Lang, Philp 1998].

При поглощении гидрофобных субстратов путем прямого контакта микроорганизмы непосредственно адсорбируются на жидких УВ субстратах, при этом формируются агломераты, что приводит к тесному контакту клеток с субстратом [Li et al., 2014; Deepika et al., 2021]. Проникновение бактерий внутрь капли гидрофобного субстрата указывает на высокое сродство их клеточной стенки к компонентам нефти и НП.

Бактерии р. *Rhodococcus* обладают высокой адгезивной активностью по отношению к жидким УВ и их производным [Рубцова, Куюкина, 2012; Ivshina et al., 2017; Лыонг, 2018]. Это позволяет им эффективно усваивать УВ субстраты. Адгезия бактерий на УВ может существенно различаться и является штаммоспецифическим показателем, зависящим от условий культивирования [Гоголева, Немцева 2012].

Большую роль в гидрофобности клеточной стенки играют поверхностные гликолипиды и пептидолипиды. Так, гидрофобность клеточной поверхности может быть обусловлена содержащимися в клеточной стенке миколовыми кислотами, как, например, у бактерии р. *Rhodococcus*. При этом, согласно данным, полученным Т.В. Коронелли с соавторами [Коронелли, Калюжная, 1983], подавление синтеза миколовых кислот ведет к потере клетками способности окислять УВ, поскольку миколовые кислоты, по мнению авторов, непосредственно обеспечивают транспорт молекул УВ внутрь клетки.

Установлено, что содержание клеточных липидов способно увеличиваться при культивировании клеток на субстрате с УВ [Коронелли, Поршнева, 1995; Hua, Wang, 2014], а механизм повышения гидрофобности клеточной стенки бактерий р. *Rhodococcus* они объяснили образованием гликолипидных биоПАВов на начальной фазе роста бактерий. Миколовые кислоты и трегалолипиды, имеющие в своем строении гидрофобные «хвосты», придают дополнительную гидрофобность бактериальной клеточной стенке (рис. 6). Х. Никайдо [1996] предположил, что продуцируемые в культуральную среду гликолипиды могут быть заменены

фосфолипидами, что приводит к повышению гидрофобного характера клеточной стенки грамотрицательных бактерий, особенно у представителей семейства *Enterobacteriaceae* [Nikaido, 1996].

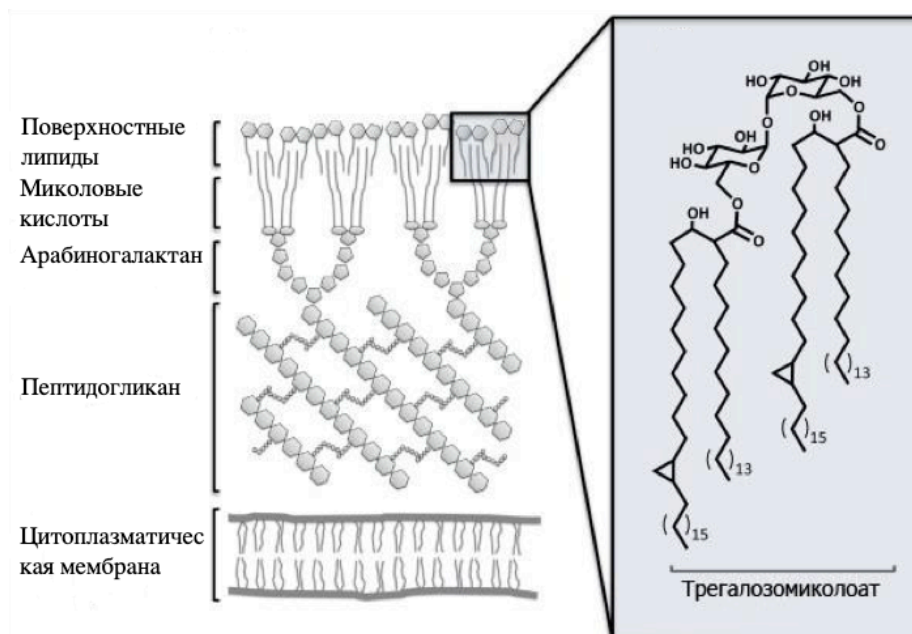


Рисунок 6. Строение клеточной стенки грамположительных бактерий-продуцентов гликолипидных биосурфактантов [по Nikaido, 1996].

Таким образом, если рассматривать процесс утилизации гидрофобных субстратов бактериями р. *Rhodococcus*, он связан с продукцией биоПАВов в среду, а также с изменением гидрофобности поверхностного аппарата клеток. Однако, предлагаются различные объяснения этой взаимосвязи. Механизмы участия биоПАВ в поглощении гидрофобных субстратов бактериями до конца не ясны.

1.5. Разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов

Знания о распределении, таксономическом и функциональном разнообразии УОМ до сих пор являются неполными и можно утверждать, что большая часть микроорганизмов, которые получают энергию из УВ нефти и НП и ферментные системы, которыми они обладают, остаются малоизученными.

1.5.1. Углеводородокисляющие бактерии

Филогенетически разнообразные бактерии могут трансформировать и разлагать УВ (табл. 3). Многие исследования описывают способность к биодegradации грамположительных аэробных гетеротрофных бактерий родов *Actinomyces* [Etoumi, 2007], *Arthrobacter* [Plotnikova et al., 2001], *Bacillus* [Kumar et

al., 2007; Sathishkumar et al., 2008], *Corynebacterium* [Sathishkumar et al., 2008; Watkinson, Morgan, 1990], *Dietzia* [Bødtked et al., 2009; Dellagnezze et al., 2014; Von der Weid et al., 2007; Wang et al., 2011], *Geobacillus* [Feng et al., 2007], *Gordonia* [Alvarez, 2003; Kotani et al., 2003], *Micrococcus* [Dellagnezze et al., 2014; Jegan et al., 2010], *Mycobacterium* [Kotani et al., 2006; Sakai et al., 2004; Van Beilen et al., 2002], *Micromonospora* [Barabás et al., 2001; De Vasconcellos et al., 2010], *Nocardia* [Alvarez, 2003; Sakai et al., 2004], *Nocardioidea* [Hamamura et al., 2001], *Pseudonocardia* [Kotani et al., 2006], *Rhodococcus* [Alvarez, 2003; Alvarez, Silva, 2013; Binazadeh et al., 2009; Van Beilen et al., 2002] и *Streptomyces* [Barabás et al., 2001]. Среди перечисленных выше родов, наиболее распространенные и отличающиеся наибольшим разнообразием разлагаемых ксенобиотиков были обнаружены корине- и нокардиоформные скопления родов актинобактерий: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, и *Rhodococcus* [Alvarez, 2003; Hamamura et al., 2001; Van Beilen et al., 2003; Wentzel et al., 2007]. В частности, представители р. *Rhodococcus*, которые доминируют в биоценозах конкретных местообитаний, таких как высокосолесные и/или нефтезагрязненные биотопы, наиболее перспективные биодеструкторы [De Carvalho, da Fonseca, 2005; Martínková et al., 2009; Herter et al., 2012].

Таблица 3. Филогенетическая принадлежность углеводородокисляющих бактерий [Федоренко, 2016 с дополнениями].

Филум	Класс	Род	Объект (откуда выделен)	Ссылка на источник
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcus</i>	Нефтезагрязненные почвы	Суслова и др., 2012
		<i>Rhodococcus</i>	Нефтезагрязненные почвы	Gutler, 2010; Kuyukina, Ivshina, 2019; Kravzova et al., 2020
		<i>Streptomyces</i>	Нефтезагрязненные почвы	Суслова и др., 2012; Iutynska et al., 2020
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Acetobacterium</i>	Нефтезагрязненные почвы	Kotsyurbenko et al., 1995

Продолжение таблицы 3

	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus</i>	Почва с территории нефтедобывающего предприятия	Суслова и др., 2012; Ovsyannikova et al., 2020
		<i>Brevibacillus</i>	Почва с территории нефтедобывающего предприятия	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophaga– Flavobacterium– Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	Нефтезагрязненные почвы	Teske et al., 2011
		<i>Flavobacterium</i>	Нефтезагрязненные почвы	Brinkmeyer et al., 2003; Gerdes et al., 2005
		<i>Gelidibacter</i>	Нефтезагрязненные почвы	Staley, Gosink, 1999
		<i>Polaribacter</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Brinkmeyer et al., 2003; Teske et al., 2011
		<i>Psychroflexus</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Ghiglione et al., 2012
<i>Proteobacteria</i>	α - <i>Proteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	Почва с территории нефтедобывающего предприятия	Miteva et al., 2004; Srinivas et al., 2009;
		<i>Ochrobactrum</i>	Нефтезагрязненные почвы	Коршунова, 2013
		<i>Paracoccus</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009;
		<i>Roseobacter</i>	Нефтезагрязненные почвы	Staley, Gosink, 1999
		<i>Roseovarius</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009;
		<i>Sphingomonas</i>	Почва с территории нефтедобывающего предприятия	Brinkmeyer et al., 2003; Miteva et al., 2004
		<i>Sulfitobacter</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009; Gerdes et al., 2005
	β - <i>Proteobacteria</i>	<i>Aquaspirillum</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Harding et al., 2011

Продолжение таблицы 3

		<i>Polaromonas</i>	Нефтезагрязненные почвы	Miteva et al., 2004; Staley, Gosink, 1999
		<i>Alcaligenes</i>	Нефтезагрязненные почвы	White, 2011
		<i>Variovorax</i>	Нефтезагрязненные почвы	Gerdes et al., 2005
	δ -Proteobacteria	<i>Desulfofaba</i>	Нефтезагрязненные почвы	Knoblauch et al., 1999
		<i>Desulfuromusa</i>	Нефтезагрязненные почвы	Vandijken et al., 2006
	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	Почва с территории нефтедобывающего предприятия	Brinkmeyer et al., 2003; Srinivas et al., 2009; Nikolaev et al., 2020
		<i>Aeromonas</i>	Нефтезагрязненные почвы	Суслова и др., 2012
		<i>Alteromonas</i>	Нефтезагрязненные почвы	Staley, Gosink, 1999
		<i>Colwellia</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009; Staley, Gosink, 1999
		<i>Cycloclasticus</i>	Нефтезагрязненные почвы	Prince et al., 2010
		<i>Enhydrobacter</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009
		<i>Halomonas</i>	Нефтезагрязненные почвы	Gerdes et al., 2005
		<i>Marinobacter</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Brinkmeyer et al., 2003; Gerdes et al., 2005; Staley, Gosink, 1999
		<i>Neptunomonas</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Hedlund et al., 1999
		<i>Oceanisphaera</i>	Водные акватории, загрязненные нефтью	Srinivas et al., 2009
		<i>Oleispira</i>	Нефтезагрязненные почвы	Yakimov et al., 2003
		<i>Photobacterium</i>	Нефтезагрязненные почвы	Srinivas et al., 2009
		<i>Pseudomonas</i>	Почва с территории	Brinkmeyer et al.,

			нефтедобывающего предприятия	2003; Miteva et al., 2004; Staley, Kravzova et al., 2020
		<i>Shewanella</i>	Нефтезагрязненные почвы	Gerdes et al., 2005; Srinivas et al., 2009; Staley, Gosink, 1999
		<i>Vibrio</i>	Нефтезагрязненные почвы	Brinkmeyer et al., 2003

Динамика численности УОБ подвержена двум факторам: широтно-географическому и сезонному (в умеренных и полярных широтах), что, в целом, актуально и для других гетеротрофных бактерий. Возможны существенные ее колебания даже в течение одного и того же месяца под влиянием локальных изменений условий среды [Bartha, Atlas, 1977; Maamar et al., 2020].

Как правило, в публикациях исследователи сообщают, что для деградации сложных смесей УВ, таких как сырая нефть и НП в природных биотопах развиваются сложные сообщества микроорганизмов, характеризующиеся широкими ферментативными возможностями: в почве [Bartha, Bossert, 1984; Lang et al., 2016; Singh et al., 2017], пресных [Cooney, 1984; Logeshwaran et al., 2018] и морских акваториях [Atlas, 1985; Prince et al., 2019]. Бактерии являются наиболее активными агентами разложения нефти, и они работают как первичные биодеструкторы нефти и НП при аварийных разливах [Rahman et al., 2003; Brooijmans, 2009]. Известно, что некоторые бактерии питаются исключительно УВ [Yakimov, 2007]. Floodgate [1984] перечислил 25 родов УОБ и 25 родов углеводородокисляющих грибов, которые были выделены из морской среды. Для штамма *Acinetobacter sp.* установлено, что в качестве единственного источника углерода может использовать н-алканы с длиной цепи от C₁₀ до C₄₀ [Throne-Holst et al., 2007]. Рода бактерий *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* и *Mycobacterium*, выделенные из нефтезагрязненной почвы, оказались способны к деградации различных УВ [Chaillan et al., 2004]. О деградации полиароматических УВ бактериями р. *Sphingomonas* сообщили Даугулис и Мак-Кракен [2003], а бактериями р. *Bacillus* [Rabodonirina et al., 2019].

1.5.2. Углеводородокисляющие микромицеты

Из нефтезагрязненной почвы выделены микромицеты родов *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* и *Graphium*, дрожжей *Candida*, *Yarrowia*, и *Pichia*, оказавшиеся потенциальными организмами, способными к деградации УВ [Кривушина, 2012; Chaillan et al., 2004;]. Также имеются сообщения [Singh, 2006] о группе наземных грибов, а именно родов *Aspergillus*, *Cephalosporium* и *Pencillium*, использующих УВ сырой нефти и НП в процессе роста. Другими исследователями установлена способность микромицетов использовать различные виды топлива [Кондратюк и др., 2007]. А также отмечено, что выделенные из загрязненной воды виды дрожжей *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum sp.* и *Trichosporon mucoides*, деградируют УВ нефти и НП [Boguslawska, Dabrowski, 2001].

Один из наиболее часто встречающихся видов микроскопических грибов в топливе это *Hormoconis resinae* (*Cladosporium resinae*) или «керосиновый гриб». Загрязнение топлива данным грибом представлено волокнистыми тяжами мицелия, которые достигают значительной длины, формирующие рыхлые агрегаты. Поскольку споры грибов могут находиться в пассивном состоянии достаточно долго, ожидая благоприятных условий для роста, а их размер крайне мал (2-3 мкм), топливо сложно очистить от спор микромицетов, применяя фильтры с диаметром пор более 2 мкм. Таким образом, НП, включая топливо, в течение длительного промежутка времени могут содержать споры микромицетов, а, следовательно, быть загрязненным спорами микроскопических грибов во время транспортировки, хранения, подготовки к выдаче, а также в топливных баках самолетов. При возникновении благоприятных условий, способствующих их развитию, споры прорастают, формируют мицелиальные тяжи, агрегаты, формирующие механические примеси и топливо существенно загрязняется [Матвеева, 2011; Кривушина, 2012].

Из других УОМ по видовому разнообразию и биомассе преобладают цианобактерии. Они участвуют в круговороте биогенных элементов, активизируют процессы деструкции загрязняющих веществ, создают благоприятные условия для функционирования других групп микроорганизмов [Корженевская и др., 2002; Сопрунова, 2006]. По-видимому, роль фототрофных бактерий как части микробного

нефтедеградирующего комплекса заключается в усвоении продуктов окисления УВ в анаэробных условиях [Корженевская и др., 2002].

Среди низших растений и одноклеточных животных мало организмов, способных к деградации УВ, несмотря на то что они являются обязательными компонентами водных и наземных сообществ. Однако, все же выделена водоросль *Prototheca zopfii*, способная использовать в процессе роста сырую нефть, а также способная деградировать н-алканы, изоалканы и ароматические УВ [Walker et al. 1975]. Возможно, что в данном случае была использована лишь альгологически чистая культура микроводоросли и деградация УВ связана с микробным сообществом некультивируемых бактерий, которое не было проанализировано. Cerniglia et al. [1980] и Pandey et al. [2016] установили, что девять видов цианобактерий, пять зеленых водорослей, одна красная водоросль, одна бурая водоросль и две диатомовые могут окислять нафталин. В отличие от водорослей, было показано, что простейшие не используют УВ Pandey et al. [2016].

1.6. Механизмы деградации углеводов

Аэробная деградация алканов может осуществляться двумя основными типами ферментов: алканмонооксигеназой (также известной как алкангидроксилаза, или AlkB) и некоторыми системами цитохрома P450 [van Beilen et al. 2006]. С 1994 года, когда Ван Бейлен и др. впервые описали алканмонооксигеназу у бактерии рода *Pseudomonas*, такие ферменты были обнаружены во многих бактериальных родах: *Rhodococcus* [Sameshima et al., 2008], *Pseudomonas* [Johnson, Hyman, 2006], *Acinetobacter* [Throne-Holst et al., 2007], *Alcanivorax* [Liu, Shao, 2005], *Burkholderia* [Mohanty, Mukherji, 2008], *Geobacillus* [Vomberg, Klinner, 2000], и *Gordonia* [Kato et al., 2009]. Гены, кодирующие протеиновый комплекс алканмонооксигеназы, были тщательно исследованы несколькими авторами [Whyte et al., 1998; Smits et al., 1999; Kloos et al., 2006; Powell et al., 2006], предложены молекулярные методы их идентификации не только в чистых культурах, а также на уровне микробного сообщества.

Для доказательства использования штаммом УОМ компонентов нефти или НП и метаболической активности микроорганизма можно использовать детекцию ключевых генов, ответственных за окисление определенного компонента нефти [Herrick et al., 1993; Kohno et al., 2002; Sei et al., 2003; Teske et al., 2011].

Однако, регуляция экспрессии генов, кодирующих пути деградации алканов, до настоящего времени имеет много нерешенных вопросов, в связи с тем, что во многих случаях в этих процессах также участвуют гены центрального клеточного метаболизма [Paisse et al., 2011]. Кроме того, так как данные гены и их продукты являются адаптационными, многие из них зачастую находятся в плазмидах, что может способствовать их вариабельности и горизонтальному переносу между членами популяции [Коршунова и др., 2011].

Известно, что подавляющее большинство бактериальных превращений УВ представляют собой окислительные реакции, протекающие наиболее активно в аэробных условиях. Анаэробная биodeградация УВ менее изучена [Heider, Schühle, 2013]. Имеются данные о молекулярных механизмах и путях аэробной биodeградации УВ, которые заключаются в следующем: 1) обнаружено множество многоцелевых оксигеназных систем, образующих активные комплексы с УВ субстратами и молекулярным кислородом; 2) охарактеризовано несколько ферментов, участвующих в начальной стадии аэробной биodeградации алканов [Coon, 2005; Funhoff et al., 2006; Van Beilen, Funhoff, 2007]; 3) метагеномный подход позволил описать новые метаболические пути деградации УВ, отличные от тех, которые ранее были охарактеризованы у культивируемых чистых штаммов бактерий [Sierra-García et al., 2014] и 4) были обнаружены новые флотипы генов алканмонооксигеназы [*alkB*], кодирующие алканмонооксигеназы, встречающиеся в морских экосистемах [Wasmund et al., 2009; Smith et al., 2013].

У бактерий имеется два типа цитохромов - P450 и P450s. Начальное окисление алканов у бактерий происходит с участием цитохрома P450. Данный цитохром располагается аналогично животному цитохрому P450 и связан с цитоплазматической мембраной, помимо этого, у бактерий имеется цитохром P450s, растворенный в цитоплазме [Urlacher, Eiben, 2006]. Известные цитохром P450 алканмонооксигеназами семейства Cyp153 имеют обязательный компонент – железо – и изменение его валентности характеризует каталитическое действие оксигеназы [Van Beilen et al., 2007]. Семейство цитохрома P450 Cyp153 является типом алканмонооксигеназ, используемых для деградации короткоцепочечных и среднецепочечных н-алканов и обычно встречаются у УОБ, лишенных монооксигеназ AlkB.

Системы, активируемые кислородом, не имеющие этого цитохрома, характерны для прокариот и образованы другой интегральной мембраносвязанной монооксигеназой, кодируемой у большинства бактерий геном *alkB*, и электрон-транспортными белками, такими как рубредоксин и НАДН-зависимая редуктаза, кодируемых генами *alkG* и *alkT*, соответственно [Cappelletti et al., 2011; Van Beilen et al., 2006].

Alk-подобные гены исследованы у грамположительных бактерий pp. *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Praserella* [Andreoni et al., 2000; Vomberg, Klinner, 2000; Van Beilen et al., 2002; Whyte et al., 2002]. Для подтверждения наличия конкретной системы окисления *n*-алканов и степень гомологии ее последовательности с ранее изученными последовательностями гена *alkB* в основном применялся метод амплификации фрагментов гена *alkB* с использованием специфичных праймеров к этому гену. Только для отдельных штаммов были проведены исследования на предмет генетической и структурной организации систем окисления *n*-алканов, регуляции их генов и спектра утилизируемых субстратов.

Монооксигеназы *alkB* широко распространены в бактериях и окисляют алканы (до C₁₆) в терминальном положении [Van Beilen, Funhoff, 2007; Wasmund et al., 2009]. Алканмонооксигеназа *LadA*, найденная у *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 и различные формы *AlkB* гидроксилаз могут катализировать расщепление C₁₅-C₃₆ алканов [Feng et al., 2007; Турова и др., 2018]. Каждый микроорганизм имеет определенный набор индуцибельных оксигеназных систем и способность деградировать некоторые УВ зависит от экспрессии соответствующих оксигеназ [Redmond et al., 2010].

Механизмы бактериального окисления УВ освещены в нескольких обзорах [Abbasian et al., 2015; Pérez-Pantoja et al., 2010; Yam et al., 2010]. Наиболее широко изучены пути деградации *n*-алканов [Rojo, 2009; Shennan, 2006; Van Beilen, Funhoff, 2007; Wentzel et al., 2007]. Согласно современным представлениям, существует три возможных пути окисления алканов: 1) монотерминальное окисление -CH₃ группы алкана, и дальнейшее превращение первичного спирта в альдегид и карбоновую кислоту, 2) субтерминальное окисление до соответствующего метилкетона через вторичный спирт и 3) дитерминальное окисление, когда концевые -CH₃ группы

алкана окисляются одновременно или последовательно с образованием дикарбоновых кислот, с длиной цепи, соответствующей длине исходного УВ. Монотерминальное окисление является наиболее распространенным путем ассимиляции УВ.

Как было описано ранее, биodeградация нефти и НП включает реакции, осуществляемые с участием различных ферментов [Abbasian et al., 2015]. *In vivo* УВ могут быть частично подвергнуты метаболизму как индивидуальными штаммами микроорганизмов, так и сообществом микроорганизмов, относящихся к одному или разным родам [Boopathy, 2000; Varjani et al., 2015; Varjani, Upasani, 2016]. Установлено, что сообщества микроорганизмов более эффективно осуществляют деструкцию смеси УВ нежели отдельные штаммы [Derpe et al., 2005; Иванова и др., 2014; Varjani et al., 2013, 2015; Федоренко, 2016]. Известно, [Widdel, Rabus, 2001; Das, Mukherjee, 2007] что н-алканы более доступны для биodeградации микроорганизмами по сравнению с ПАУ. Это может быть связано с доступностью (как источника углерода и энергии) УВ соединений, подвергаемых бактериальной биodeградации или с адаптацией биодеструкторов к загрязненной среде, а также с наличием ферментов, отвечающих за различные пути биodeградации УВ [Atlas, 1991; Boopathy, 2000; Thamer et al., 2013; Meckenstock et al., 2016].

1.6.1. Пути биodeградации углеводородов бактериями

Микроорганизмы, как правило, катаболизируют УВ нефти и НП с целью получения энергии, ассимилируя их внутрь клетки [Leahy, Colwell, 1990]. На рисунке 7 представлена схема путей биodeградации углеводородов УОБ. В настоящее время известно три возможных пути утилизации УВ: а) фототрофный, анаэробный; б) хемотротрофный, анаэробный; и в) хемотротрофный, аэробный (рис. 7) [Leahy, Colwell, 1990; Hendrickx et al., 2006; Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016]. Катаболизм УВ долгое время считался исключительно аэробным процессом, однако, описаны микроорганизмы известные как анаэробные деструкторы УВ [Widdel, Rabus, 2001; Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016]. Различные реакции такие как окисление, элиминирование, гидрокселирование и дегидрирование являются общими для аэробного и анаэробного путей микробной деградации УВ [Wilkes et al., 2016].

Общие пути деградации УВ включают начальную деградацию алканов путем окисления метильной группы в результате чего формируется спирт, который затем подвергается дегидратации через альдегид в соответствующую карбоновую кислоту. Карбоновая кислота затем может быть метаболизирована путем -окисления жирных кислот. Окисление заканчивается образованием и удалением ацетил-КоА, с помощью которого жирная кислота укорачивается до двух углеродного соединения [Das, Chandran, 2011; Abbasian et al., 2015].

Ароматические УВ менее подвержены биodeградации (табл. 4). Они оказывают более сильный негативный эффект на живые организмы и являются основными токсикантами экосистем [Salleh et al., 2003]. Бактериальная биodeградация ароматических УВ обычно включает образование двухатомного спирта, сопровождающегося разрушением бензольного кольца и образованием дикарбоновой кислоты. Грибы и другие эукариоты обычно окисляют ароматические УВ с помощью монооксигеназ с образованием транс-диола [Zhang et al., 2011].

Таблица 4. Углеводородные фракции, подвергающие разложению разными филогенетическими группами углеводородоокисляющих бактерий.

Углеводородная фракция	Микроорганизм	Ссылка
Алифатические	<i>Acinetobacter</i> sp.	Foght, 2008; Mittal, Singh, 2009; Chaudhary et al., 2020
	<i>Alcanivorax</i> sp.	Harayama et al., 2004; Brooijmans et al., 2009
	<i>Bacillus</i> sp.	Ghazali et al., 2004; Das, Mukherjee, 2007; Pereira et al., 2019
	<i>Brevibacterium</i>	Leahy, Colwell, 1990
	<i>Desulfosarcina</i> sp.	Jaekel et al., 2013
	<i>Desulfococcus</i> sp.	Jaekel et al., 2013
	<i>Marinobacter</i> sp.	Yakimov et al., 2007
	<i>Micrococcus</i> sp.	Ghazali et al., 2004
	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Varjani et al., 2015
	<i>Oleispira</i> sp.	Harayama et al., 2004; Brooijmans et al., 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal, Singh, 2009; Sajna et al., 2015; Varjani et al., 2015; Varjani, Upasani, 2016; Pereira et al., 2019
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Abbasian et al., 2015
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Varjani et al., 2015

Продолжение таблицы 4

	<i>Thalassolituus</i> sp.	Brooijmans et al., 2009
	<i>Aspergillus</i> sp.	Wilkes et al., 2016
	<i>Candida</i> sp.	Leahy, Colwell, 1990; Hashem et al., 2018
	<i>Penicillium</i> sp.	Atlas, 1981; Govarthanan et al., 2017
	<i>Pseudozyma</i> sp.	Sajna et al., 2015
Моноароматические	<i>Acinetobacter</i> sp.	Batista et al., 2006
	<i>Alcaligenes</i> sp.	Vijayan, 2020
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Wilkes et al., 2016
	<i>Aromatoleum aromaticum</i>	Wilkes et al., 2016
	<i>Bacillus</i> sp.	Janbandhu, Fulekar, 2011; Vijayan, 2020
	<i>Halomonas</i> sp.	Widdel, Rabus, 2001; Monzón et al., 2018
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mittal, Singh, 2009; Meckenstock et al., 2016
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Leahy, Colwell, 1990; Salleh et al., 2003; Hackbusch et al., 2020
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Janbandhu, Fulekar, 2011
Полиароматические	<i>Achromobacter insolitus</i>	Janbandhu, Fulekar, 2011
	<i>Bacillus</i> sp.	Mittal, Singh, 2009
	<i>Cycloclasticus</i> sp.	Harayama et al., 2004
	<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	Salleh et al., 2003
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Widdel, Rabus, 2001; Meckenstock et al., 2016; Medić et al., 2020
	<i>Vibrio</i> sp.	Widdel, Rabus, 2001; Al-Taei et al., 2017
	<i>Penicillium janthinellum</i>	Boonchan et al., 2000
СМОЛЫ	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Vibrionaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp., <i>Arthrobacter globiformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и <i>Bacillus</i> sp.	Leahy, Colwell, 1990 Chandra et al., 2013; Huang et al., 2018; Ma et al., 2020

1.6.1.2. Анаэробная биodeградация углеводов

Изучение процессов анаэробной деградации в настоящее время идет более интенсивно по сравнению с изучением механизмов аэробной деградации [Jaekel et al., 2013; Meckenstock et al., 2016]. В литературе содержится ограниченное количество информации о генах и ферментах, вовлеченных в эти механизмы. Ароматические УВ в анаэробных условиях в первую очередь окисляются в фенолы или органические кислоты, а далее трансформируются в длинноцепочечные летучие жирные кислоты, которые затем превращаются в метан и углекислый газ [Abbasian et al., 2015; Wilkes et al., 2016]. Акцепторами электронов в анаэробной деградации УВ могут быть нитрат-ионы, ионы двухвалентного железа, ионы марганца или сульфат-ионы [Widdel, Rabus, 2001; Foght, 2008; Abbasian et al., 2015].

1.6.2. Сообщества углеводородокисляющих микроорганизмов

Для эффективной биodeградации обычно требуется кооперация нескольких микроорганизмов, что связано с синергетическими взаимодействиями между микроорганизмами [Mukred et al., 2008]. Кроме того, применение бактериального консорциума, сформированного из аборигенного сообщества микроорганизмов, адаптированного к условиям окружающей среды данного загрязненного участка, является важным фактором эффективного процесса биоремедиации [Alkhatib et al., 2011].

Для характеристики природных сообществ используют как стандартные микробиологические методы выделения и характеристики культивируемых представителей сообщества, так и молекулярно-биологические методы обнаружения некультивируемых форм микроорганизмов. Так, например, количественный ПЦР анализ (qPCR) был использован в качестве быстрой и эффективной альтернативы для оценки микробных популяций, загрязняющих топливо при хранении [Cyplik et al., 2011; Suflita et al., 2012]. Обнаружение и количественное определение специфических копий генов с помощью qPCR может быть выполнено для различных природных образцов и продемонстрировать изменения в микробиоме сообществ с помощью специфических праймеров. Таким образом можно проверить обилие микромицетов и бактерий с помощью праймеров, амплифицирующих участки генов *18S rDNA* и *16S rDNA*, соответственно [Martin-Sanchez et al., 2018a]. Другой возможностью является количественная оценка

присутствия микроорганизмов со специфическими генами, связанными с метаболизмом УВ, такими как ген алканмонооксигеназы (*alkB*), связанный с деградацией алканов [Jurelevicius et al., 2013; Делеган и Филонов, 2016].

Таким образом, наличие микроорганизмов в сообществе можно оценить без использования методов выделения и культивирования. Наличие специфических генов может помочь понять, как формируется сообщество биопленки УОМ на границе раздела фаз, что является частым признаком микробного поражения топлива. Методология qPCR также направлена на выяснение того, какая группа микроорганизмов является доминантной в данном сообществе, определить динамику его изменений [Martin-Sanchez et al., 2018a]. Количественная оценка микроорганизмов, вызывающих биodeградацию НП, с использованием альтернативных инструментов может решить проблемы, связанные с такими загрязнениями. Раннее обнаружение микроорганизмов в резервуарах для хранения топлива может гарантировать сохранение качества продукта в соответствии со стандартными техническими условиями [Martin-Sanchez et al., 2018b].

Нефть и НП — это сложная смесь, состоящие из УВ различных классов. Индивидуальным микроорганизмам сложно разлагать все компоненты этой смеси. Хотя многие микроорганизмы могут метаболизировать несколько классов УВ, ни один из них не обладает ферментативной способностью разлагать все или даже большинство УВ компонентов нефтяных загрязняющих веществ. Для преодоления этой проблемы предлагается принять стратегию использования в этих целях ассоциаций штаммов УОМ [Li, Li, 2011].

В загрязненных экотопах присутствуют сообщества УОМ состоящих из бактерий, грибов, водорослей, простейших [Cookson, 1995]. В последние годы способность грибов в наземных экосистемах эффективно разлагать высокомолекулярные ксенобиотики привлекает особое внимание. Способность грибного мицелия быстро распространяться в почве, выделяя с большей активностью экзоферменты, инициирует деградацию высокомолекулярных токсикантов, включая ПАУ [Peng et al., 2008; Harms et al., 2011].

Как правило, ПАУ, содержащие два или три ароматических кольца, легко разлагаются аборигенной микрофлорой. Было продемонстрировано, что некоторые бактерии используют эти низкомолекулярные ПАУ как источник углерода и энергии

[Cerniglia и Heitkamp, 1989; Peng et al., 2008]. Однако ПАУ, содержащие четыре или более ароматических кольца, не поддаются бактериальной деструкции, поскольку они термодинамически стабильны, гидрофобны и сильно адсорбируются на твердых частицах. С другой стороны, многие почвенные грибы инициируют деградацию таких высокомолекулярных ПАУ, хотя они редко завершают их минерализацию. Сообщалось, что две группы, включая лигнинолитические и нелигнинолитические микромицеты, принимают участие в деструкции высокомолекулярных ПАУ почвы [Bezalel et al., 1996]. Лигнолитическая группа микромицетов в основном состоит из грибов белой гнили, например, *Pleurotus ostreatus* [Bezalel et al., 1996], *Phanerochaete chrysosporium* [Peng et al., 2008] и *Irpex lacteus* [Silva et al., 2003]. Лигнинолитические грибы способны расщеплять ароматические кольца ПАУ с помощью внеклеточных лигнинолитических ферментов, и это может привести к их минерализации. Напротив, нелигнинолитические грибы, такие как *Cunninghamella elegans* [Pothuluri et al., 1990], *Penicillium janthinellum* [Launen et al., 1999; Boonchan et al., 2000] и *Syncephalastrum* sp. [Boonchan et al., 2000], могут окислять ПАУ только в гидрофильные или детоксифицированные продукты, без минерализации.

Растворимые продукты распада затем поглощаются и далее катаболизируются внутриклеточными ферментами. Помимо микромицетов, другие почвенные микроорганизмы могут использовать высвобождаемые субстраты. Происходят сложные симбиотические взаимодействия, которые побуждают микромицеты совместно с бактериями разрабатывать сложные стратегии кооперативной деградации УВ, начиная от производства антибиотиков и заканчивая специфической стимуляцией helper- бактерий [de Boer et al. 2005]. Установлено, что некультивируемые бактерии могут присутствовать не только внутри клеток грибов, но и на поверхности гифов, в гифосфере [Foster, Bowen, 2012].

В результате такого взаимодействия биохимическое разнообразие биodeградации трудно биоразлагаемых/биодоступных ксенобиотиков может быть достигнута [Raj et al. 1992]. В таких условиях исходные УВ могут деградировать в различной степени, от частичных превращений до полной биodeградации.

1.7. Методы очистки от нефтезагрязнений

При ликвидации загрязнений окружающей среды УВ используют различные методы: механические, физико-химические и биологические.

Совокупность процессов по очистке природных объектов посредством живых организмов, способных потреблять и перерабатывать загрязняющие органические вещества называется биоремедиацией [Плешакова, 2008].

При нефтяных загрязнениях применяют следующие биологические методы [Gupta, 2003]:

1. Биоремедиация с помощью растений (фиторемедиация, фитобиоремедиация, фитомелиорация);
2. Биоремедиация с применением представителей животного мира (зооремедиация);
3. Биоремедиация с использованием микроорганизмов (микробная биоремедиация, микробиоремедиация) является самым распространенным и используемым из биологических методов [Gupta, 2003].

Биоремедиацию экосистем проводят путем либо биостимуляции местной микробиоты, либо биоаугментацией – внедрением активных углеводородокисляющих микроорганизмов [Заболотских, 2018].

Биостимуляция *in situ* основана на обеспечении оптимальных условий для местных микроорганизмов способных перерабатывать нефть и/или НП (обогащение среды соединениями азота, фосфора, калия, аэрация и т.д.). Биостимуляция *in vitro* отличается тем, что производится отбор естественной микробиоты загрязненных почв или водных экосистем. В реакторах или ферментерах обеспечивается рост микроорганизмов, которые обладают способностью наиболее эффективно перерабатывать конкретный загрязнитель. Далее эту с микробиоту возвращают в загрязненные объекты с применением приемов стимуляции *in situ* [Янкевич, 2015].

В случае биоаугментации чаще используют ассоциации микроорганизмов, с известным типом взаимодействия - катаболизм. Отдельные типы микроорганизмов смеси перерабатывают отдельные классы УВ, либо обеспечивают дополнительные источники азота, если ассоциация включает, например, азотфиксирующие бактерии р. *Azotobacter*. [Пучкова, 2017].

Для биоремедиации экосистем используют два подхода: стимулирование аборигенной микробиоты (с помощью аэрации или внесения дополнительных источников азота и фосфора) и биоаугментации, или введение в природную экосистему активных углеводородоокисляющих микроорганизмов [Заболотских, 2018].

УОМ являются компонентами трофических цепей, где выполняют роль «продуцентов», так как производят продукты деградации нефти и НП для использования «спутниками-консументами», которые при этом не обладают способностью к окислению УВ. Однако, возможно, существует и обратная взаимосвязь между спутниками и продуцентами, в которой происходит активация жизнедеятельности продуцентов, обеспечивающая спутникам-консументам дополнительный источник питательных веществ. Как было показано, микроорганизмы-спутники могут существенно влиять на активность микроорганизмов-нефтеокислителей путем выделения в окружающую среду продуктов, активирующих их жизнедеятельность, либо путем защиты их от экстремальных условий среды, выполняя своего рода функцию helper- бактерий [Журина и др., 2007; Плакунов и др., 2008].

1.7.1. Биологические препараты для очистки от нефтезагрязнений

УОМ, выделенные из различных НП, способные активно развиваться в такой токсичной среде, используя широкий спектр УВ, могут являться основной биопрепаратов для биоремедиации.

Биопрепараты на основе штаммов УОМ можно разделить на монокультурные и смешанные [Кураков и др., 2006, Коршунова, 2019].

К недостаткам монокультурных препаратов можно отнести следующее:

- 1) активность только к конкретным УВ;
- 2) зависимость активности от значений рН, солености, температуры и концентрации углеводородов характеризуется узкими пиками;
- 3) бактерии перерабатывают УВ на границе раздела двух сред – воды и УВ. Стоит отметить, что концентрирование грамм-отрицательных микроорганизмов происходит только водной среде, тогда как грамм-положительные и в водном слое, и в слое углеводорода.

Биопрепараты смешанной культуры имеют более широкие адаптационные и экологические возможности для их использования [Владимцева и др., 2010, Коршунова, 2019].

Согласно нормативному документу [Технология очистки различных сред..., 2002] под биопрепаратом понимают вещества на основе штаммов микроорганизмов, на которые получены все необходимые разрешительные документы. Данные вещества должны быть безопасны с медицинской, санитарно-гигиенической и экологической точки зрения и быть легко воспроизводимы в промышленных масштабах.

В настоящее время предлагается достаточно широкий набор препаратов, из которых наиболее известным в России является “Путидойл” [Евдокимова и др., 1994], “Деворойл” [Борзенков и др., 1994], “Экойл” [Ермоленко и др., 1997] и ряд других. Известны также многие зарубежные аналоги “Hydrobac” [Staff, 1982], “Biocrack” [Kopp-Holtwiesche, 1992] и другие.

Установлено, что при иммобилизации бактериальных клеток, входящих в состав биопрепаратов, повышается устойчивость к неблагоприятным воздействиям окружающей среды и увеличивается потенциал к деградации УВ [Wilson и Braley, 1996; Cunningham et al., 2004; Rahman et al., 2006; Омарова и др., 2012].

1.7.2. Биокмпозитные материалы на основе углеводородокисляющих микроорганизмов, применяемые в биоремедиации

У УОМ в иммобилизованном состоянии повышается устойчивость к стрессовым воздействиям и возрастает деструктивный потенциал [Cunningham et al., 2004; Rahman et al., 2006; Lobakova et al., 2016; Ivanova et al., 2019]. Таким образом, создание систем, объединяющих сорбенты и микроорганизмы, способные к окислению УВ нефти и НП, является перспективным направлением [Podorozhko et al., 2008; Лейкин и др., 2008; Dedov et al., 2017]. В таких системах удаление нефти и НП из водной среды происходит благодаря как их поглощению сорбентом, так и деструкции бактериями, ассоциированными с сорбентом.

1.7.2.1 Типы сорбентов для иммобилизации углеводородокисляющих микроорганизмов

В качестве сорбентов для иммобилизации УОМ можно использовать природные объекты, которые могут являться при этом отходами различных производств. Например, можно использовать побочные продукты деревообрабатывающей промышленности, которые широко доступны в России, дешевы и экологически безвредны. Однако такие недостатки природных источников как высокая гидрофильность и низкая нефтеемкость вынуждают проводить дополнительную гидрофобизацию носителя [Podorozhko et al., 2008].

Полимерные нетканые материалы лишены вышеперечисленных недостатков, к тому же обладают возможностью регенерации [Wei et al., 2003; Бузник и др., 2010; Dedov et al., 2017], высокой избирательностью сорбцией нефти и НП из водной среды благодаря различным химическим модификациям [Агеев и др., 2003]. Один из немногочисленных недостатков, а именно проблему утилизации отработанных материалов, содержащих остатки нефти и НП, предлагается решить обработкой биосурфактантами бактериального происхождения [Wei et al., 2005].

Немаловажным свойством таких материалов является высокопористая волокнистая структура, обеспечивающая большую площадь для иммобилизуемых УОМ, заселяющих данные поры. Кроме того, целесообразно использование в качестве УОМ штаммов способных не только к окислению УВ, но и к синтезу биосурфактантов, что обуславливает их большой биотехнологический потенциал для повышения эффективности биоремедиации.

Имеются данные об использовании нетканых полимерных материалов в качестве матриц для УОБ [Лейкин и др., 2008; Lobakova et al., 2016; Dedov et al., 2017; Ivanova et al., 2019].

Иммобилизация на разного рода полимерных носителях применяется для обезвреживания разных групп токсичных соединений. Было изучено использование инкапсулированных бактерий для поглощения металлов [Wong et al., 1993; Žur et al., 2016] и деградации токсичных соединений, в том числе входящих в состав нефти и НП (табл. 5).

Таблица 5. Примеры твердых носителей, используемых для иммобилизации микробных клеток в биодеградаци [Cassidy et al., 1996; Кащеева, 2015].

Деградируемые субстраты	Микроорганизмы	Носитель
Углеводороды	<i>Rhodococcus fascians</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и <i>Microbacterium paraoxydans</i>	сополимера метилметакрилата-акрилонитрила (СПАН)
3-хлоранилин	<i>Pseudomonas acidovorans</i> CA28	альгинат
2-хлорэтанол	<i>Pseudomonas putida</i> US2	гранулированный частицы лецитина
Хлорфенолы	Ассоциация культур	альгинат
Хлорфенол	<i>Rhodococcus spp</i>	полиуретан
Хлорфенолы	Активный ил	микроноситель R-633
П-крезол	<i>Pseudomonas sp</i>	альгинат
Дихлоруксусная кислота	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	альгинат
Углеводороды	<i>Candida parapsilosis</i>	гранулированная глина
Неорганические цианиды	<i>Pseudomonas putida</i>	агар
П-нитрофенол	Ассоциация культур (<i>Pseudomonas spp</i>)	альгинат каррогенан
Полиароматические углеводороды	Ассоциация культур	осадочная порода диатомей
Пентахлорфенол	<i>Flavobacterium spp</i>	полиуретан
Пентахлорфенол	Ассоциация культур	анаэробные гранулы
Фенол	Ассоциация культур	альгинат хитозан целлюлоза
Фенолы	<i>Pseudomonas putida</i> P8	полиакриламид-гидрозид
Пиридин	<i>Pimelobacter sp</i>	альгинат
ПАВы/отходы промышленности	<i>Pseudomonas C12B</i>	полиакриламид
Додецил сульфат натрия	<i>Pseudomonas C12B</i>	полиакриламид
Летучие жирные кислоты	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	полиакриламид

Потенциальные загрязнения УВ являются угрозой для природных экосистем. Биотехнологические способы очистки, основанные на использовании иммобилизованных на носителях клеток УОМ, зарекомендовали себя как эффективные и экологически безопасные средства для охраны окружающей среды. Применение биопрепаратов на основе аборигенных УОМ наиболее актуально, поскольку они адаптированы к данным условиям окружающей среды, сокращается время адаптации клеток к условиям среды и повышается эффективность деструкции УВ нефти и НП, но возможно и использование специализированных высокоэффективных в отношении деградации УВ микроорганизмов, выделенных из нефти и НП. При этом включение в состав биопрепаратов штаммов микроорганизмов, способных как к окислению УВ, так и к продукции различных эндо- и экзоПАВ, обеспечивает более эффективную утилизацию нефти и НП за счет эмульгирования нефти, облегчающего ее биodeградацию.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исследуемые образцы

Материалом исследования явились образцы нефтепродуктов:

- образец реактивного топлива ТС-1 (загрязненный);
- образец реактивного топлива ТС-1* (контрольный);
- образец бензина марки АИ-95;

Загрязненный образец реактивного топлива ТС-1, произведенного по Российскому стандарту (ГОСТ 10227-86), был взят из отстойной зоны кессон-баков самолета, эксплуатировавшего в условиях жаркого климата, и не имел явных признаков загрязнения. Образец топлива ТС-1 представлял собой прозрачную бесцветную жидкость, не имеющую видимых признаков микробиологического поражения, pH 7,5. Образец топлива ТС-1* — прозрачная бесцветная жидкость (контрольный образец реактивного топлива ТС-1), pH 7,5; Проба бензина АИ-95 представляла собой слив из топливной системы автомобиля во время технического обслуживания и имела признаки загрязнения на границе раздела фаз в виде механических примесей. Образец бензина АИ-95 — прозрачная жидкость зеленоватого оттенка, pH 7,5.

2.2. Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов

Выделение УОМ проводили путем внесения 250 мкл исследуемого образца топлива на чашки Петри с плотными средами (1,5% агара) при комнатной температуре. Каждый образец топлива брали в 3 повторностях.

Выделение углеводородокисляющих бактерий

Для выделения углеводородокисляющих бактерий (УОБ) из образцов НП использовали стандартные накопительные микробиологические среды (жидкие и плотные) - «универсальная среда» (УС), УС10 (разбавленная в 10 раз УС), среда по ГОСТ 9.023-74 (СГ) и среда Эванса (СЭ). Для поддержания культур УОБ использовали среду Эванса минеральную (ЭМ), (СЭ без дрожжевого экстракта) и СГ, в которые добавляли сырую стерильную нефть ($\rho=0,870 \text{ г/см}^3$) или модельную смесь углеводородов ($\text{C}_{15}\text{H}_{32}$, $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$, $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$ и C_9H_{12} -псевдокумол) в количестве 1,96% об.

Учет колоний УОБ проводили на 4-7-е сутки путем подсчета общего числа КОЕ, выросших на средах. Чистые культуры УОБ, из полученных колоний микроорганизмов получали методом предельных разведений [Нетрусов, 2005].

Выделение микромицетов

Для получения изолятов микромицетов использовали селективные органические среды: сусло-агар (СА), Чапека. После 3-10 дней инкубации (23 °С) колонии микромицетов переносили на свежую среду для получения моноспоровых культур и инкубировали в течение 5 дней. Проверку чистоты культур микромицетов проводили следующим образом: с полученных чашек отдельные споры были перенесены на чашки с агаризованную СА (15% пивного сусла, 1,5% агара, 1000000/л пенициллина). Через 3-5 суток инкубации при 25°С проводился визуальный контроль полученных колоний. В работе использовались только однородные колонии, не имеющие заметных секторов. Поддержание выделенных культур мицеллиальных грибов осуществляли на среде Чапека.

Для выявления культивируемых форм бактерий, связанных с мицелием моноспоровых культур микромицетов, были использованы среды: УС [Matlakowska, 2009] и ЭМ [Evans et al., 1970]. Ранее было показано, что среды СЭ и УС являются оптимальными для выделения культивируемых гетеротрофных бактерий из образцов загрязненной нефти и топлива [Lobakova et al., 2016; Ivanova et al., 2019]. Все изоляты микромицетов переносили либо на жидкую, либо на твердую среду, содержащую 2,0 % (мас./об) агара. Их инкубировали в течение 10 дней при температуре 26°С. Состав сред, использованных в работе, приведен в таблице 6.

Таблица 6. Состав сред, использованных в работе.

Название среды	Состав среды (г/л)
Среда Эванса [Evans et al., 1970]	KH_2PO_4 2,15, Na_2HPO_4 3,4, NH_4NO_3 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04, FeSO_4 0,03, CaCl_2 0,04, дрожжевой экстракт 2, H_2O дист. до 1 л, агароза 1,5%
«Универсальная Среда» [Лысак, 2003]	пептон 2, дрожжевой экстракт 1, гидролизат казеина 1, глюкоза 1, CaCO_3 5, H_2O водопр. до 1 л, агароза 1,5%

Продолжение таблицы 6

Среда по ГОСТ 9.023-74	KNO ₃ 0,9, MgSO ₄ 0,12, KH ₂ PO ₄ 0,09, Na ₂ HPO ₄ 0,21, H ₂ O водопр. До 1 л, агароза 1,5%
Среда Чапека [Thom, Church, 1926]	сахароза 30, NaNO ₃ 2, K ₂ HPO ₄ 1, MgSO ₄ *7H ₂ O 0,5, KCl 0,5, FeSO ₄ *7H ₂ O 0,1, H ₂ O водопр. до 1 л, агароза 1,5%
Сусло Агар [Rapp, 1992]	сусло и агар 1,5%
Среда Таусона [Романенко, Кузнецова, 1974]	K ₂ HPO ₄ – 0,5; MgSO ₄ – 1,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,0; NaCl – 30, агар – 20, pH 7,0.

2.3. Микроскопия

2.3.1. Световая микроскопия

Морфологию и подвижность клеток УОБ, выращенных на твердой СЭ в течение 5 суток при температуре 23 °С изучали методом фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Leica DM 2500 (Leica, Германия), оснащенном камерой DFC 7000T (Leica Microsystems, Германия). Биопленки в образце топлива ТС-1 выявляли на мембранном фильтре (нитроцеллюлоза, размер пор 0,8 мкм, диаметр 50 мм, Filter solution, Россия) после фильтрации, а в образце бензина АИ-95 в осадке, визуализируемым на границе раздела фаз. Кроме того, для оценки наличия ЭПС в слое бактериальной биопленки образцы окрашивали 0,15% рутениевым красным (Sigma, США) (pH 7,0) или метиленовым синим (pH 7,0) в течение 10 мин, отмывали стерильной водой и исследовали под световым микроскопом [Ножевникова и др, 2015].

Выделенные культуры микромицетов тоже подвергали микроскопическому анализу для их идентификации. Анализ морфологии микромицетов проводили на 7-дневных культурах, выращенных на среде Чапека при 25°С. Морфологию мицелия исследовали методом световой микроскопии на микроскопе Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия). Морфологическая идентификация выделенных микромицетов проводилась в соответствии с руководствами [Raper, Fennel 1965; Raper et al. 1968; Pitt, 1991; Klich, 2002; Samson, Frisvard 2004; Yilmaz et al. 2012, 2014; Chen et al. 2016] и общими принципами классификации грибов.

2.3.2. Сканирующая электронная микроскопия

Подготовку препаратов для СЭМ проводили по стандартной методике [Gorelova et al., 2009]. Исследуемые образцы фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на кокадилатном буфере в течение 1 часа, затем обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающей концентрации. После обезвоживания образцы на ночь переносили в абсолютный ацетон, затем высушивали при критической точке на установке «Dryer HCP-2» (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке «IB-3IonCoater» (Eiko, Япония). Микроскопию проводили на микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ.

2.4. Идентификация микроорганизмов молекулярно-генетическими методами

2.4.1. Выделение ДНК

Для выделения бактериальной ДНК использовали набор Thermo Scientific™ MagJET™ Plant Genomic DNA Kit. Отбирали 1,5 мл накопительной культуры и центрифугировали 3 минут при максимальных оборотах, удаляли супернатант. Добавляли 500 мкл лизирующего буфера А, 70 мкл лизирующего буфера В и 20 мкл РНКазы А, центрифугировали 20 секунд. Инкубировали 10 минут при 65°C на термошейкере. Добавляли 130 мкл раствора для преципитации, инкубировали 5 минут на льду и затем центрифугировали 10 минут при максимальных оборотах. Переносили 400 мкл супернатанта в новые эппендорфы. Далее добавляли 25 мкл магнитных частиц. Для связывания ДНК с магнитными частицами добавляли 400 мкл 96% этанола, центрифугировали 20 секунд, инкубировали 1 минуту при комнатной температуре и далее ставили на магнитный штатив на 1-2 минуты, удаляли супернатант. Добавляли 800 мкл промывочного буфера 1, центрифугировали 20 секунд и инкубировали 1 минуту при комнатной температуре, затем 1-2 держали на магнитном штативе и удаляли супернатант. Далее добавляли 800 мкл промывочного буфера 2, 20 секунд центрифугировали, затем инкубировали 1-2 при комнатной температуре и также держали 1-2 минуту на магнитном штативе и затем удаляли супернатант. Повторяли процедуру с промывочным буфером 2 два раза. Далее для высушивания от этанола помещали с открытыми крышками на термошейкер на 5 минут при 37°C. Наконец, для элюции ДНК с магнитных частиц добавляли 50-150 мкл элюирующего раствора и инкубировали 5 минут при 70°C на

шейкере при 600-700 оборотах в минуту. Далее снова помещали на магнитный штатив на 5 минут и переносили элюат (ДНК) в новые эппендорфы.

2.4.2. Полимеразная цепная реакция

Фрагмент гена *16S rPHK* бактериальной ДНК, длиной примерно 1500 п. н. амплифицировали с помощью пары универсальных бактериальных праймеров: 16Suni27F [5'-AGAGTTTGATCCTGGGCTCAG-3'] и 16Suni907R [5'-CCGTCAATTCTTTAGTTT-3'] [Lane et al., 1985] в полимеразно-цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Mastercycler Gradient DNA amplifier (Eppendorf, Германия). Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 10 мкл 1× Taq-полимеразного буфера (Evrogen, Россия), по 1 мкл прямого и обратного праймеров, 1 мкл ДНК соответствующего образца и 37 мкл воды. ПЦР проводили на амплификаторе в следующем режиме: предварительная денатурация 95°C 3 минуты, денатурация при 95°C 30 секунд, отжиг праймеров при 50°C 30 секунд и элонгация при 72°C 1,5 минуты. Количество циклов — 20 с использованием Taq-полимеразы ScreenMix (Евроген, Россия) [Tamaki et al., 2005].

Для проверки наличия бактерий в культурах грибов использовали экспресс-метод обнаружения с помощью праймеров на гены *16S/18S rPHK*. Геномную ДНК экстрагировали из 100 мг мицелия с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Германия) в стерильных условиях. ДНК амплифицировали на градиентном ДНК-амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия), как описано Wang et al., 2014. Гены эукариотической и прокариотической малой субъединицы рРНК амплифицировали с помощью пары универсальных праймеров: U515F [5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'] и U1390R [5'-TTGYACACACCGCCCGTC-3'], разработанных в исследовании Wang et al., 2014. Метод основан на использовании пар праймеров к высококонсервативным мотивам малой субъединицы рРНК. Это возможно благодаря ортологии между генами *16S rPHK* и *18S rPHK* [Chekanov et al., 2019]. С их помощью удалось получить ампликоны как прокариотических, так и эукариотических генов с ожидаемой длиной 900 и 1250 б.п. соответственно для одновременной экспрессной детекции грибных и бактериальных генов.

2.4.3. Электрофорез в агарозном геле

Результаты амплификации регистрировали с помощью электрофореза. Для этого готовили 1-2% агарозный гель с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. ДНК, полученную в результате выделения, в объеме 5-10 мкл (или более) смешивали со стандартным красителем (бромфенолблау в глицерине) в соотношении 1:6, и полученную смесь наносили в лунки агарозного геля; ДНК, полученную после амплификации, не смешивали с красителем, так как он уже входит в состав Taq буфера. В качестве маркера использовали Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder фирмы Евроген для фрагмента бактериальной ДНК и маркера молекулярного веса Fast Ruler™ (Fermentas) – для ДНК микромицетов. Затем гель помещали в электрофорезный буфер TAE и ДНК разделяли в соответствии с размером в токе электрического поля при 4 В/см. Для визуализации сигналов использовали УФ-трансиллюминатор с длиной волны 310 нм. Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент включали отрицательный (вода, свободная от ДНК и РНК) и положительный контроли (известная ДНК, дающая ампликон определенного размера).

2.4.4. Очистка ПЦР продукта

Для определения последовательностей нуклеотидов амплифицированные фрагменты вырезали из агарозного геля после электрофоретического разделения и очищали. Очистку ПЦР продукта проводили единым способом и для бактериальной, и для микромицетной ДНК с помощью набора Cleanup Standard [Евроген, Россия]. Набор предназначен для очистки фрагментов двухцепочечной ДНК (70-10000 п.о.) из агарозных гелей и реакционных смесей (ПЦР, рестрикция, лигирование и т.д.). Специально подобранный «Связывающий раствор» обеспечивает условия, при которых на фильтре колонки сорбируется только двухцепочечная ДНК, тогда как одноцепочечная ДНК, РНК, соли, ферменты, нуклеотиды и другие вещества остаются в растворе. На колонке может быть обработано до 200 мг геля; рекомендуемое количество – до 150 мг. На первом этапе производили экстракцию ДНК из агарозного геля. Для этого вырезали фрагмент геля с целевой ДНК и взвешивали (на одну колонку не более 200 мг геля). Добавили 3 объема «Связывающего раствора» к 1 объему геля. Объем геля в мкл численно

приравнивается к его массе в мг (100 мг геля $\approx$ 100 мкл). Инкубировали смесь при 50-55°C до полного растворения геля.

На втором этапе непосредственно выделяли ДНК на колонке. Поместили спин-колонку в собирательную пробирку. Перенесли пробу в колонку, подождали 2 минуты и центрифугировали 60 секунд. Удалили фильтрат из собирательной пробирки. Добавили 700 мкл «Промывочного раствора» в колонку, центрифугировали 60 секунд. Удалили фильтрат. Центрифугировали пустую колонку 90 секунд для полного удаления промывочного раствора. Поместили колонку в новую пробирку (1,5 – 2 мл). Нанесли в центр мембраны 50 мкл элюирующего раствора, подождали 60 секунд. Центрифугировали 30 секунд.

2.4.5. Секвенирование ПЦР продуктов

Секвенирование бактериального ПЦР продукта проводили на приборе ABI Prizm 3730 (Applied Biosystems) по методу Сэнгера [Sanger et al., 1977]. Чтение последовательностей нуклеотидов проводили в двух направлениях. Сравнительный анализ и поиск гомологов проводили по базе данных NCBI GenBank с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Altschul et al. 1997; Camacho et al., 2009]. Последовательности были проанализированы в программном обеспечении MEGA 7.0.21 [Kumar et al., 2016]. Многократное выравнивание было выполнено с использованием MUSCLE [Edgar, 2004] с 10 итерациями и другими параметрами, установленными по умолчанию. Все позиции с охватом сайта менее 5% были исключены. Анализ включал в себя в общей сложности 26 нуклеотидных последовательностей. В общей сложности 285 позиций в итоговом наборе данных. Филогенетические деревья были построены с использованием алгоритма neighbor-joining (NJ) [Saitou, Nei 1987] с параметрами по умолчанию. Точность топологии дерева была проверена с помощью bootstrap анализа [Felsenstein, 1985] с 1000 повторений.

2.4.6. Метабаркодинг некультивируемых бактерии в биомассе микромицетов

Для секвенирования метагенома бактериального компонента грибо-бактериального консорциума изолятов микромицетов применяли метод высокопроизводительного секвенирования (NGS). Экстракцию геномной ДНК проводили из 2 мл образцов биомассы каждого микромицета с помощью набора для выделения DNA PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc., США) в соответствии с

протоколом производителя. Для этого последовательность, соответствующая гипервариабельному участку V4 гена *16S rRNA* была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием праймеров: F515 [5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'] и R806 [5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'] [Bates et al., 2011], смешанные с адаптерами Illumina, площадкой для посадки полимеразы, двумя линкерами и баркодами. Амплификацию проводили с помощью смеси ДНК-полимераз Encyclo (Евроген, Россия) 25 мкл ПЦР смеси, содержала 10-15 нг геномной ДНК, 0,05 мкмоль каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 0,2 мкмоль каждого праймера, 1 ед. активности полимеразы и буферный раствор. ДНК была амплифицирована на Mastercycler Gradient DNA (Эппендорф, Германия) в следующем режиме: 98°C–15 с, 62°C–15 с, 72°C–15 с, 30 циклов, начальная денатурация 98°C–60 с, конечное элонгация 72°C–10 мин. ПЦР продукт очищали с помощью набора для экстракции MinElute Gel (Qiagen, Германия).

Библиотеки секвенирования были подготовлены в соответствии с Illumina MiSeq Reagent Kit Preparation Guide. ПЦР продукты денатурировали в 0,1 м NaOH и разбавляли до концентрации ДНК 15 пкмоль. Полученное раствор (510 мкл) смешивали с 14 пкмоль библиотеки Phi фага (Illumina, США) (90 мкл) в качестве контроля и секвенировали на секвенаторе MiSeq [Illumina, США] с использованием Miseq 500 cycles kit (Illumina, США) для 2 x 250 п. н. секвенирования спаренных концов.

Предварительная обработка наборов данных была выполнена в QIIME v 1.9.1 [Caporaso et al., 2010]. Для анализа данных метабаркодинга участка гена *16S pPHK* были объединены прямые и обратные последовательности, очищены от адаптерных последовательностей, химерных последовательностей и последовательностей неудовлетворительного качества. Последовательности длиной менее 200 п.н. и длиной более 1000 п.н. были удалены. Гомологи митохондриальных последовательностей были найдены методом BLAST [Altschul et al. 1997; Camacho et al., 2009] в Genbank NCBI.

Для интерпретации результатов метабаркодинга использовали программу VAMPS - [Visualization and Analysis of Microbial Population Structures - [Huse et al., 2014] с использованием эталонной базы данных 16S pPHK Silva release 138 v. 1.9.5/1.4.3 [Becatti et al., 2017] (<https://vamps2.mbl.edu>). Для визуализации β-

разнообразия на уровне родов использовали диаграмму Венна, показывающую сходство между 2-5 сообществами на пересечении окружностей. Для построения данной диаграммы использовали онлайн сервис Bioinformatics and Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

2.5. Детекция генов окисления углеводов и синтеза биоПАВов

Для получения целевых продуктов генов, кодирующих алканмонооксигеназу (последовательности использованных праймеров указаны в таблице 7, из ДНК выделенных штаммов проводили ПЦР с использованием следующих температурно-временных параметров: начальная инициация – 94°C х 3 мин, последующие 35 циклов – 94°C х 30 с, 55°C (*Cyp153*) или 60°C (*alkB*) х 40 с, 72°C – 1 мин; конечная полимеризация – 72°C х 7 мин. [Иванова и др., 2014]. Для генов *Alk 1-3* ПЦР проводили в следующем режиме: начальная инициация – 94°C х 3 мин, последующие 30 циклов – 94°C х 60 с, 40°C х 30 с, 72°C – 30 с; конечная полимеризация – 72°C х 7 мин. [Kohn et al., 2002].

Для получения целевых продуктов генов, кодирующих синтез биоПАВов (последовательности использованных праймеров указаны в таблице 7), из ДНК выделенных штаммов проводили ПЦР с использованием следующих температурно-временных параметров: начальная инициация – 94°C х 5 мин, последующие 30 циклов – 94°C х 30 с, 45°C х 60 с, 72°C – 1 мин; конечная полимеризация – 72°C х 10 мин. – для гена *spf0* [Sekhon et al., 2011]. Для гена *RhlA* ПЦР проводили в следующем режиме: начальная инициация – 94°C х 3 мин, далее 30 циклов – 94°C х 60 с, 48°C х 30 с, 72°C – 30 с; конечная полимеризация – 72°C х 7 мин. [Schmidberger et al., 2013].

ПЦР продукты (25 мкл) анализировали с помощью гель электрофореза. Для проведения электрофореза готовили 1-2% агарозный гель с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Таблица 7. Последовательности праймеров, использованных для детекции генов углеводородокисления и синтеза биоПАВов.

Детектируемый ген	Последовательность, 5'–3'	Длина ПЦР–фрагмента, п.н.
<i>Cyp153</i>	F – GATCCGCTCGCGTGTC R – GGGAGTGAGGCGAACCA	870
<i>alkB</i>	F – AGAACSCRCCSGAYGAGG R – ATRTCRCCGYCRTAGTGC	960
<i>Alk1</i>	F – CATAATAAAGGGCATCACCGT R – GATTTCAATTCTCGAAACTCCAAAC	185
<i>Alk2</i>	F – GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA R – TTGTTATTATTCCAACATGCTC	271
<i>Alk3</i>	F – TCGAGCACATCCGCGGCCACCA R – CCGTAGTGCTGACGTAGTT	330
<i>RhlA</i>	F – GATCGAGCTGGACGACAAGTC R – GCTGATGGTTGCTGGCTTTC	95
<i>spf0</i>	F – CTAGAATTCAGATTTACGGAATTTATATG R – GGGGAATTCAGGGTGTGCGGCGCATAC	642

2.6. Физиологическая характеристика выделенных штаммов бактерий

Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов проводили согласно методикам, описанным [Нетрусов, 2005] и определителю бактерий Берджи [1997]. Выделенные бактериальные штаммы УОБ были охарактеризованы с помощью следующих физиологических и биохимических тестов: 1) окраска клеточной стенки по Граму; 2) наличие цитохромоксидазы и каталазы определяли после 24 ч инкубации на твердой СЭ как описано [Smibert and Krieg, 1981]; 3) окислительно-ферментативный тест Хью и Лейфсона в соответствии с [Hugh, Leifson, 1953]; 4) тесты на усвоение углеводов, спиртов, аминокислот и восстановление азота проводились с использованием стандартных наборов для

идентификации микроорганизмов (NICF, Россия www.nicf.spb.ru) в соответствии с протоколом производителя.

Дифференциация бактерий по Граму проводили без окрашивания с использованием 3%-ного раствора КОН [Нетрусов, 2005].

2.7. Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на среде с углеводородами

Сравнение роста выделенных культур УОБ в присутствии УВ проводили по методу Журиной [2008]. В агаризованную среду ЭМ, содержащую 1,96% об. смеси УВ №1 ($C_{15}H_{32}$, $C_{16}H_{34}$, $C_{18}H_{38}$ и C_9H_{12} -псевдокумол) вносили 0,025 мкл суспензионной культуры штамма УОБ с оптической плотностью (ОП) 0,2 и равномерно распределяли по поверхности чашки шпателем. Через 7 суток выросшие колонии микроорганизмов смывали раствором 1%-го NaCl двумя порциями по 5 мл. В объединенной пробе измеряли оптическую плотность полученной суспензии клеток с помощью ФЭК КФК-2-УХЛ 4.2 при $\lambda=540$ нм и толщине оптического слоя $l=10$ мм.

Для определения способности к использованию УВ в жидкой среде культуры выделенных УОБ высевали в жидкую среду ЭМ, содержащую 1,96% об. смеси УВ №1, ДТ или нефти, вносили 0,025 мкл суспензионной культуры штамма УОБ с оптической плотностью (ОП) 0,2. В объединенной пробе измеряли оптическую плотность полученной суспензии клеток с помощью ФЭК КФК-2-УХЛ 4.2 при $\lambda=540$ нм и толщине оптического слоя $l=10$ мм, а также оценивали визуальные изменения.

2.8. Оценка роста изолятов микромицетов на среде с углеводородами

Споровые суспензии (объемом 0,3 мл, оптической плотностью 0,2 при 540 нм) микромицетов переносили в стеклянные пробирки объемом 20 мл, содержащие 3 мл стерильного реактивного топлива ТС-1 и среду ЭМ. Пробирки инкубировали в термостате при температуре +28 °С с встряхиванием и контролировали каждые 5 дней в течение месяца. Реактивное топливо ТС-1 стерилизовали фильтрованием через круглые нитроцеллюлозные мембранные фильтры диаметром 50 мм с диаметром пор 0,24 мкм (Filter Solution, Россия). Признаки роста оценивали визуально, в баллах: 0 баллов – нет роста; 1 балл – мутный раствор, очень мелкие хлопья; 2 балла – хлопья средней величины, легко различимы визуально; 3 балла –

крупные хлопья; 4 балла – небольшие сгустки; 5 баллов – крупные сгустки [Васильева и др., 2009; Кривушина, 2012].

Оценку роста изолятов микромицетов в присутствии нефти проводили, высевая чистые культуры микромицетов на агаризованную среду ЭМ, содержащую 1,96% об. стерильной нефти ($\rho=0,870 \text{ г/см}^3$) в виде полоски по центру чашки Петри. При отсутствии роста не наблюдались никакие признаки разрушения полоски нефти, а в случае активного роста и использования нефти микромицетом наблюдалось исчезновение полоски нефти наряду с обильным ростом колоний микромицета.

2.9. Способность бактериальных штаммов к использованию модельной смеси углеводов

Для определения способности использовать УВ модельных смесей 5 мл каждой выделенной культуры УОБ помещали в колбы со 100 мл ЭМ, содержащей 1% (об.) смеси УВ, до конечной оптической плотности клеток 0,2. В качестве единственного источника углерода мы использовали две смеси: смесь УВ №1, включающую н-алканы ($\text{C}_{15}\text{H}_{32}$, $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ и $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$) и триметилбензол C_9H_{12} и смесь УВ №2, включающую н-алканы ($\text{C}_{15}\text{H}_{32}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$ и $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$), изоалкан ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}$), циклоалкан ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}$), алкены ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{28}$) и ароматические углеводороды (триметилбензол (C_9H_{12}), нонилбензол ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$)). Вторую смесь использовали для оценки биodeградационных свойств выделенных штаммов рода *Bacillus* и *Paenibacillus*.

Неинокулированная среда ЭМ с 1% (об.) вышеуказанных углеводов использовались для мониторинга абиотической потери УВ (контроль).

Все колбы инкубировались на шейкере В. Braun RS-1-T (INFORS AG, Германия) при 120 об. / мин. при 24°C в течение 7 дней. После инкубации одну колбу для каждого испытуемого состояния удаляли и все ее содержимое использовали для определения величины деградации УВ конкретным штаммом бактерий. Остаточные УВ извлекали из среды культивирования с помощью н-гексана. Экстракцию повторяли три раза и полученные гидрофобные фракции объединяли и сушили над безводным Na_2SO_4 . Затем объем экстракта доводили до 80 мл гексаном.

Для анализа остаточных УВ в модельных смесях был использован газовый хроматограф YL 6100 оборудованный пламенно-ионизационным детектором (YL Instrument, Республика Корея). Разделение УВ выполняли на неполярной TP-5MS

кварцевой капиллярной хроматографической колонке длиной 60 м, диаметром 0,25 мм, а стационарная-фазовая толщина пленки 0,25 мкм; в качестве газа-носителя использовали гелий с расходом 3 мл/мин. Сбор и обработка данных были выполнены с помощью программы YL-Clarity. Работа проводилась совместно с кафедрой общей и неорганической химии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Степень деградации отдельных УВ модельной смеси бактериями выражали в процентах и рассчитывали, как отношение их процентного содержания в исследуемых образцах к процентному содержанию в контрольных образцах, не содержащих бактерий.

2.10. Измерение эмульгирующей активности штаммов углеводородокисляющих бактерий

Эмульгирующую активность УОБ определяли визуально согласно методике [Rosenberg, 2006], а также методом Купера и Голденберга по определению индекса эмульгирования [Cooper, Goldenberg, 1987]. Для этого в мерные пробирки объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл исследуемой жидкости и перемешивали в течение 2 мин на вортексе (Vortex V-1 plus, Biosan, Latvia). Индекс эмульгирования рассчитывали через 24 ч как отношение объёма плотной эмульсии ($V_{\text{э}}$, мл), образуемой при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму раствора (V , мл), умноженное на 100%: $E_{24} = V_{\text{э}}/V \times 100\%$, где $V = 10$ мл. Контролем служила стерильная питательная среда ЭМ.

2.11. Измерение величины поверхностного натяжения культуральной жидкости

Измерение показателя поверхностного натяжения культуральной жидкости (КЖ) проводили методом Вильгельми [Щукин и др., 2004]. Измерения проводили в КЖ исследуемой культуры при 20°C на тензиометре, представляющим собой торсионные весы ВТ-500 с подвешенной алюминиевой пластиной. Поверхностное натяжение рассчитывали по формуле: $\sigma = mg/2l$, где m – масса отрыва пластины, г (среднее из трех измерений); $g = 9,8 \text{ м/с}^2$ – ускорение свободного падения; $l = 15,7$ мм – длина линии отрыва (ширина пластины). Снижение поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) рассчитывали, как разницу между значениями поверхностного натяжения стерильной среды (контроль) и пробы исследуемой культуры.

2.12. Измерение степени гидрофобности поверхности клеток

Определение гидрофобности поверхности клеток проводили по методу Розенберга в модификации Серебряковой [Серебрякова и др., 2002]. Для определения степени гидрофобности использовали клетки, осажденные и ресуспендированные в минеральной среде Таусона. Конечная концентрация суспензии клеток в пробах соответствовала 0,5-0,6 единицам оптической плотности, измеряемой на спектрофотометре Agilent Cary 300 (Agilent, CA, USA) при $\lambda=540$ нм и толщине оптического слоя $l=10$ мм. В пробирки, содержащие по 5 мл клеточной суспензии, вносили по 1 мл хлороформа. Смесь встряхивали на вортексе в течение 2 минут. После этого отбирали верхнюю водную фазу и переносили в оптическую кювету для измерений. Показатель гидрофобности (ПГ) клеток рассчитывали в процентах по формуле: $ПГ=100-((ОП_1 \times 100)/ОП_0)$, где $ОП_0$ – исходная оптическая плотность микробной суспензии, $ОП_1$ – оптическая плотность суспензии после взаимодействия клеток с хлороформом.

2.13. Определение диаметра зоны, свободной от нефти

Диаметр чистой зоны (ДЧЗ) в пленке нефти (oil-spreading technique, OST) определяли, как описано в работе Морикава и соавт. [Morikawa et al., 1993]. В чашку Петри диаметром 15 см вносили 40 мл дистиллированной воды и 15 мкл сырой нефти до образования тонкой пленки на поверхности воды. В центр слоя нефти помещали 10 мкл культуры с клетками, отобранной в начале стационарной фазы роста. В присутствии биосурфактанта формируется зона, свободная от нефти, по диаметру которой судят о наличии и активности биоПАВ. Для чистого био-ПАВ имеет место линейная корреляция между количеством поверхностно-активного вещества и диаметром зоны вытеснения нефти.

2.14. Изучение субстратного спектра углеводов выделенных штаммов бактерий

Изучение субстратного спектра штаммов проводили с помощью метода лунок [Егоров, 1976] на плотной среде ЭМ. В качестве единственного источника углерода и энергии для микроорганизмов в минеральную среду вносили следующие УВ: н-алканы (изооктан, ундекан, гексадекан), ароматические (бензол, бифенил), полиароматические (нафталин, фенантрен, антрацен), нефтепродукты (дизельное топливо, ТС-1, нефть). УВ вносили в лунку диаметром 8 мм, сделанную

стерильным пробойным сверлом в центре агаризованной минеральной среды на чашке Петри. Вокруг лунки с субстратом производили штрихом посев культур в направлении от лунки к краю чашки Петри. О способности к ассимиляции УВ судили по интенсивности роста культур по штриху спустя 7-14 суток инкубации при 24°C.

2.15. Моделирование биополимерного материала

2.15.1. Синтез биополимерных материалов

Сополимер акрилонитрила и метилметакрилата (СПАН) был выбран в качестве полимерной матрицы, а свекольный жом (ГОСТ 54901-2012 Р) в качестве растительного наполнителя, включенного в состав полимерной матрицы. Штаммы бактерий *Ochrobactrum sp.* и *Deinococcus sp.*, выделенные из микробиологически загрязненного реактивного топлива ТС-1, использовали в качестве микроорганизмов для иммобилизации на матрице. Материалы на основе СПАН были получены с помощью аэродинамического струйного формования из расплава полимера. Внедрение свеколичного жома было выполнено следующим образом: свеколичный жом измельчали, вводили в расплав полимер и перемешивали (концентрация свеколичного жома в расплаве полимера составляло 25%). Механические характеристики полученной полимерной матрицы с органическим наполнителем представлены в таблице 8 [Ivanova et al., 2019]. Работа проводилась совместно с кафедрой общей и неорганической химии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Таблица 8. Механические характеристики СПАН с наполнителем свекольный жом.

Тип	Толщина, мм	Воздухо- проницаемость, $\text{дм}^3/\text{м}^2 \cdot \text{с}$	Поверхностная плотность, $\text{г}/\text{м}^2$	Плотность, $\text{г}/\text{см}^3$	Пористость, %
СПАН	1, 58	108, 5	159	0, 1	91, 5

Образцы полимерного носителя составляли 9 см². Иммобилизацию клеток УОБ моно- и смешанной культур проводили путем активной адсорбции клеток бактерий на поверхности волокон и во внутреннем межволоконном пространстве матрицы. Для этого биокompозитные матрицы размером 3x3 см помещали в качалочные колбы со 100 мл жидкой культуры УОБ на трое суток при комнатной

температуре. В случае с иммобилизацией бинарной смешанной культуры после трех суток роста на качалке культуральную жидкость из колб с двумя разными культурами объединяем, предварительно доведя до одинаковой оптической плотности (2,0-2,5). Матрицы предварительно стерилизовали в воде в автоклаве при 1 атм и высушивали при 80°C. Эксперименты по биodeградации УВ с помощью биополимера были выполнены в колбах Эрленмейера следующим образом: в 100 мл искусственной морской воды с добавлением 1 мл модельной смеси (н-алканов ($C_{15}H_{32}$, $C_{16}H_{34}$ и $C_{18}H_{38}$) и триметилбензола) были введены биополимеры и культивирование проводили в течение 7, 14, и 21 суток при перемешивании на шейкере при температуре 24-25°C. Состав искусственной морской воды представлен в таблице 9.

Таблица 9. Состав искусственной морской воды.

Компонент среды	Концентрация, мг/л
NaCl	1750 (Cl^-)
K_2SO_4	2500 (SO_4^{2-})
KNO_2	225 (NO_2^-)
KNO_3	16.5 (NO_3^-)
KH_2PO_4	17.5 ($H_2PO_4^-$)

2.15.2. Изучение динамики изменения показателей биополимерного материала в присутствии клеток углеводородокисляющих бактерий

На 7, 14 и 21 сутки биополимерный материал анализировали по нескольким параметрам: количеству живых клеток по стандартному протоколу производителя с помощью окрашивания с ИНТ, количеству КОЕ (путем растирания в ступке с добавлением 10 мл стерильного 0, 9 % раствора NaCl и получения суспензии для разведения и посева), приросту биомассы клеток на матрице по изменению сухого веса матриц (для этого $\frac{1}{4}$ матрицы высушивали при 80° в течение 2 часов, затем на 40 минут помещали в эксикатор и далее взвешивали), а также изучали морфологию клеток и их иммобилизацию на матрице при помощи СЭМ. Для этого матрицы разделяли на 4-е равные части.

Окрашивание клеток с помощью йодонитротетразолия фиолетового

Методика окрашивания с помощью красителя ИНТ состоит в смешивании 5 мл культуральной жидкости (или помещении $\frac{1}{4}$ матрицы) с 5 мл 0,2% водного раствора красителя ИНТ (Sigma, США) [Wrenn, Venosa, 1996] и дальнейшем определении живых клеток по протоколу производителя с некоторыми модификациями. В присутствии активных живых клеток происходит восстановления ИНТ до нерастворимого в воде формазана (ИНТФ), о чем судят по появлению красно-фиолетового окрашивания. В случае с матрицами образец не центрифугировали, а удаляли жидкую фазу декантированием.

Анализ остаточного содержания УВ проводили на 7, 14 и 21 сутки эксперимента. Модельная смесь УВ в 100 мл искусственной морской воды без внесенных бактерий или биополимера была использована в качестве контроля. Концентрации УВ в полученных образцах анализировали методом ГЖХ как описано ранее.

2.16. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm m$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ*

Основные этапы исследований, направленных на достижение поставленной цели – изучение сообществ УОМ реактивного (ТС-1) и автомобильного (АИ-95) топлива для использования в составе биокompозитных материалов для биоремедиации, представлены на следующей схеме:

1. Подбор питательных сред для выделения максимально широкого спектра культивируемых УОМ из образцов нефтепродуктов
- ↓
2. Отбор колоний, получение чистых и накопительных культур культивируемых УОМ
- ↓
3. Исследование морфологических и физиолого- биохимических характеристик выделенных штаммов УОБ
- ↓
4. Идентификация выделенных бактериальных изолятов и изолятов мицелиальных грибов
- ↓
5. Выявление некультивируемых бактерий в составе мицелия грибов
- ↓
6. Исследование способности роста выделенных штаммов УОМ на средах с добавлением различных УВ и модельной смеси УВ
- ↓
7. Детекция генов окисления УВ и синтеза биоПАВов у выделенных штаммов УОБ
- ↓
8. Исследование степени деградации УВ модельной смеси этими штаммами
- ↓
9. Исследование биоэмульгирующей активности штаммов УОБ
- ↓
10. Иммобилизация ассоциации на синтетическом нетканом материале и изучение активности в отношении деструкции УВ модельной смеси по сравнению с суспензионной культурой этой ассоциации

* Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

- 1) **Шапиро Т. Н.** и др. Идентификация и физиологическая характеристика консорциума углеводород окисляющих бактерий нефти и нефтепродуктов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – №. 4. – С. 107-113.
- 2) Иванова Е. А., Лобакова Е. С., Идиатулов, Р. К., **Шапиро Т. Н.**, Санджиева Д. А., Кузнецова О. В., Дедов А. Г. Биокompозитные материалы для очистки водных сред, загрязненных углеводородами // Нефтехимия. – 2019. – Т. 59. – №. 3. – С. 297-303.
- 3) **Шапиро Т. Н.**, Лобакова Е. С., Дольникова Г. А., Иванова Е. А., Санджиева Д. А., Бурова А. А., Джабраилова Х. С., Дедов А. Г. Сообщества углеводородокисляющих бактерий нефтепродуктов на примере авиационного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, – №. 1. – С. 41-55.
- 4) **Shapiro, T.**, Chekanov, K., Alexandrova, A., Dolnikova, G., Ivanova, E., Lobakova, E. Revealing of Non-Cultivable Bacteria Associated with the Mycelium of Fungi in the Kerosene-Degrading Community Isolated from the Contaminated Jet Fuel // Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – №. 1. – P. 43-56.

Для получения наибольшего разнообразия культивируемых УОМ из загрязненных образцов топлива использовали широкий спектр сред, включающий как минеральные среды, так и среды, содержащие органические вещества помимо того количества УВ, которое привносилось непосредственно из исследуемого образца НП. Получали накопительные и чистые культуры культивируемых УОМ, что в дальнейшем подтверждалось молекулярно-генетической идентификацией.

На следующем этапе определяли общие морфологические и физиолого-биохимические характеристики штаммов УОМ и составляли коллекцию культивируемых штаммов УОМ. Затем проводили качественную и количественную оценку их функциональной активности и биотехнологического потенциала (углеводородоокисляющего, биоэмульгирующего) и определяли наличие генов, отвечающих за использование УВ. С перспективой использования выделенных УОМ в составе биокomпозитных материалов или биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных водных экосистем осуществляли иммобилизацию УОМ на полимерный нетканый волокнистый материал.

3.1. Световая микроскопия образцов топлива

В загрязненном образце реактивного топлива ТС-1 после его фильтрации на поверхности фильтра был обнаружен слизистый прозрачный осадок в виде биопленки. При микроскопировании фрагментов осадка выявлены скопления бактериальных клеток различной морфологии (кокки и бациллы) (рис. 10а). Окрашивание слизистого осадка красителем рутениевым красным, визуализировало наличие в нем внеклеточного полимерного матрикса и показало, что бактериальные клетки во фрагментах осадка объединены между собой кислыми экзополисахаридами (ЭПС) (рис. 10б), образующими сетевую структуру.

Как сообщалось ранее [Стрелкова и др., 2013], внеклеточные полисахариды, являющиеся биосурфактантами, могут быть обнаружены среди ЭПС, продуцируемых бактериями при образовании биопленки. Краситель рутениевый красный используется для выявления кислых ЭПС в бактериальных биопленках любого типа, как на инертных поверхностях, так и в биологическом материале [Karlyshev et al., 2001; Ножевникова и др., 2015]. Зрелые биопленки характеризуются специфической морфологической структурой, в которой во внутреннем объеме внеклеточного матрикса формируются каналы, а на поверхности - поры [Николаев,

Плакунов, 2007]. Через них осуществляется поступление в биопленку питательных веществ и кислорода и выведение продуктов метаболизма микробных клеток. Показано, что каналы внеклеточного полимерного матрикса удерживаются открытыми поверхностными рамнолипидами [Ильина и др., 2004]. Можно предположить, что способность некоторых бактерий, развивающихся в топливе, обусловлена способностью синтезировать связанные с клеточной поверхностью биоПАВы, являющиеся компонентами внеклеточного полимерного матрикса биопленки. На рис. 9 в, г показан внешний вид образца топлива ТС-1 и бензина АИ-95, соответственно, с механическими примесями в виде непрозрачных флоккул на границе раздела фаз.

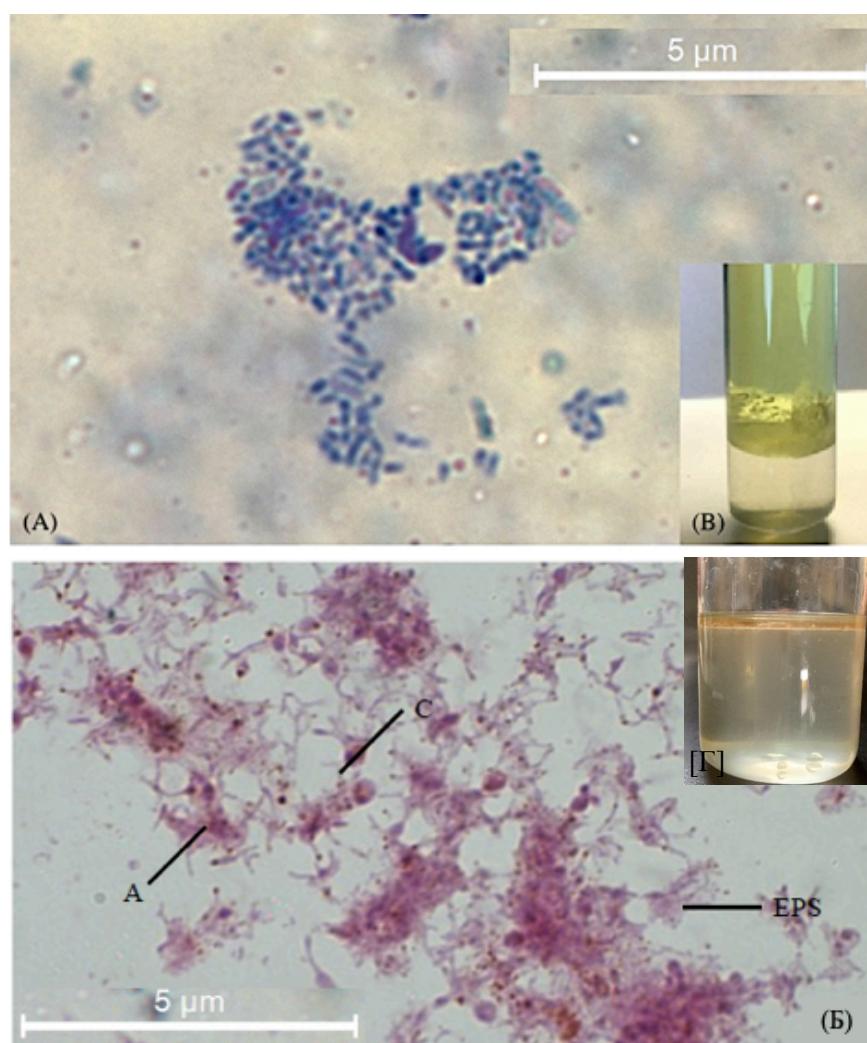


Рисунок 9. А – агрегаты клеток, окрашенные метиленовым синим (рН 7.0); Б – окрашивание образцов осадка топлива ТС-1 рутениевым красным (рН 7.0). Стрелки указывают на агрегаты клеток (А), которые формируют биопленку, каналы (С) и экзополисахариды (EPS), продуцируемые клетками; В – бактериальная биопленка на границе раздела фаз, сформировавшаяся в топливе ТС-1; Г – внешний вид образца бензина АИ-95 с механическими примесями в виде непрозрачных флоккул на границе раздела фаз.

3.2. Выделение и идентификация микроорганизмов из образцов нефтепродуктов

Из исследованных образцов НП были получены бактериальные и изоляты микромицетов. Изоляты и среды, на которых они были получены, представлены в таблице 10.

Таблица 10. Суммарное количество изолятов, выделенных из исследованных образцов.

Образец	Выделенные микроорганизмы (среда)	
	бактерии	грибы
ТС-1	7 белых + 2 окрашенных колоний (УС), прозрачные колонии (СГ)	окрашенные колонии (СЭ), 2 колонии (ЭМ), 3 колонии (УС), многочисленные колонии (УС10], 2 колонии (СГ), 3 колонии (Чапек), многочисленные колонии (СА)
ТС-1*	-	-
АИ-95	2 типа колоний (ЭМ)	-

Из образца реактивного топлива ТС-1 на минеральной среде Эванса (ЭМ) и среде с низким содержанием органических веществ (УС10) выделено 10 типов окрашенных бактериальных колоний.

Микроскопический контроль клеток из выросших колоний показал, что 8 из них имеют морфотип палочек, а один представлен кокками, собранными в группы по 2-4 клетки. Четыре выделенных изолята бактерий относились к грамположительному морфотипу, а 6 – к граммотрицательному. Клетки 5 культур были подвижными. Число КОЕ после посева на чашки Петри образца топлива ТС-1 объемом 0,025 мкл составило $0,2 \cdot 10^{10}$.

Из образца бензина марки АИ-95 на тех же средах выделены два типа колоний грамположительных бактерий, имеющих морфотип палочек. Один тип колоний по морфологическим признакам был отнесен к группе коринеподобных бактерий, родственных актиномицетам. Колонии окрашенные, блестящие, с ровными краями. Второй тип колоний также окрашенных, блестящих с ровным краем – к подвижным палочкам, характерным для рода *Bacillus*. Число КОЕ после посева на чашки Петри образца бензина АИ-95 объемом 0,025 мкл составило $6,4 \cdot 10^6$.

Для всех выделенных штаммов бактерий была проведена молекулярно-генетическая идентификация на основании рибосомальной филогении. Были определены представители 7 родов бактерий: *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Deinococcus*, *Bacillus* и *Paenibacillus*. Нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента депонированы в международную базу данных Genbank (рис. 10), им присвоены следующие номера: *Ochrobactrum* sp. Bi1 – [GenBank ID MG808381.1], *Sphingobacterium multivorum* Bi2 [GenBank ID MG812313.1], *Alcaligenes faecalis* Bi3 [GenBank ID MG812316.1], *Rhodococcus* sp. Bi4 [GenBank ID MK951703], *Sphingobacterium* sp. Bi5 [GenBank ID MK968142], *Rhodococcus erythropolis* Bi6 [GenBank ID MG871403.1], *Deinococcus* sp. Bi7 [GenBank ID MG812379.1], *Sphingobacterium* sp. Bi8 [GenBank ID MK968144], *Sphingobacterium mizutaii* Bi9 [GenBank ID MK968143], *Rhodococcus* sp. Bi10 [GenBank ID MG871414.1], *Paenobacillus agaridevorans* Bi11 [GenBank ID MK951751], *Bacillus pumilus* Bi12 [GenBank ID MK951709], *Bacillus safensis* Bi13 [GenBank ID MK951740] и *Bacillus* sp. Bi14 [GenBank ID MK951752].

В результате идентификации по гену *16S pPHK* чистых культур бактерий, выделенных из образца бензина, оказалось, что два типа колоний, определённые нами на основе морфологических признаков, относятся к двум разным родам бактерий *Bacillus* и *Paenibacillus*, и принадлежат к 4 различным видам бактерий: *Bacillus* sp., *Bacillus pumilis*, *Bacillus safensis* и *Paenibacillus agaridevorans*. Колонии штаммов, отнесенных по результатам генетической идентификации к роду *Bacillus*, с помощью метода световой микроскопии нами бы установлены как одинаковые и также отнесены к бактериям, принадлежащим к роду *Bacillus*, а колонии штамма *Paenibacillus agaridevorans* как колонии второго типа, напоминающие коринеформные бактерии.

В случае с колониями, выделенными из реактивного топлива ТС-1, на основе морфологических признаков количество типов колоний совпадало с количеством, полученным по результатам генетической идентификации.

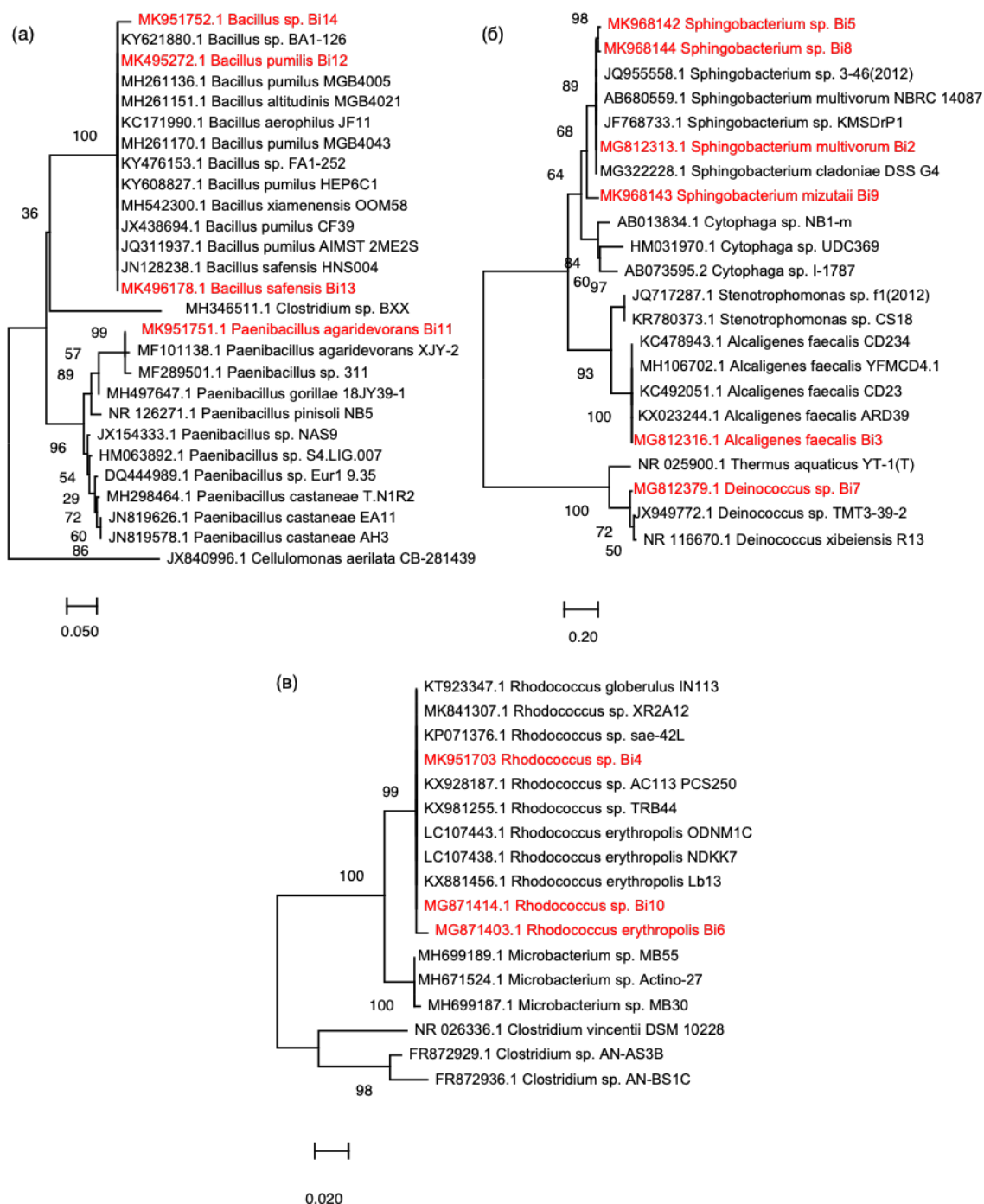


Рисунок 10. Филогенетическое родство штаммов бактерий, выделенных из бензина (а) и из образца топлива ТС-1 (б, в). Оценка точности топологии дерева показана рядом с ветвями в виде процента начальной загрузки (1000 повторов). Масштабная шкала: число замен азотистых оснований на один сайт во множественном выравнивании.

Многочисленными исследованиями показано, что более 80% бактерий, выделенных из различных видов НП, относятся к грамотрицательным бактериям и представлены Gamma-, Beta- и Alphaproteobacteria, в то время как остальные 20% представляют собой грамположительные штаммы, принадлежащие к

актинобактериям и бациллам [Smibert R. M., Krieg, 1981; Salam L. B. et al., 2018]. Согласно полученным результатам, бактериальная составляющая топлива ТС-1 представлена сообществом в основном грамотрицательных бактерий, тогда как образец сливного бензин АИ-95 – сообществом грамположительных бактерий. Филогенетические деревья, составленные на основе последовательностей гена *16S rPHK* для 9 штаммов, выделенных из топлива ТС-1, характеризовались широким спектром бактериальных таксономических групп: 2 грамотрицательных рода распределены по группам Betaproteobacteria (*Alcaligenes*) и Bacteroidetes (*Sphingobacterium*). 4 штамма грамположительных бактерий относятся к родам *Rhodococcus* и *Deinococcus*. Большинство выделенных штаммов УОБ из образцов топлива являются типичными обитателями нефти и НП [Margesin et al., 2003; Lobakova et al., 2016], только штамм рода *Deinococcus* ранее не был описан как бактериальный компонент НП. Однако, имеются данные о его способности к использованию УВ и выделению из загрязненных НП образцов почвы или нефтешлама [Делеган и Филонов, 2016]. Бактерия *R. erythropolis* (Nocardiaceae, Actinobacteria) часто является основным компонентом нефтиразлагающих микробных сообществ, поскольку может эффективно использовать н-алканы и производить в присутствии УВ биосурфактанты [Michaud L. et al. 2004; Kuyukina et al., 2013; Серебренникова и др., 2017]. Деградация нефти была описана для *A. faecalis* [La Rosa G. et al., Lobakova et al., 2016]. В ранее проведенных исследованиях [Atlas, 1981; Rahman et al., 2002] описаны бактерии рода *Bacillus* и *Paenibacillus*, проявляющие углеводородокисляющую активность [Делеган, Филонов, 2016].

Бактерии рода *Deinococcus* хорошо известны устойчивостью к различным стрессовым факторам и способностью эффективно восстанавливать повреждения ДНК. Большинство представителей рода *Deinococcus* способны расти в условиях высокой радиационной активности и обезвоживания, поскольку могут защищать ферментные системы от активных форм кислорода, образующихся при ионизирующем излучении. Механизмы, лежащие в основе устойчивости данных бактерий к радиации, и геномные особенности устойчивости могут быть полезны при использовании *Deinococcus* в биотехнологии, например, детоксикация ксенобиотиков, загрязненных различными типами отходов, включая нефть и НП [Kim M. K. et al., 2015].

3.3. Изучение физиологических свойств выделенных штаммов бактерий

Определение физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов бактерий (таблицы 11, 12) показало, что они все являются каталазоположительными, что подтверждает способность данных бактерий использовать УВ [Гоголева, 2012]. Оксидазной активностью обладали две культуры (*R. erythropolis* Bi6 и *Sphingobacterium* sp. Bi8), одна слабооксидазной активностью (*A. faecalis* Bi3), остальные – оксидаз отрицательные. Все штаммы (кроме *A. faecalis* Bi3 и *Deinococcus* sp. Bi7) – факультативные анаэробы, которые способны использовать в качестве субстрата не только углеводы, но и органические кислоты (цитрат натрия). Все штаммы, использующие для роста органические и неорганические формы азота, проявляли способность к нитратредукции (кроме *S. multivorum* Bi2). Штаммы *S. mizutaii* Bi9, *R. erythropolis* Bi6 могли декарбоксилировать орнитин.

Таблица 11. Физиолого-биохимические свойства штаммов, выделенных из ТС-1.

Тест	<i>S. multivorum</i> Bi2	<i>A. faecalis</i> Bi3	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi4	<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi5	<i>R. erythropolis</i> Bi6	<i>Deinococcus</i> sp. Bi7	<i>Sphingobacterium</i> sp. Bi8	<i>S. mizutaii</i> Bi9	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi10
Грам-принадлежность	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки	кокки	кокки в группах по 2-4	палочки	палочки	палочки
Подвижность	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Оксидазная активность	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Использование:									
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Уреаза	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Фенилаланин	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Лизин	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Аргинин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Орнитин	-	-	-	++	+	-	-	-	-
Цитрат	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 11

H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нитрат редукция	-	+	++	++	+	+	+	+	++
Индол	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 12. Физиолого-биохимические свойства штаммов, выделенных из бензина АИ-95.

Тест	<i>P. agaridevorans</i> Bi11	<i>B. pumilus</i> Bi12	<i>B. safensis</i> Bi13	<i>Bacillus</i> sp. Bi14
Грам-принадлежность	+	+	+	+
Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки
Подвижность	-	-	-	-
Каталазная активность	+	+	+	+
Оксидазная активность	-	-	+	±
Использование органических веществ:				
МПА	+	+	+	+
Крахмал	±	-	-	±
Мальтоза	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+
Уреаза	+	+	+	+
Цитрат	+	+	+	+
Нитрат редукция	++	-	++	++

Проведенные морфологические, физиологические и биохимические исследования выделенных штаммов УОБ подтвердили данные их молекулярно-генетической идентификации.

3.4. Способность выделенных микроорганизмов к использованию углеводов

3.4.1. Оценка роста чистых культур углеводородокисляющих бактерий на плотной среде с добавлением модельной смеси углеводов

Результаты измерения оптической плотности суспензии выделенных штаммов на среде ЭМ с УВ представлены на рисунке 11. Установлено, что все выделенные штаммы УОБ способны к росту на среде с добавлением модельной смеси УВ №1. По скорости роста выделенные штаммы можно разделить на три группы. Данное деление предложено нами и основано на следующем: 1 группа

(активные культуры) – значение оптической плотности суспензии клеток после культивирования в течение 7 суток от 3 единиц и выше; 2 группа (средняя активность) – от 2 до 3; 3-я группа (низкая активность) – значение менее 2 единиц оптической плотности. Установлено, что в наиболее активную группу штаммов способных к использованию модельной смеси УВ входят штаммы *R. erythropolis* Bi6, *Rhodococcus* sp. Bi10. Средняя скорость роста характерна для штаммов *Deinococcus* sp. Bi7, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8. Медленнее всего в присутствии УВ растут штаммы *Rhodococcus* sp. Bi4, *S. mizutaii* Bi9, *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *A. faecalis* Bi3 и все штаммы, выделенные из бензина.

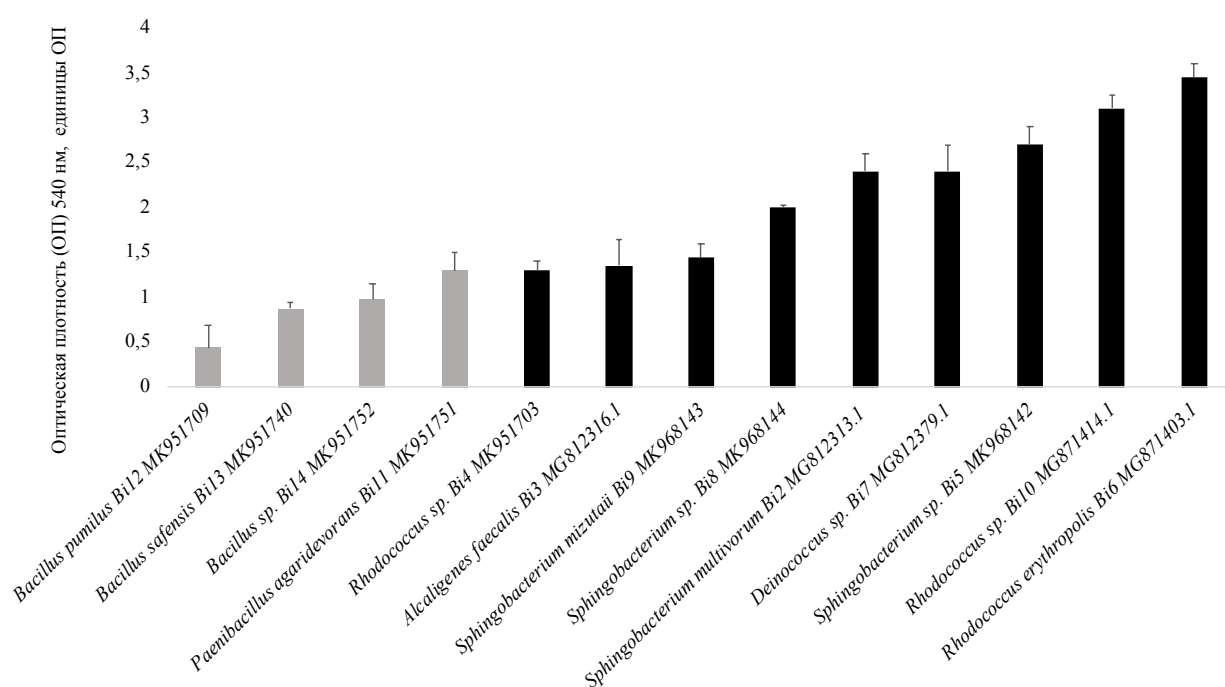


Рисунок 11. Рост выделенных штаммов бактерий из автомобильного бензина АИ-95 (серые столбцы) и реактивного топлива ТС-1 (черные столбцы) на твердой среде со смесью УВ №1 в течение 7 суток.

3.4.2. Оценка способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к использованию углеводов модельной смеси

Для оценки риска для здоровья человека и окружающей среды УВ нефти подразделяют на фракции, в зависимости от количества углеродных атомов [ССМЕ, 2008, 2010]. Первая фракция УВ с количеством атомов углерода от 6 до 10, представляет собой летучую смесь и является одной из наиболее токсичных для животных. Вторая фракция включает полуметучие УВ с числом атомов углерода от 11 до 16. Третья – нелетучая фракция включает УВ с числом атомов углерода от 17

до 34. Четвертая фракция содержит тяжелые УВ с числом атомов углерода больше 35 и рассматривается как фракция с наименьшей летучестью и растворимостью.

Мы использовали модельные смеси УВ, которые содержали УВ разных фракций, входящие в состав топлива ТС-1 и бензина АИ-95. Известно, что УВ различаются по устойчивости к микробному воздействию и обычно ранжируются в следующем порядке убывающей восприимчивости: н-алканы > разветвленные алканы > низкомолекулярные ароматические УВ > циклические алканы [Leahy, Colwell, 1990].

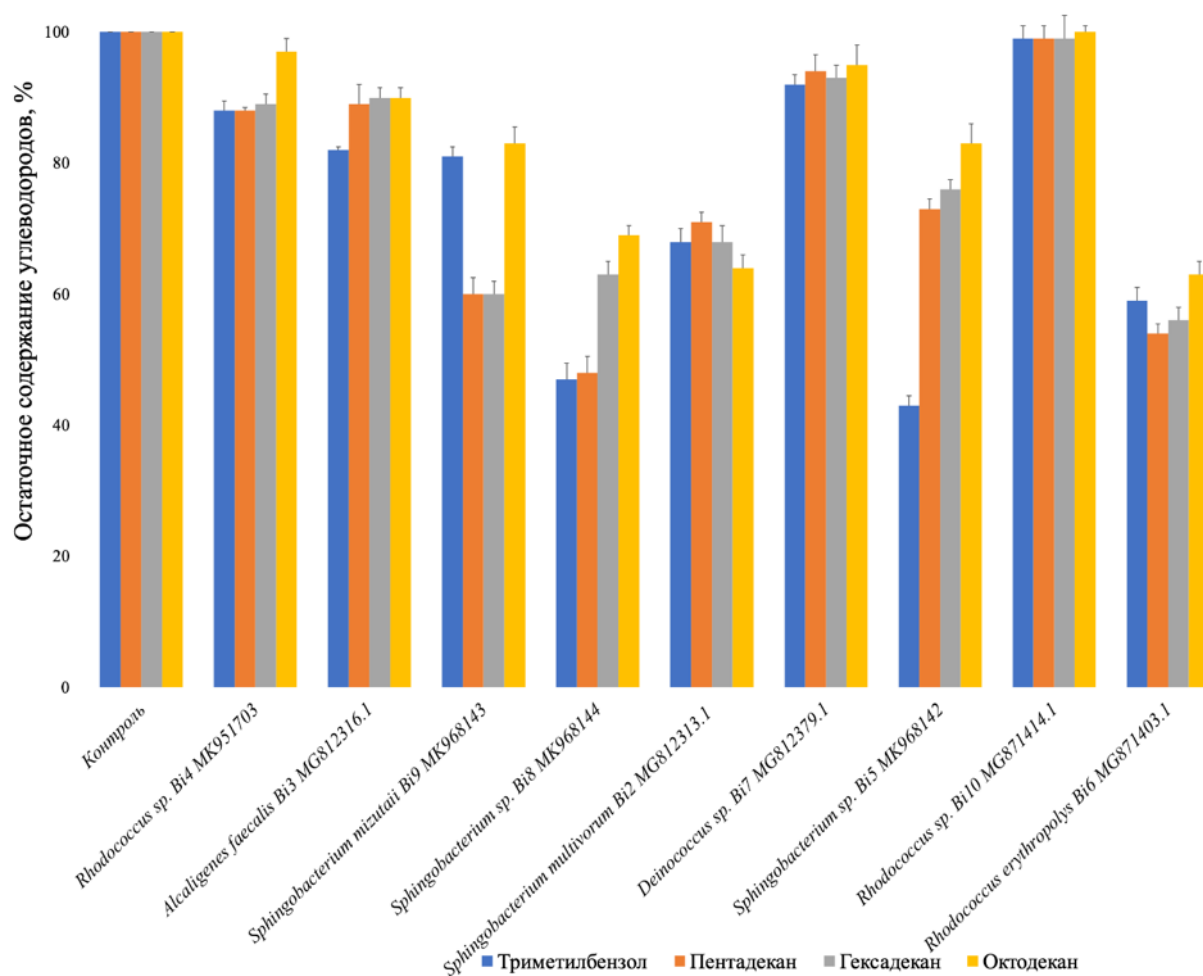


Рисунок 12. Остаточное содержание компонентов модельной смеси №1 углеводородов после культивирования в течение 7 суток штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из реактивного топлива ТС-1.

Биодеградирующая активность штаммов бактерий, выделенных из реактивного топлива, в отношении модельной смеси УВ №1, состоящей из алканов ($C_{15}H_{32}$, $C_{16}H_{34}$, $C_{18}H_{38}$) и 1, 2, 4 – триметилбензола, существенно различалась. На 7-е сутки роста штамм *R. erythropolis* B16 был наиболее активен в отношении

деградации всех исследуемых УВ, особенно $C_{15}H_{32}$. Более того, этот штамм показал максимальный прирост клеток и на модельной смеси УВ (рис. 12). Штаммы *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8 можно отнести к универсальным штаммам УОБ, которые в процессе роста активно используют все компоненты модельной смеси УВ. Однако штамм *Sphingobacterium* sp. Bi8 наиболее эффективно деградировал $C_{15}H_{32}$ и $C_{16}H_{34}$ н-алканы, в то время как штамм *S. multivorum* Bi2 – $C_{18}H_{38}$. Штамм *Sphingobacterium* sp. Bi5 использовал 1,2,4-триметилбензол быстрее, чем штаммы *R. erythropolis* Bi6 и *S. multivorum* Bi2. Однако другие компоненты смеси УВ он использовал с меньшей эффективностью, тогда как штамм *S. mizutaii* Bi9 использовал алканы $C_{15}H_{32}$ и $C_{16}H_{34}$ с той же эффективностью (рис. 13). Для штаммов *A. faecalis* Bi3, *Deinococcus* sp. Bi7, *Rhodococcus* sp. Bi10, *Rhodococcus* sp. Bi4 разница в деградации компонентов модельной смеси УВ (рис. 13) была статистически незначимой. Они характеризовались низким уровнем деградации (рис. 13) как индивидуальных УВ, так и модельной смеси. При этом, рост штаммов *A. faecalis* Bi3 и *Rhodococcus* sp. Bi4 в присутствии как отдельных УВ, так и модельной смеси практически отсутствовал.

Так как штаммы УОБ, выделенные из автомобильного бензина АИ-95, оказались более активными по использованию УВ модельной смеси №1, для них была создана модельная смесь УВ №2, состоящая из 9 компонентов, включая непредельные УВ. В качестве смеси УВ №2 использовали смесь следующего состава: $C_{12}H_{26}$ н-додекан, н-пентадекан $C_{15}H_{32}$, н-октадекан $C_{18}H_{38}$, изодекан $C_{12}H_{26}$, децилциклогексан $C_{16}H_{32}$, 1-додецен $C_{12}H_{24}$, 1-тетрадецен $C_{14}H_{28}$, 1,2,4-триметилбензол $(CH_3)_3C_6H_3$, н-нонилбензол $C_{15}H_{24}$. Использование компонентов смеси УВ № 2 штаммами представлено на рисунке 13.

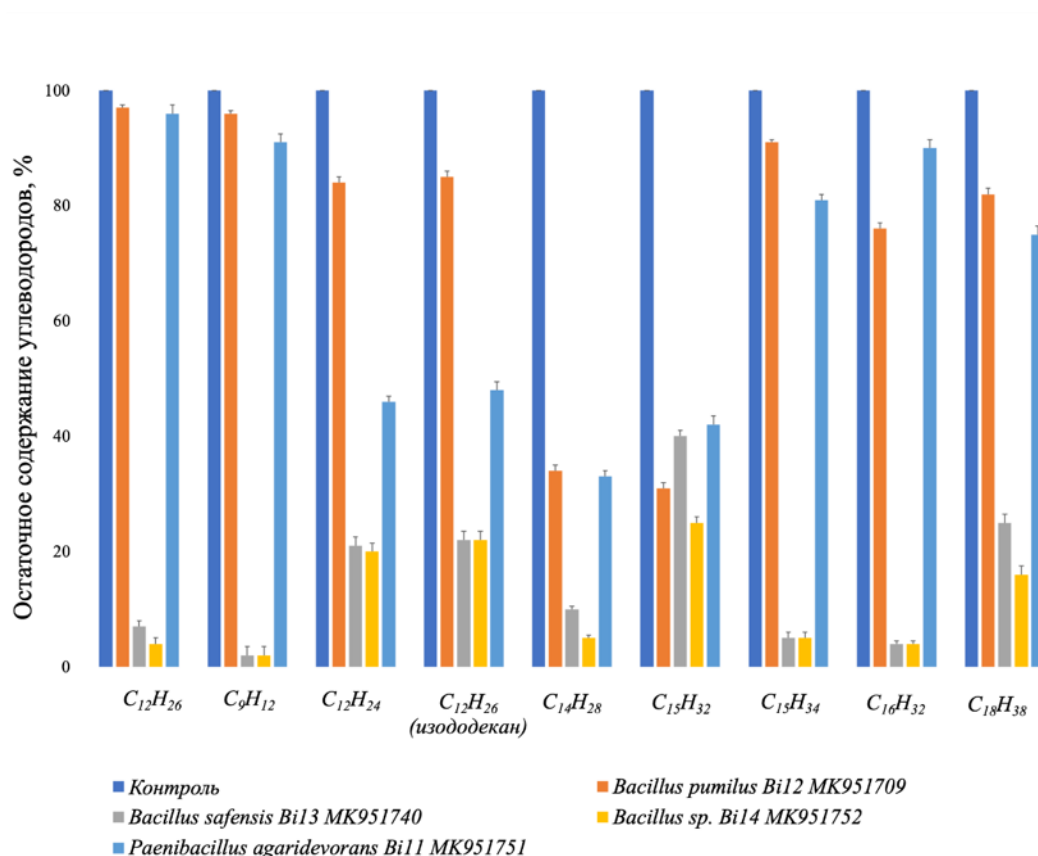


Рисунок 13. Остаточное содержание компонентов модельной смеси №2 углеводородов после культивирования в течение 7 суток штаммов углеводородоокисляющих бактерий, выделенными из бензина.

Среди штаммов УОБ, выделенных из образца бензина АИ-95, наиболее эффективным рост на модельной смеси УВ № 2 был у штамма *P. agaridevorans* Bi11, а наименьший у штамма *B. pumilus* Bi12. Однако, наиболее полно как модельную смесь, так и индивидуальные УВ использовали штаммы *B. safensis* Bi13 и *Bacillus* sp. Bi14 (рис. 13).

Таким образом, биodeградация компонентов модельных смесей УВ различна для всех 13 штаммов УОБ, выделенных как из топлива ТС-1, так и бензина АИ-95. Ароматические УВ модельных смесей наиболее эффективно использовали штаммы рр. *Sphingobacterium*, *Rhodococcus* и *Bacillus*, что согласуется с данными других исследователей [Leahy и Colwell, 1990; Salleh et al., 2003; Janbandhu, Fulekar, 2011].

3.5. Детекция генов окисления н-алканов у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий

На данный момент известно, что подавляющее большинство бактериальных превращений УВ представляют собой окислительные реакции, протекающие наиболее активно в аэробных условиях. *AlkB* и *Cyp153* являются важными алканмонооксигеназами, ответственными за аэробную деградацию алканов нефти и НП. Детекция ключевых генов, ответственных за окисление определенных компонентов нефти, является прямым доказательством использования штаммом УОБ УВ, а также метаболической активности микроорганизма [Herrick et al., 1993; Kohno et al., 2002; Sei et al., 2003; Teske et al., 2011]. У УОБ известно большое количество генов семейства *AlkB* и *Cyp153*.

Все полученные нами штаммы УОБ изучены на наличие генов, кодирующих различные алканмонооксигеназы. Штаммы детектированы на наличие следующих генов деградации н-алканов - *AlkB*, *Cyp153*, *Alk1*, *Alk2* и *Alk3* [Kohno et al., 2002; Иванова и др., 2014]. Ген *Alk1* кодирует алканмонооксигеназу *AlkB*, катализирующую реакции терминального окисления н-алканов с длиной цепи C₆-C₁₂ с помощью монооксигеназы, описанной у представителей рода *Pseudomonas*; ген *Alk2* кодирует алканмонооксигеназы, катализирующую реакции терминального окисления н-алканов с длиной цепи >C₁₂ с помощью монооксигеназ или диоксигеназ, обнаруженных у представителей рода *Acinetobacter*; ген *Alk3* кодирует алканмонооксигеназу *AlkB*, обладающую субстратной специфичностью по отношению к н-алканам и оксидазным системам [Kohno et al., 2002].

Установлено, что ген *Alk2*, характерный преимущественно для бактерий р. *Acinetobacter*, отсутствует у всех исследованных штаммов УОБ (рис. 17) (раздел 1.6.). Бактерии, выделенные из реактивного топлива ТС-1, кроме штамма *Deinococcus* sp. Bi7, содержат как минимум один из исследованных генов деградации н-алканов (рис. 14-18). У штаммов *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4 и *R. erythropolis* Bi6 обнаружено 4 гена деградации н-алканов - *AlkB*, *Cyp153*, *Alk1* и *Alk3*. Штаммы бактерий, выделенные из бензина АИ-95, не содержат исследуемые гены за некоторым исключением. Штамм *P. agaridevorans* Bi11 имеет ген *Cyp153*. Полученные результаты согласуются с данными по способности выделенных

штаммов к росту на жидких и твердых средах в присутствии 1% н-алканов с разной длиной углеродной цепи (рис. 12).

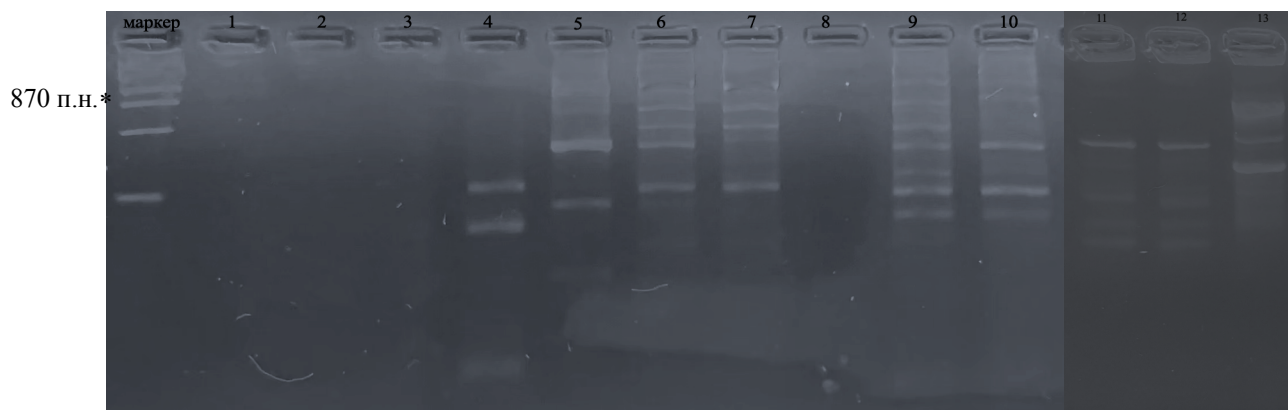


Рисунок 14. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *Cyp153*. Примечание: 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 - *Deinococcus* sp. Bi7; 7 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 - *Sphingobacterium mizutaii*; 9 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 - *Bacillus pumilus* Bi12; 11 - *Bacillus safensis* Bi13; 12 - *Bacillus* sp. Bi14; 13 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (100+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

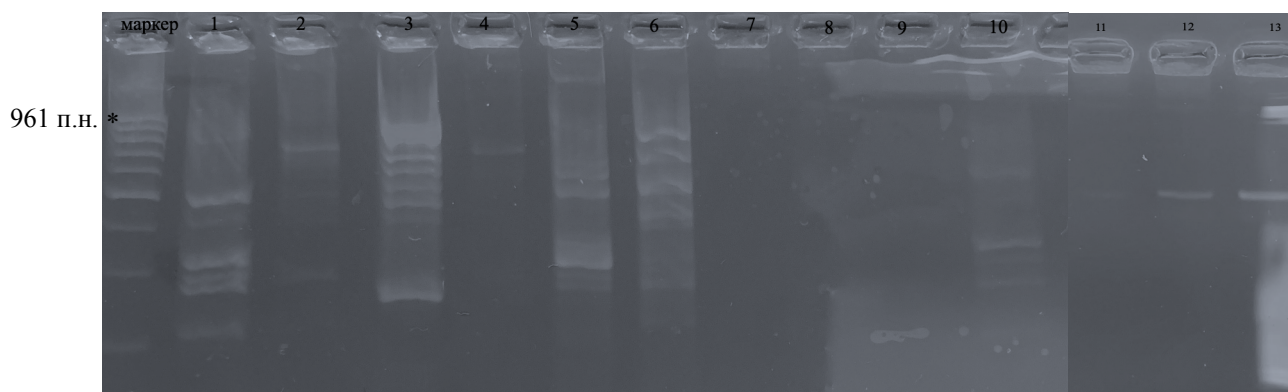


Рисунок 15. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *AlkB*. Примечание: 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 - *Deinococcus* sp. Bi7; 7 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 - *Sphingobacterium mizutaii*; 9 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 - *Bacillus pumilus* Bi12; 11 - *Bacillus safensis* Bi13; 12 - *Bacillus* sp. Bi14; 13 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (100+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

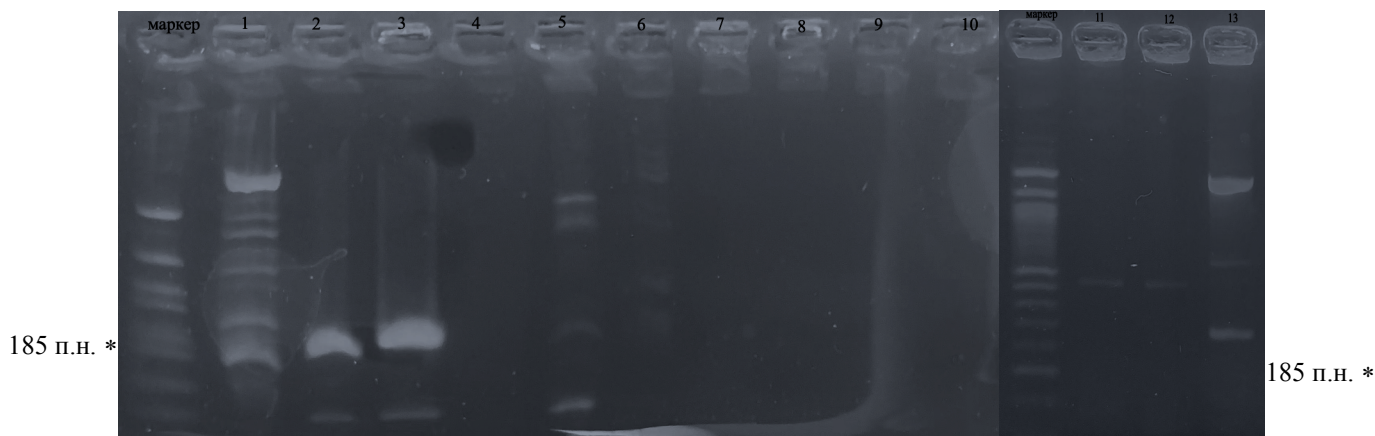


Рисунок 16. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *Alk1*. Примечание: 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 - *Deinococcus* sp. Bi7; 7 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 - *Sphingobacterium mizutaii*; 9 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 - *Bacillus pumilus* Bi12; 11 - *Bacillus safensis* Bi13; 12 - *Bacillus* sp. Bi14; 13 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.



Рисунок 17. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *Alk2*. Примечание: 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 - *Deinococcus* sp. Bi7; 7 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 - *Sphingobacterium mizutaii*; 9 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 - *Bacillus pumilus* Bi12; 11 - *Bacillus safensis* Bi13; 12 - *Bacillus* sp. Bi14; 13 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

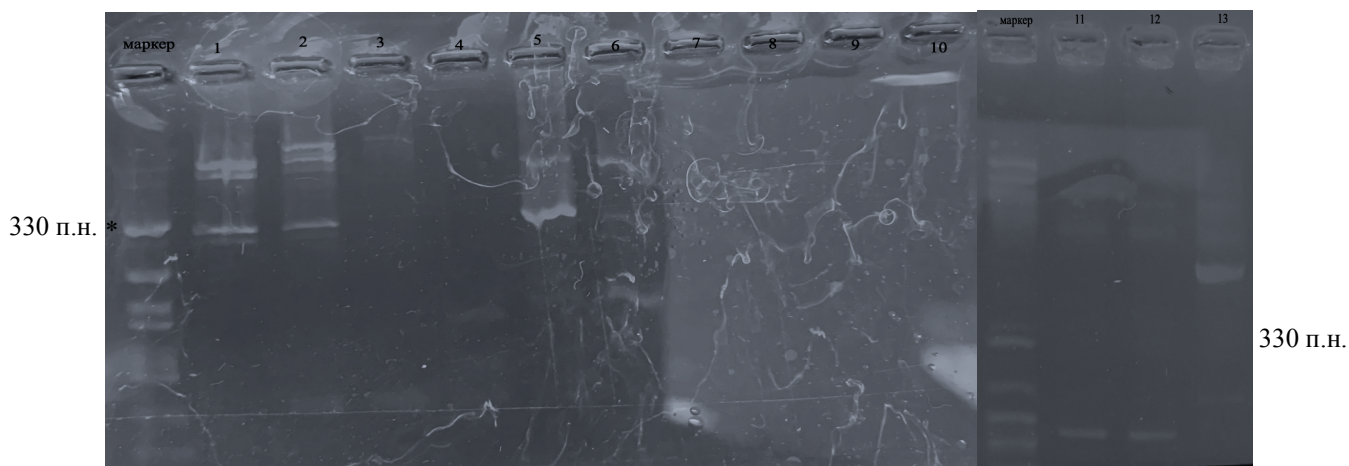


Рисунок 18. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *Alk3*. Примечание: 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; 6 - *Deinococcus* sp. Bi7; 7 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 8 - *Sphingobacterium mizutaii*; 9 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 10 - *Bacillus pumilus* Bi12; 11 - *Bacillus safensis* Bi13; 12 - *Bacillus* sp. Bi14; 13 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (100+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

3.6. Оценка изменения параметров среды культивирования выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий

Углеводородокисляющая активность микроорганизмов часто сопряжена со способностью к синтезу биоПАВов, которые повышают доступность УВ для клеток микроорганизмов [Коронелли, Нестерова, 1990; Назина и др., 2003]. При этом можно выделить два типа биоПАВов: биоэмульгаторы – соединения, которые способствуют снижению поверхностного натяжения на границе двух несмешивающихся жидкостей или твердого тела и жидкости; биосурфактанты – соединения, которые способствуют уменьшению поверхностного натяжения на границе раздела фаз (воздух-вода) [Batista et al., 2006]. Однако, способность образовывать эмульсии не всегда связана со снижением поверхностного натяжения так как биосурфактанты, как правило, обладают эмульгирующей активностью, а биоэмульгаторы не всегда способствуют снижению поверхностного натяжения [Karanth et al., 1999]. Поэтому оценку способности выделенных штаммов к синтезу биоПАВов проводили тремя методами: по определению индекса эмульгирования (ИЭ), изменению показателя поверхностного натяжения культуральной среды и измерению показателя гидрофобности клеток.

3.6.1. Индекс эмульгирования штаммов углеводородокисляющих бактерий

Эмульсии, полученные после осаждения и ресуспендирования в среде ЭМ, биомассы клеток УОБ и гексадекана, отличались устойчивостью, их высота не уменьшалась спустя сутки после проведения эксперимента. Штамм *Deinococcus* sp. Bi7 имел самый высокий ИЭ. Штаммы УОБ рода *Sphingobacterium* и *A. faecalis* Bi3 имели показатели ИЭ более 50%: ($56.5 \pm 4.9\%$, $50.8 \pm 5.7\%$ и $51,5 \pm 2,1\%$ для *S. multivorum* Bi2, *Sphingobacterium* sp. Bi5 и *A. faecalis* Bi3, соответственно). Среди штаммов бактерий рода *Rhodococcus* только штамм *Rhodococcus* sp. Bi4 имел ИЭ более 50% ($53,3 \pm 3,2\%$). Все штаммы, выделенные из бензина АИ-95, имели высокий показатели ИЭ (около 50%). Штамм *R. erythropolis* Bi6 показал самую низкую эмульгирующую активность, равную $15,9\% \pm 5,7$. Индексы эмульгирования для выделенных штаммов представлены на рисунке 19.

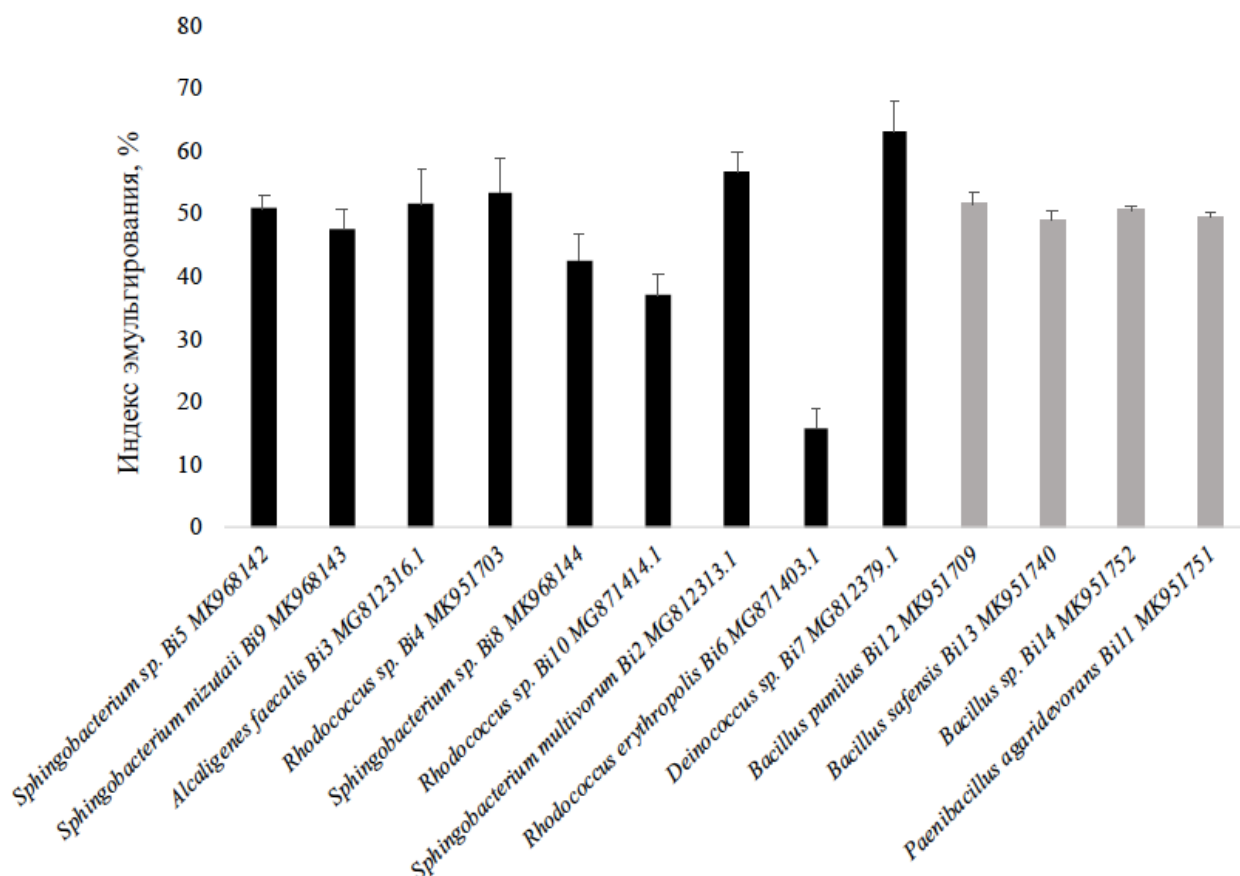


Рисунок 19. Индексы эмульгирования штаммов углеводородокисляющих бактерий.

Так как измерение ИЭ проводили в эмульсии с клетками, можно предполагать, что у данных культур, около 50% ПАВ являются экзоПАВами и выделяются в среду культивирования.

3.6.2. Определение показателя гидрофобности поверхности клеток штаммов углеводородокисляющих бактерий

Гидрофобность клеток УОБ обусловлена липофильностью их клеточной стенки или компонентов наружной клеточной мембраны, некоторые из которых поверхностно-активны. Регистрация показателя гидрофобности (рис. 20) может служить дополнительным критерием отбора бактерий, синтезирующих связанные с клетками биоПАВы [Волченко, 2006]. Поэтому для исследования были взяты отмытые от среды и ресуспендированные в среде ЭМ клетки УОБ. Использованный метод основан на оценке степени адгезии клеток к поверхности раздела фаз (жидких УВ и воды) после перемешивания и расслоения двухфазной системы «УВ и вода». Таким образом, клетки сами по себе могут демонстрировать значительную эмульгирующую активность и выступать в роли биосурфактантных агентов [Francu et al., 1991].

Установлено, что показатель гидрофобности клеточной поверхности полученных штаммов УОБ находится в диапазоне от 28% до 81%. Этот показатель был максимальным для штаммов *Sphingobacterium* sp. Bi5, выделенного из топлива ТС-1, и *B. pumilus* Bi12, выделенного из бензина АИ-95, и составил около 80%. Для этих штаммов был отмечен практически полный переход клеток в гидрофобную фазу.

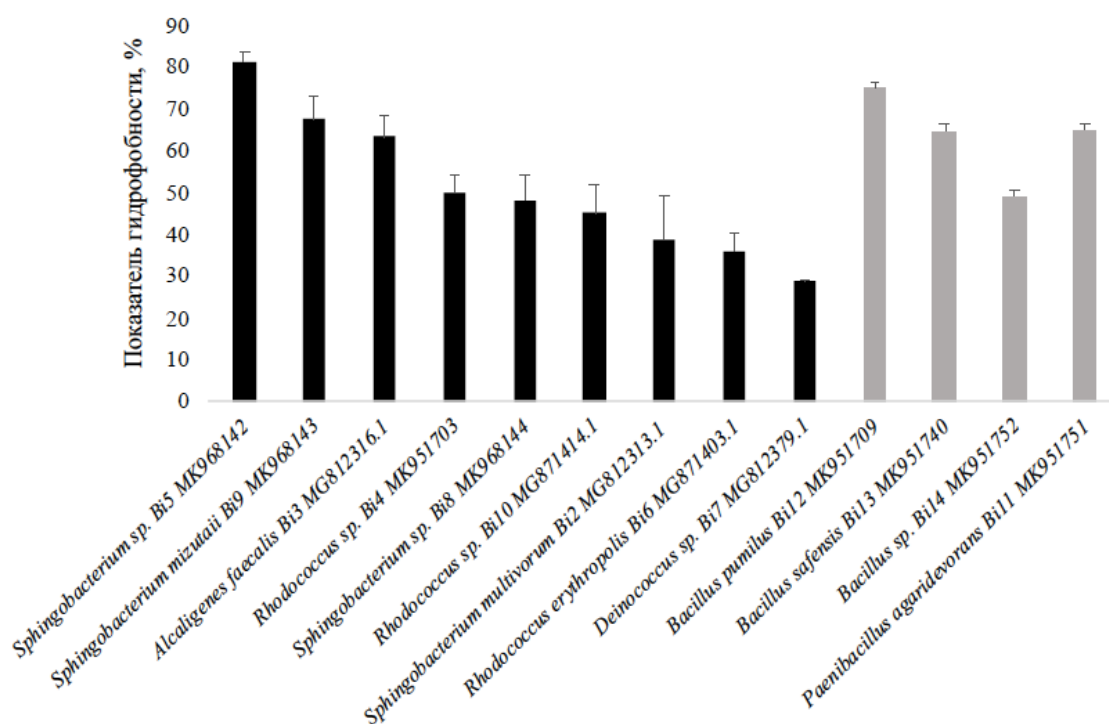


Рисунок 20. Показатель гидрофобности поверхности клеток, выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий.

3.6.3. Определение показателя изменения поверхностного натяжения культуральной жидкости с клетками углеводородокисляющих бактерий и бесклеточного супернатанта

Поверхностное натяжение (ПН) измеряли в культуральной жидкости с клетками УОБ, а также в бесклеточном супернатанте с целью определения типа синтезируемого биоПАВа. Изменение показателя ПН среды в присутствии клеток УОБ зависит от используемого штамма (табл. 13). Штамм *S. multivorum* Bi2 максимально эффективно снижал показатель ПН питательной среды более чем на 21 мН/м. Штаммы *Sphingobacterium* sp. Bi8 и *A. faecalis* Bi3 также значительно уменьшали данный показатель. Другие штаммы УОБ, выделенные из топлива ТС-1 - *Rhodococcus* sp. Bi4, *Rhodococcus* sp. Bi10, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Deinococcus* sp. Bi7 уменьшали поверхностное натяжение среды в среднем на 5-15 мН/м. Штаммы *R. erythropolis* Bi6 и *S. mizutaii* Bi9 увеличивали показатель поверхностного натяжения культуральной среды. В присутствии штаммов УОБ, выделенных из бензина АИ-95, снижение показателя ПН среды в среднем достигало 40 мН/м.

Таблица 13. Поверхностное натяжение культуральной жидкости с клетками.

Культур а	<i>Sphingobacte rium</i> sp. Bi5	<i>S. multivorum</i> Bi2	<i>Rhodococcu s</i> sp. Bi4	<i>R. erythropolis</i> Bi6	<i>Rhodococcu s</i> sp. Bi10
ПН ¹ , мН/м	65,10±6,2	49,00±5,1	55,76±5,2	72,55±0,3	55,65±7,1
Культур а	<i>Deinococcus</i> sp. Bi7	<i>Alcaligenes faecalis</i> Bi3	<i>Sphingobact erium</i> sp. Bi8	<i>Sphingobacte rium mizutaii</i> Bi9	-
ПН ¹ , мН/м	62,20±8,8	51,30±2,5	49,20±2,9	74,90±2,9	
Культур а	<i>Paenibacillus agaridevoran s</i> Bi11	<i>Bacillus pumilis</i> Bi12	<i>B. safensis</i> Bi13	<i>Bacillus</i> sp. Bi14	
ПН ¹ , мН/м	53,10±6,5	46,00±7,9	43,90±6,9	50,85±5,9	

П р и м е ч а н и е. ¹Поверхностное натяжение (ПН) среды без клеток УОБ - 70 мН/м.

Использованный метод позволяет определять наличие низкомолекулярных ПАВов и можно предположить, что штаммы *R. erythropolis* Bi6 и *Alcaligenes faecalis* Bi3 могут обладать способностью синтезировать высокомолекулярные ПАВы, вследствие чего их показатели снижения ПН превышают контрольное значение среды без клеток.

Помимо измерения ПН бесклеточного супернатанта регистрировали его снижение и в культуральной жидкости с клетками для определения типа биоПАВов. При сравнении показателя снижения ПН среды бесклеточного супернатанта для большинства штаммов было установлено, что культуральная жидкость с клетками снижает ПН среды больше, чем бесклеточный супернатант, за исключением штаммов *B. safensis* Bi13 и *Rhodococcus sp.* Bi10 (рис. 21). Показатель ПН бесклеточного супернатанта штаммов *A. faecalis* Bi3 и *S. mizutaii* Bi9 был практически равен показателю ПН культуральной жидкости с клетками, что свидетельствует о том, что поверхностно-активные свойства этих штаммов обеспечиваются внеклеточными биосурфактантами.

То есть, максимальный ИЭ, отражающий продукцию бактериями внеклеточных биосурфактантов обнаружен у штамма *Deinococcus sp.* Bi7, а показатель гидрофобности, свидетельствующий о наличии у бактерий биосурфактантов, связанных с клеточной стенкой, у штамма *Sphingobacterium sp.* Bi5.

Оценка изменения показателя ПН среды в присутствии клеток бактерий и супернатантом, может указывать одновременно на способность штамма синтезировать как экзо-, так и эндосурфактанты и в наибольшей степени выявлена у штаммов *A. faecalis* Bi3 и *S. mizutaii* Bi9.

Таким образом, мы проанализировали показатели ИЭ, ПН и гидрофобности клеточных стенок (рис. 22) выделенных штаммов УОБ, характеризующие синтез ими как эндо- так и экзосурфактантов. Установлено, что наибольшей способностью к синтезу биосурфактантов обладают штаммы *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus sp.* Bi4, *Sphingobacterium sp.* Bi8, *Rhodococcus sp.* Bi10 и *S. multivorum* Bi2.

Известно, что у коринеформных бактерий, включая представителей р. *Rhodococcus* [Bligh, Dyer, 1959; Neu, 1996, Гоголева, 2012] это связано с наличием и длиной цепей миколовых кислот в клеточной стенке. Количество миколовых кислот

определяет повышенную гидрофобность клеточной поверхности этих организмов [Bligh, Dyer, 1959; Neu, 1996].

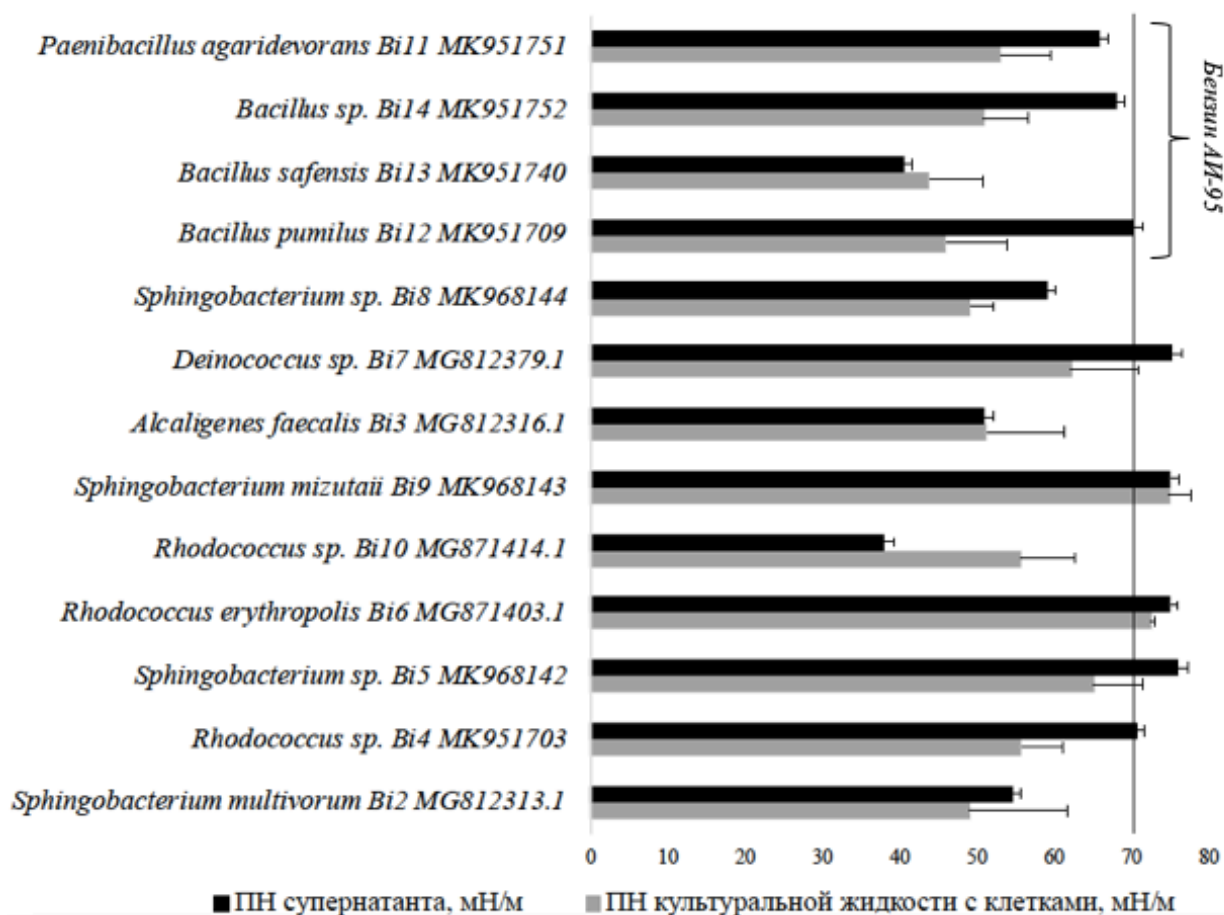


Рисунок 21. Поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта и культуральной жидкости с клетками выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий. Поверхностное натяжение среды без клеток УОБ - 70 мН/м (вертикальная линия).

Микроорганизмы, способные снижать показатель ПН жидкости более чем на 10 мН/м, могут быть перспективными продуцентами биосурфактантов [Francy et al., 1991; Григорьян, 2004]. Кроме штаммов *R. erythropolis* Bi6 и *S. mizutaii* Bi9 все выделенные из образцов топлив штаммы УОБ снижали ПН значительно больше, чем на 10 мН/м, особенно бациллы. Ранее, этот феномен также был установлен для представителей данного рода [Joshi, Desai, 2013]. Среди выделенных штаммов, относящихся к роду *Rhodococcus*, как наиболее распространенных десрукторов УВ нефтепродуктов, штамм *R. erythropolis* Bi6 был активным десруктором как индивидуальных УВ, так и модельной смеси 1, тогда как штаммы *Rhodococcus* sp. Bi4 и *Rhodococcus* sp. Bi10 были продуцентами разных групп биосурфактантов, то

есть формировали гетерогенное сообщество, способное эффективно разрушать широкий спектр УВ.

Локализация биосурфактантов, синтезируемых клетками внеклеточно, в цитоплазме или в клеточной стенке является важным биотехнологическим свойством штаммов УОБ. Возможность клеток синтезировать внеклеточные, то есть не связанные с клеточной стенкой, биосурфактанты, делает их особенно важными для использования в биоремедиации. Сравнение значений показателя ПН жидкостей изученных штаммов УОБ позволяет предположить, что у большинства штаммов, обладающих поверхностно-активными свойствами, эта способность ассоциирована с клеточной массой бактерий, а не с супернатантом. Штаммы *B. safensis* Bi13 и *Rhodococcus* sp. Bi10 эффективно снижали показатель ПН среды, однако, в случае этих штаммов поверхностно-активные свойства связаны с бесклеточным супернатантом, что предполагает наличие внеклеточных биосурфактантов. Повышенная гидрофобность клеточных стенок бактерий указывает на наличие связанных с клеточной стенкой биосурфактантов, что наиболее выражено у штамма *Sphingobacterium* sp. Bi5.

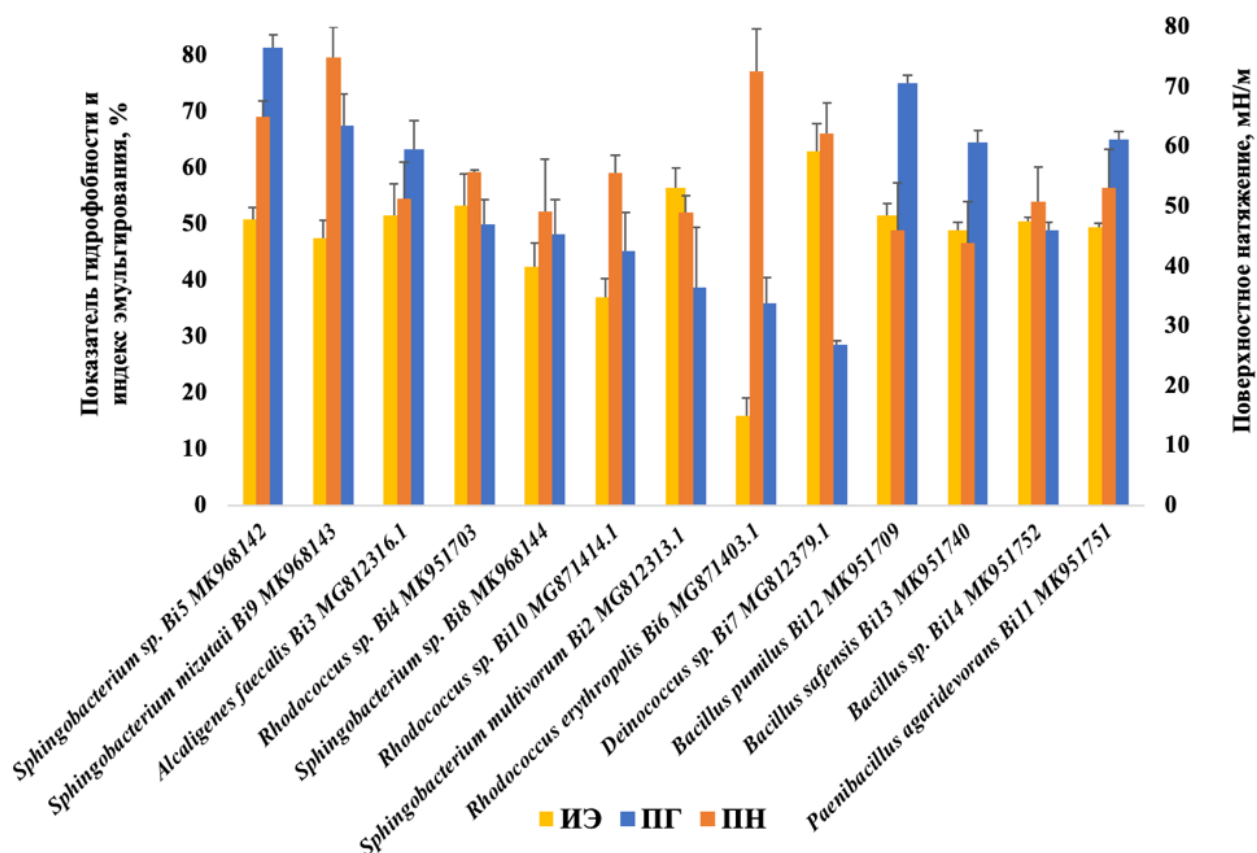


Рисунок 22. Определение поверхностного натяжения, эмульгирующей активности и показателя гидрофобности штаммов, выделенных из ТС-1.

С точки зрения продукции ПАВов среди выделенных штаммов наиболее перспективными являются *A. faecalis* Bi3, *Rhodococcus* sp. Bi4, *Sphingobacterium* sp. Bi8, *Rhodococcus* sp. Bi10 и *S. multivorum* Bi2, клетки этих штаммов могут быть отнесены к универсальным активным штаммам с точки зрения биodeградации НП. Штаммы *Sphingobacterium* sp. Bi5, *S. mizutaii* Bi9, и *Deinococcus* sp. Bi7 можно отнести к селективно активным, так как в отсутствии способности к снижению ПН среды, они обладают высокими показателями ЭА и ПГ. А штамм *R. erythropolis* Bi6 к неактивным.

3.6.4. Детекция генов синтеза биосурфактантов у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий

Изучено наличие у выделенных штаммов УОБ генов *RhlA* и *spf0*, отвечающих за синтез биосурфактантов рамнолипидной и липопептидной природы.

Установлено (рис. 23, 24), что наиболее эффективными деструкторами УВ из выделенных штаммов являются штаммы *R. erythropolis* Bi6, *S. multivorum* Bi2, *Bacillus safensis* Bi13 и *Bacillus* sp. Bi14. Все выделенные штаммы грамположительных бактерий, кроме *Rhodococcus* sp. Bi10, содержит ген *spf0*, отвечающих за синтез биосурфактантов липопептидной природы, характерный для представителей р. *Bacillus* и некоторых других грамположительных бактерий. По данным литературы, бактерии р. *Rhodococcus* синтезируют также и трегалолипидные биосурфактанты, продукция которых, связана с наличием гена *AlkB* (раздел 1.6.). Все штаммы, выделенные из топлива ТС-1, кроме штамма *Deinococcus* sp. Bi7, содержат ген *AlkB*, и, возможно, синтезируют также и трегалолипиды.

Все штаммы грамотрицательных бактерий, выделенные из образца топлива ТС-1, характеризуются наличием гена *RhlA*, отвечающего за синтез рамнолипидных биосурфактантов.

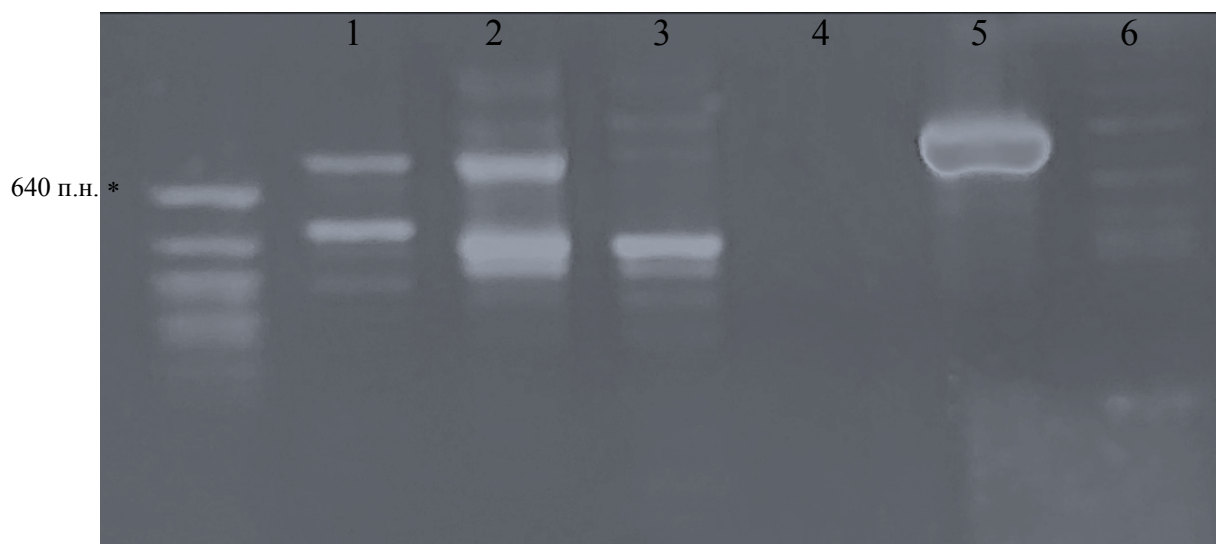


Рисунок 23. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *RhIA*. 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2; 2- *Alcaligenes faecalis* Bi3; 3 - *Sphingobacterium* sp. Bi5; 4 - *Deinococcus* sp. Bi7; 5 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; 6 - *Sphingobacterium mizutaii* Bi9. Маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

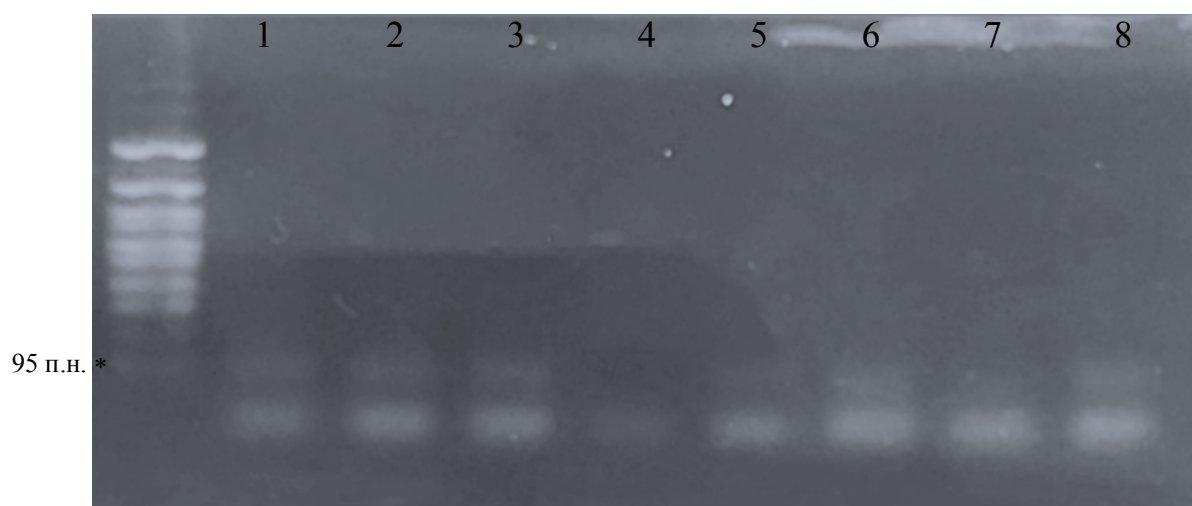


Рисунок 24. Электрофорез в агарозном геле ПЦР продукта гена *spf0*. Примечание: 1 - *Rhodococcus* sp. Bi4; 2 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6 3; 3 - *Deinococcus* sp. Bi7; 4 - *Rhodococcus* sp. Bi10; 5 - *Bacillus pumilus* Bi12; 6 - *Bacillus safensis* Bi13; 7 - *Bacillus* sp. Bi14; 8 - *Paenibacillus agaridevorans* Bi11. Маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder). * - ожидаемая длина целевого ПЦР-продукта.

Рамнолипидами является одними из наиболее изученных биосурфактантов, что связано с их использованием для повышения нефтеотдачи пластов [Youssef et al. 2013; Amani, 2015; Zhao et al. 2016], так как являются одновременно поверхностно активными веществами, обладающими эмульгирующими свойствам [Amani et al. 2013; Zhao et al. 2016]. Это наиболее эффективная группа биосурфактантов по

способности снижать поверхностное натяжение воды, а также межфазного натяжения нефть–вода [Amani, Mehrnia 2010].

Кроме того, как упоминалось ранее, УОБ, развиваясь в топливе, способны формировать биопленку. Некоторые молекулы биоПАВов, а именно рамнолипиды, могут выполнять не только функцию ПАВов, но и участвовать в поддержании структуры биопленки, участвуя в формировании внеклеточного полимерного матрикса [Стрелкова и др., 2013]. Показано, что каналы, пронизывающие биопленку, удерживаются открытыми при участии рамнолипидов [Ильина и др., 2004].

Таким образом, способность некоторых из выделенных штаммов бактерий синтезировать биоПАВы особенно рамнолипидной природы подтверждается наличием в геноме соответствующих генов *RhlA*, *AlkB* и *spfO*.

3.7. Изучение способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к росту на различных углеводородах

Нефть и НП — это сложные соединения, включающие широкий спектр различных УВ. Поэтому выделенные штаммы УОБ подвергали тесту на субстратную специфичность — способность к росту на различных УВ и их использованию. В качестве единственного источника углерода в минеральную среду вносили следующие УВ: н-алканы (изооктан, ундекан, гексадекан), ароматические (бензол, бифенил), полиароматические (нафталин, фенантрен, антрацен), нефтепродукты (дизельное топливо, ТС-1) и нефть. Считается, что при использовании данного метода УВ равномерно диффундируют в агар и частично испаряются, так что культивирование происходит одновременно и на твёрдом субстрате, и в парах УВ [Руководство..., 1983]. Полученные результаты представлены в таблицах 14, 15.

Таблица 14. Субстратная специфичность штаммов, выделенных из ТС-1.

Название культуры микроорганизма									
Углеводородный субстрат	<i>A. faecal</i> <i>s</i> Bi3	<i>Rhodococcus</i> <i>s</i> sp. Bi4	<i>Sphingobacterium</i> <i>m</i> sp. Bi5	<i>R. erythropolis</i> Bi6	<i>Deinococcus</i> <i>s</i> sp. Bi7	<i>Sphingobacterium</i> <i>m</i> sp. Bi8	<i>S. mizutai</i> <i>i</i> Bi9	<i>Rhodococcus</i> <i>s</i> sp. Bi10	<i>S. multivorum</i> <i>m</i> Bi2

Продолжение таблицы 14

н-алканы									
изооктан	4-5	6	4	5	4	5	6	5	4
ундекан	4-5	6	4-5	5	4	5	5-6	5	4-5
гексадекан	5	6	4	4	4	6	6	5	4
Ароматические углеводороды (АУ)									
бензол	4	4-5	4	4	3	5	5	4	4
бифенил	4-5	4	4-5	4	3	4	4-5	4-5	4
Полиароматические углеводороды (ПАУ)									
нафталин	4	5	4	4-5	0	4-5	4-5	4-5	3
антрацен	4-5	4	4	4	4	5	5	4	4
фенантрен	4	4	4	4	3	4	5	4	4
Нефтепродукты (НП)									
ДТ	4	5	6	5	0-1	5	5-6	5-6	3
нефть	4	5	5	5-6	1	4-5	4	3-4	4
ТС-1	4	4-5	2-3	5-6	3	6	5	5	2-3

Таблица 15. Субстратная специфичность штаммов, выделенных из бензина АИ-95.

Субстрат	<i>P. agaridevorans</i> Bi11	<i>B. pumilus</i> Bi12	<i>B. safensis</i> Bi13	<i>Bacillus</i> sp. Bi14
н-алканы				
ундекан	3	1	5	5
гексадекан	3	3	5	5
Ароматические углеводороды (АУ)				
бензол	0	0	0	0
бифенил	3	0	0	2
Полиароматические углеводороды (ПАУ)				
нафталин	3	2	2	4
антрацен	0	0	0	0
фенантрен	0	0	0	0

Продолжение таблицы 15

Нефтепродукты (НП)				
ДТ	4	3	3	4
нефть	3	3	4	5
ТС-1	4	4	4	4

Примечание: 0 - отсутствие роста; 1 - едва заметный рост; 2 - очень слабый рост; 3 -слабый рост; 4 - умеренный рост; 5 - хороший рост; 6 - отличный рост.

В случае использования н-алканов рост штаммов *A. faecalis* Bi3, *Sphingobacterium* sp. Bi5 и *S. multivorum* Bi2 возрастал с увеличением длины цепи и снижался в присутствии гексадекана, кроме штамма *Sphingobacterium* sp. Bi8. При этом активность в отношении неразветвленных алканов была выше, чем в случае с разветвленным - изооктаном, что может быть связано с тем, что затрудняется взаимодействие по типу «фермент-субстрат» и такие УВ мало доступны биохимическому окислению [Dutta, Narayana, 2001]. В случае со штаммами УОБ, выделенными из бензина, н-алканы и НП являются группами, подвергающимися использованию выделенными штаммами, а остальные группы не использовались.

Ароматические УВ используются всеми штаммами практически на одном уровне (табл. 14), в частности, бифенил, что говорит о присутствии у исследованных штаммов, выделенных из ТС-1, ферментной системы окисления подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ, содержащих железосерный кластер Риске [Shumkova et al., 2014].

По использованию ПАУ активность штаммов, выделенных из ТС-1, находится на среднем уровне (табл. 14) за исключением штамма *Deinococcus* sp. Bi7, который вообще не использует нафталин, однако способен к росту на фенантрена и антраcene. Штаммы УОБ выделенные из бензина способны к росту только в присутствии нафталина, тогда как в присутствии фенантрена и антрацена рост отсутствовал (табл. 15).

Способность всех культур (кроме штамма *Deinococcus* sp. Bi7) использовать нафталин говорит о присутствии в клетках выделенных штаммов ферментной системы окисления ПАУ – многокомпонентной оксигеназной ферментной системы, состоящей из редуктазы, (2Fe-2S) железосерного центра Риске в ферредоксине и железосерного флавопротеина [Сазыкин и др., 2009]. По данным литературы, этот

фермент катализирует широкий спектр реакций пяти основных групп (реакции диоксигенирования, монооксигенирования, дегидратации, о- и м-деалкилирования и сульфоокисления) [Ветрова и др., 2008]. Таким образом, практически все исследованные в данной работе микроорганизмы обладают способностью усваивать компоненты тяжелых фракций нефти. Кроме того, в клетках исследуемых культур возможно присутствуют плазмиды, содержащие гены деградации нафталина, а также имеются различия в структуре генетических систем деструкции нафталина [Олейникова, 2012].

В случае использования НП все штаммы, кроме *Deinococcus* sp. Bi7, используют их довольно интенсивно, как уже упоминалось выше, эта группа УВ также используется и штаммами, выделенными из бензина, причем с высокой интенсивностью. Можно предполагать, что некоторые исследованные субстраты могут выступать в роли стрессоров, и различия штаммов в способности ассимилировать эти соединения свидетельствуют о вариативности их адаптивных механизмов.

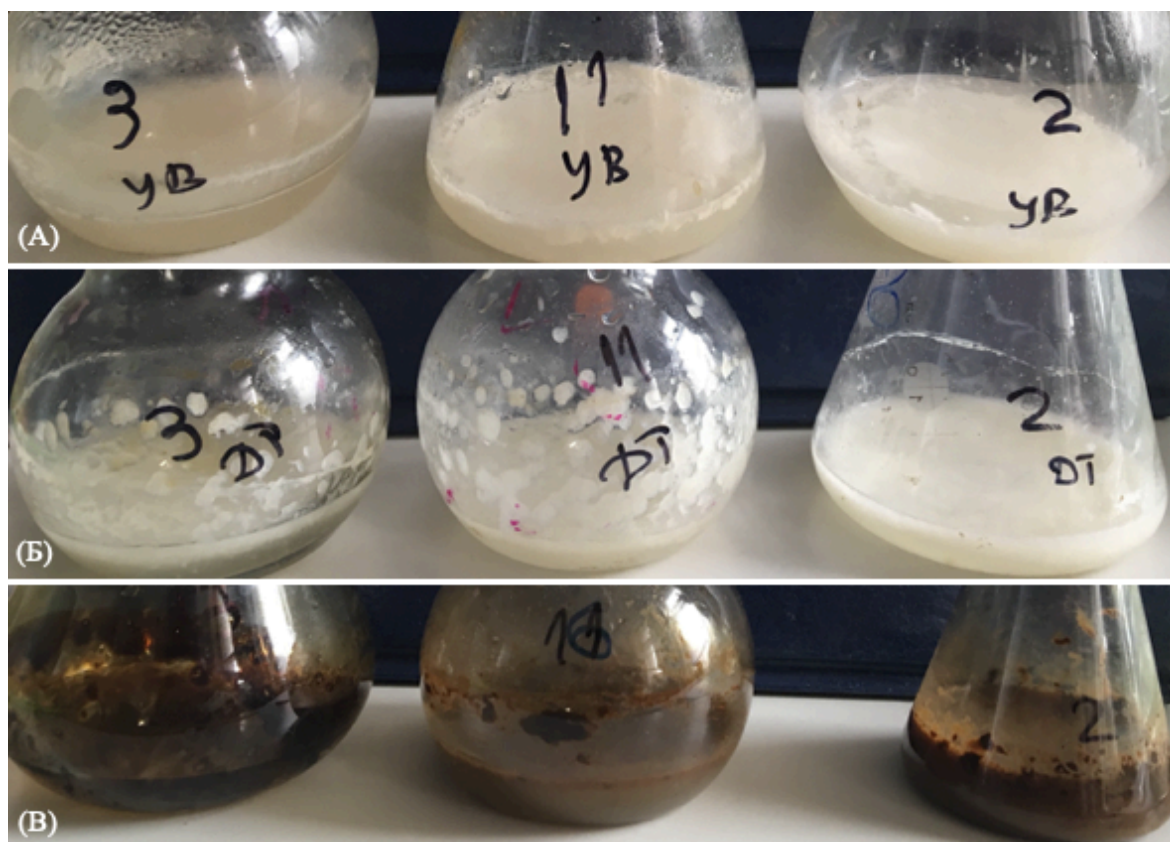


Рисунок 25. Рост штаммов углеводородокисляющих бактерий в жидкой среде Эванса с добавлением смеси углеводородов №1 (А), ДТ (Б) и нефти (В). На стенках колб видны хлопья (Б), а также полное эмульгирование нефти (В). Примечание: 3 - *Sphingobacterium* sp. Bi5, 11 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6, 2 - *Alcaligenes faecalis* Bi3.

Согласно литературным данным, действие стрессоров обусловлено их специфичностью к той мишени в клетке, на которую направлено их воздействие [Аринбасарова и др., 2015]. В жидкой среде использование нефти и НП выделенными штаммами также довольно интенсивна (рис. 25). При этом в жидкой среде хорошо заметно образование эмульсий, а также хлопьев и флоккул.

Представители рода *Rhodococcus* по-разному используют разные типы УВ: *Rhodococcus* sp. Bi 4 лучше всего использует н-алканы и НП, а АУ и ПАУ – использует менее активно. *R. erythropolis* Bi6 наиболее активно использует НП, а н-алканы, АУ и ПАУ используют менее активно, чем НП. *Rhodococcus* sp. Bi10 с одинаковой активностью использует все типы УВ. Использование УВ *A. faecalis* Bi3 идет с той же активностью, как и у *Rhodococcus* sp. Bi10. Представители рода *Sphingobacterium* менее активны в использовании н-алканов, АУ и ПАУ, чем представители *Rhodococcus*. *S. multivorum* Bi2 слабо использует ДТ и ТС-1; *Sphingobacterium* sp. Bi5 очень активно использует ДТ, а ТС-1 использует с той же активностью, что *S. multivorum* Bi2. По сравнению с другими штаммами эти культуры используют ТС-1 с наименьшей активностью.

Штаммы *S. mizutaii* Bi9 и *Sphingobacterium* sp. Bi8 наиболее универсальны и активны среди изученных штаммов в отношении использования всех типов УВ.

Штамм *Deinococcus* sp. Bi7 обладает избирательным отношением к разным типам УВ. Использование н-алканов им сопоставимо с активностью использования н-алканов другими выделенными штаммами, АУ и ПАУ происходит менее активно (причем нафталин не используется вовсе), нефть и ДТ данный штамм использует с наименьшей активностью из всех выделенных штаммов УОБ.

Примеры роста некоторых культур в присутствии различных типов УВ представлены на рисунке 26.

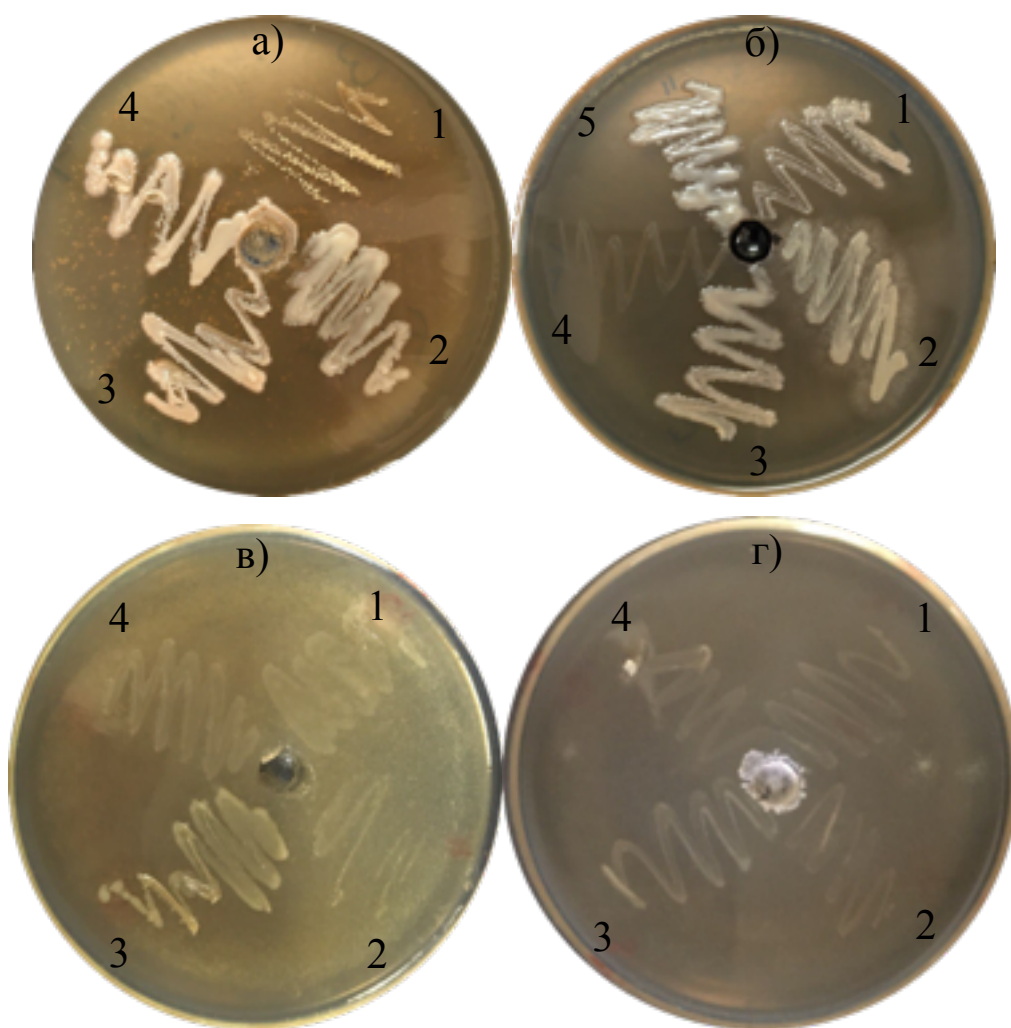


Рисунок 26. Рост некоторых исследуемых культур на минеральной среде в присутствии ТС-1 (а), нефть (б), бензол (в), антрацен (г). Примечание: а) 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2, 2 - *Sphingobacterium* sp. Bi5, 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4, 4 - *Alcaligenes faecalis* Bi3; б) 1 - *Rhodococcus* sp. Bi4, 2 - *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, 3 - *Sphingobacterium* sp. Bi8, 4 - *Deinococcus* sp. Bi7, 5 - *Rhodococcus erythropolis* Bi6; в) 1- *Rhodococcus erythropolis* Bi6, 2 - *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4, 4 - *Sphingobacterium* sp. Bi8; г) 1 - *Sphingobacterium multivorum* Bi2, 2 - *Sphingobacterium* sp. Bi5, 3 - *Rhodococcus* sp. Bi4, 4 - *Alcaligenes faecalis* Bi3.

Если сопоставить данные по измерению показателей ПН, ЭА и гидрофобности (рис. 22) с субстратной специфичностью штаммов (табл. 14, 15), можно отметить, что для штамма *Sphibgobacterium* sp. Bi8 наблюдается корреляция между использованием различных видов субстратов и образование ПАВов, которая у данного штамма выражена больше, чем у остальных. Штамм *S. multivorum* Bi2 также выделяет большое количество ПАВов, но при этом обладает средней способностью к деградации субстратов. А штамм *R. erythropolis* Bi6 успешно деградирует НП, но при этом образует незначительное количество экзо- и

эндоПАВов, что может указывать на невозможность установить данным методом высокомолекулярные ПАВы, выделяемые представителями рода *Rhodococcus*, которые позволяют им деградировать сложные УВ.

Кроме того, согласно данным по деградации модельной смеси УВ №1 штаммы *R. erythropolis* Bi6, *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8. были отнесены к группе универсально активных штаммов. Однако, по сумме полученных данных штамм *S. multivorum* Bi2, единственный штамм, который и по показателям ЭА и способности образовывать ПАВы, подтверждает свое положение в данной категории, а вот два других штамма либо только секретируют ПАВы (*Sphibgobacterium* sp. Bi8), либо вообще имеют низкие показатели ПН и ЭА (*Rhodococcus erythropolis* Bi6). Показатели гидрофобности клеток у всех трех штаммов низкие.

3.7.1. Определение зоны, свободной от нефти

Еще одним способом определения способности штаммов к продукции биоПАВов является изменение зоны свободной от нефти. Наиболее высокая активность биоПАВ, сопровождающаяся максимальным образованием свободной от нефти зоны диаметром 24 мм наблюдалась у штамма *Rhodococcus* sp. Bi10.

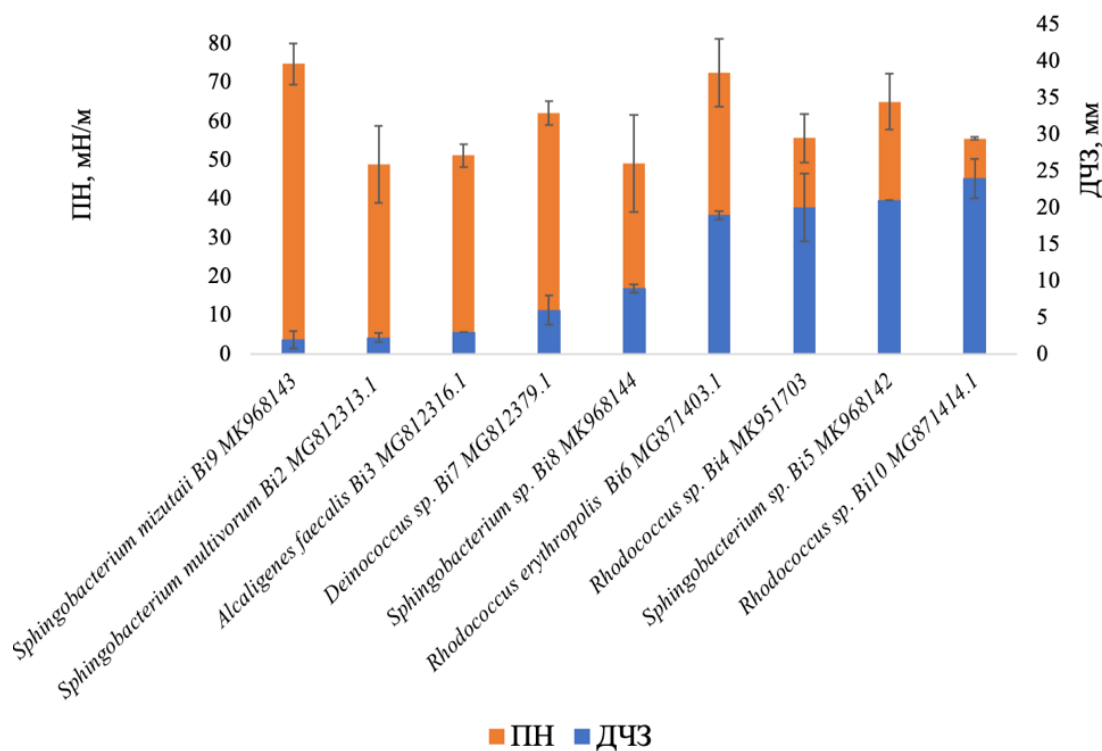


Рисунок 27. Сопоставление показателей диаметра чистой зоны и поверхностного натяжения жидкости у штаммов, выделенных из ТС-1. ПН среды без клеток УОБ - 70 мН/м.

Это может свидетельствовать о хорошей способности исследуемой культуры генерировать ПАВы, т.к. в литературе [Youssef et al., 2004] в качестве положительных величин рассматривались значения диаметра чистой зоны (ДЧЗ) более 5 мм. У штаммов, изолированных из ТС-1 ДЧЗ находился в пределах от 2 мм (у *Sphingobacterium mizutaii* Bi9) до 24 мм (у *Rhodococcus* sp. Bi10). При этом, у штаммов с низкими показателями снижения ПН и ДЧЗ был небольшим (рис. 27), например, у штамма *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, и наоборот: у штаммов *Rhodococcus* sp. Bi10, *S. multivorum* Bi2 и *Sphibgobacterium* sp. Bi8 наиболее высокие показатели снижения ПН и ДЧЗ свободной от нефти.

3.8. Выявление наличия микромицетов в изученных образцах топлива

3.8.1. Выделение и идентификация изолятов микромицетов из образца ТС-1

Многочисленные исследования показали, что большое разнообразие бактерий и грибов, включая плесневые и дрожжи, могут развиваться в дизельном, биодизельном топливе и керосине [Gaylarde et al. 1999; Rauch et al. 2006; Yemashova et al. 2007; Rodriguez-Rodriguez et al. 2010; Sørensen et al. 2011; Martin-Sanchez et al. 2018a, б]. Кроме того, многие из этих микроорганизмов могут фактически разлагать загрязненное топливо [Кривушина, 2012; Itah et al. 2009; Buddie et al. 2011; Soriano et al. 2015].

Всего из исследованных образцов топлива с видимыми признаками контаминации было выделено шесть моноспоровых культур микромицетов (табл. 16, 17). Все они были получены из образца реактивного топлива ТС-1. Из контрольных образцов не было получено ни одного изолята микромицетов.

Культуры микромицетов различались по типу, форме и окраске колоний (рис. 28а-г) и морфологии спорообразования, спорообразованию, размерам и морфологии конидий и конидиофоров (рис. 28д-з). Особенности полученных культур микромицетов обобщены в Таблице 16.

Таблица 16. Культуральная и морфологическая характеристика изолятов микромицетов.

	Морфологические характеристики	Характеристика спороношений
18RJF6, 18RJF9, 18RJF10	Колонии широко растущие, поверхность бархатистая, слегка тяжистая, с отдельными войлочными участками, особенно по краю колонии; Обратная сторона колонии ровная, вначале не окрашенная, позже от центра появляется красно-коричневая пигментация;	Спороношение развивается быстро, окраска спороношения серовато-голубовато-зеленая, край колонии более светлый; Конидиеносцы образуются от субстратного и воздушного мицелия, типично бивертициллярные и симметричные $100\text{--}150 \times 2,5\text{--}3$ мкм; метулы в мутовках по 3–5, длиной 11–13 мкм; фиалиды ланцетовидные по 3–6 на метуле, размером $9\text{--}12 \times 2,5\text{--}3$; Конидии формируются в длинных цепочках, собранных в рыхлые колонки, поверхность гладкая, эллипсоидальные, $2\text{--}3 \times 1,5\text{--}2,5$ мкм.
18RJF2	Колонии компактные ограниченно растущие, на 7 сутки роста формируют колонии 10–20 мм, не высокие (1–2 мм) с четко очерченным краем, складчатые с приподнятым центром, поверхность бархатистая, не спороносит по краю колонии; Обратная сторона складчатая, не окрашенная;	Спороношение развивается быстро, окраска ярко-зеленая, край колонии светлый; Конидиеносцы образуются от субстратного и воздушного мицелия, типично бивертициллярные и симметричные, с дополнительными веточками, размером $40\text{--}110 \times 2\text{--}3$ мкм; с дополнительными ветвями 10–25 мкм; метулы расходящиеся по 5–6, $7\text{--}15 \times 2\text{--}3,5$ мкм; фиалиды от ланцетовидной до колбовидной формы, от трех до шести на метулу, $7\text{--}14 \times 2\text{--}3,5$ мкм; Конидии формируются в длинных цепочках, собранных в рыхлые колонки, сильно варьируют по размерам $2,5\text{--}6 \times 2,5\text{--}4$ мкм.

Продолжение таблицы 16

18RJF4.1	Колонии умеренно растущие, на 7 сутки роста частично заполняют поверхность чашки (2,5–3,5 мм диаметром), не высокие (1–3 мм), поверхность бархатистая, радиально складчатая, край колонии ровный;	Спороношение развивается быстро, окраска спороношения желто-зеленая. Обратная сторона колонии радиально складчатая, вначале не окрашенная, быстро приобретает ярко-лимонно-желтый цвет; Конидиеносцы образуются от субстратного и воздушного мицелия, типично тервертициллярные и ассиметричные с прижатой боковой веточкой $250\text{--}500 \times 2,5\text{--}3,5$ мкм, усложняющие кисточку; метулы в мутовках по 3–5, длиной $8\text{--}15 \times 2,0\text{--}2,3$ мкм более или менее цилиндрические, с гладкими стенками, несущие от 3 до 6 фиалид; Фиалиды бутылевидные, с утолщенной стенкой, размером $7\text{--}10 \times 2,0\text{--}2,5$ мкм; Конидии от субшаровидных до эллипсоидальных $3,0\text{--}4,0 \times 2,8\text{--}3,8$ мкм.
18RJF4.2	Колонии компактные ограниченно растущие, на 7 сутки роста формируют колонии 10–20 мм, невысокие (2–4 мм) сильно складчатые с четко очерченным краем, сильно складчатые с приподнятым центром, поверхность бархатистая;	Спороношение развивается медленно, окраска сине-зеленая. Обратная сторона радиально складчатая, вначале не окрашенная, быстро приобретает винно-фиолетовую до темно бордовой окраску, пигмент диффундирует в окружающую среду; Конидиеносцы образуются от субстратного мицелия, прямостоячие длиной до 500 мкм и диаметром от 5 до 8 мкм, бесцветные, гладкие, сравнительно толстостенные; Спорозоносные головки радиальные двурядные, пузыри почти шаровидные, фертильные почти по всей поверхности, до 20 мкм в диаметре; метулы от 6 до 7 мкм $\times 2\text{--}3$ мкм, фиалиды от 7 до 10 мкм $\times 2,0\text{--}2,5$ мкм; Конидии от шаровидных до почти шаровидных, от 2,5 до 3,5 мкм, заметно шиповатые, зеленые в массе.

В совокупности, основываясь на морфологическом анализе и характеристиках колоний грибов, полученные изоляты микромицетов относятся к аскомицетам порядка Eurotiales: *Talaromyces amestolkiae* (рис. 28а, д), *Penicillium chrysogenum* (рис. 28б, е), *Aspergillus sydowii* (рис. 28в, ж) и *T. rugulosus* (рис. 28г, з).

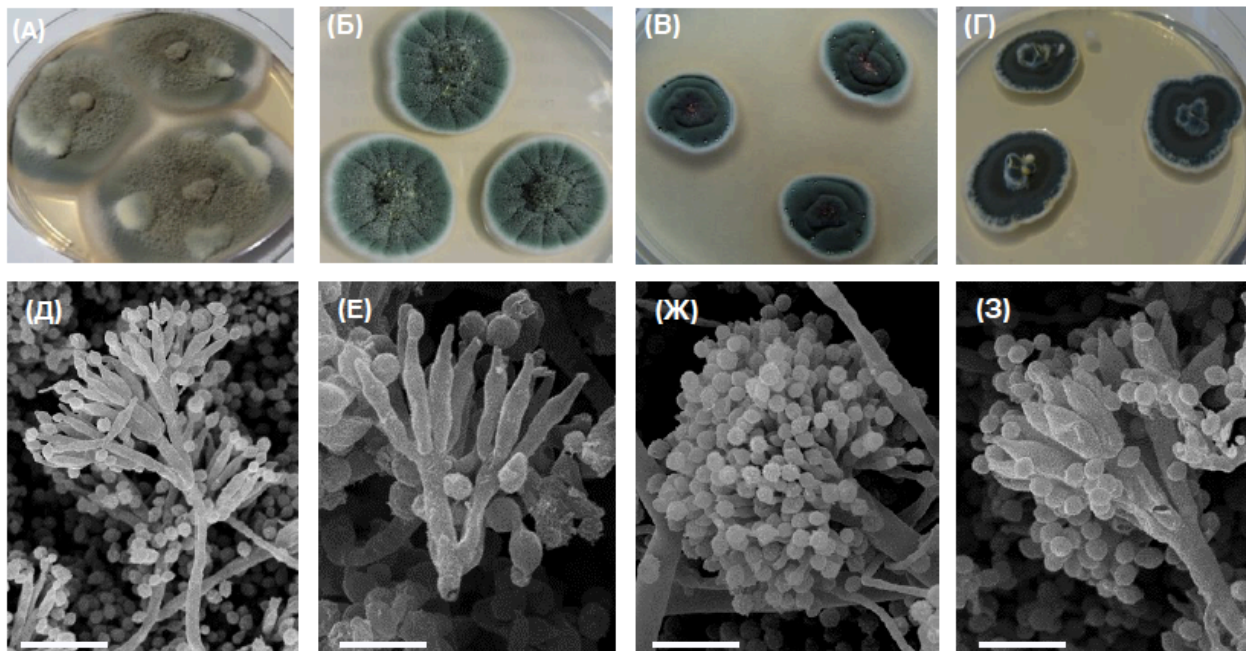


Рисунок 28. Колонии выделенных микромицетов на твердой питательной среде на 7 сутки культивирования (А-Г). СЭМ мицелия микромицетов (Д-З), выделенных из авиационного топлива ТС-1. А, Д - *Talaromyces amestolkiae*; Б, Е - *Penicillium chrysogenum*; В, Ж - *Aspergillus sydowii* и Г, З - *Talaromyces rugulosus*. Шкала: 5 μm (Е), 10 μm (Д, Ж), 20 μm (З).

Рода микромицетов *Talaromyces*, *Penicillium* и *Aspergillus* в изобилии встречаются в загрязненной НП почве и имеют способность к деградации керосина [Chaillan et al. 2004; Lotfinasabasl et al. 2012; Dhar et al. 2014; Korshunova et al., 2019]. Грибы pp. *Penicillium* и *Aspergillus* считаются наиболее эффективными утилизаторами УВ (в частности, керосинового топлива) среди грибов [Lotfinasabasl et al. 2012; Dhar et al. 2014], однако, микромицеты р. *Aspergillus* демонстрирует более высокие темпы роста в НП [Lotfinasabasl et al. 2012]. Следует отметить, что одни и те же грибы были выделены из образцов нефти в разных географических регионах и в разных экспериментальных условиях [Dhar et al. 2014; Lotfinasabasl et al. 2012, Кривушина, 2012]. Таким образом, они могут рассматриваться как универсальные компоненты микробных сообществ НП и ответственные за их биодеструкцию.

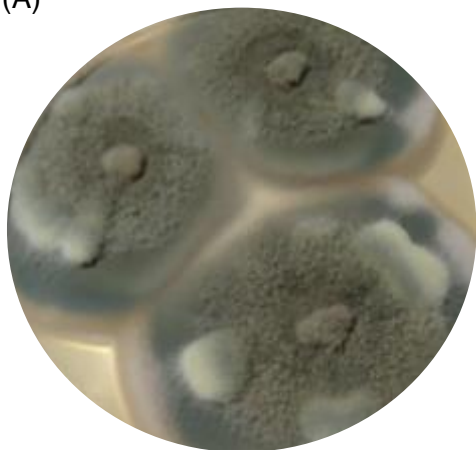
Таблица 17. Характеристики микромицетов, выделенных из авиационного топлива ТС-1.

Изолят	Среда	Микромицет	Баллы деградации ТС-1*	Лизис мицелия
18RFJ2	СЭ	<i>Talaromyces rugulosus</i>	0	-
18RFJ4.1	Чапек	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3	+
18RFJ4.2	Чапек	<i>Aspergillus sydowii</i>	5	+
18RFJ6	СА	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	5	+
18RFJ9	СА	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	3	+
18RFJ10	СА	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	2	+

*Балл деградации авиационного топлива ТС-1 (0 баллов – нет роста; 1 балл – мутный раствор, очень мелкие хлопья; 2 балла – хлопья среднего размера, легко различимые визуально; 3 балла – крупные хлопья; 4 балла – мелкие сгустки; 5 баллов – крупные сгустки); лизис мицелия в культуре и визуальное наличие бактерий в мицелии.

На начальных этапах культивирования колонии грибов были геометрически правильными без видимых признаков повреждения (рис. 29а). В то же время после хранения изолятов микромицетов в течение 30 суток на чашках Петри, в некоторых из них происходил лизис мицелия (табл. 17, рис. 29б). Как правило, лизис грибного мицелия связан с присутствием активно делящихся бактерий [Mitchell, Alexander, 1963].

(А)



(Б)

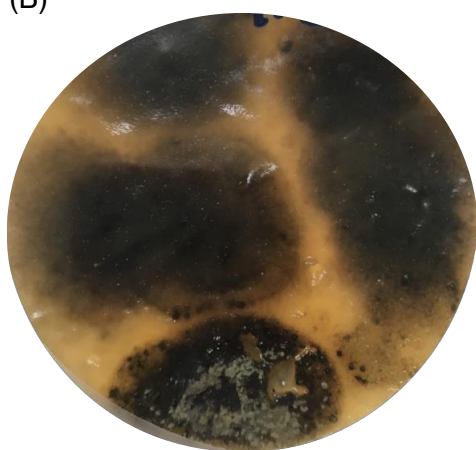


Рисунок 29. Анализ бактериального компонента сообществ, полученных из авиационного топлива ТС-1. А – исходная культура микромицета; Б – лизис мицелия.

Ни один из микробиологических подходов к получению культивируемых форм бактерий из биомассы мицелия полученных изолятов микромицетов не дал результатов. Бактериальный рост не был обнаружен ни на начальных стадиях выделения грибных культур, ни на специфической стадии выделения бактерий. СЭМ образцов мицелия выявила единичные, по-видимому, некультивируемые, связанные с гифосферой изолятов микромицетов бактериальные клетки (рис. 30).

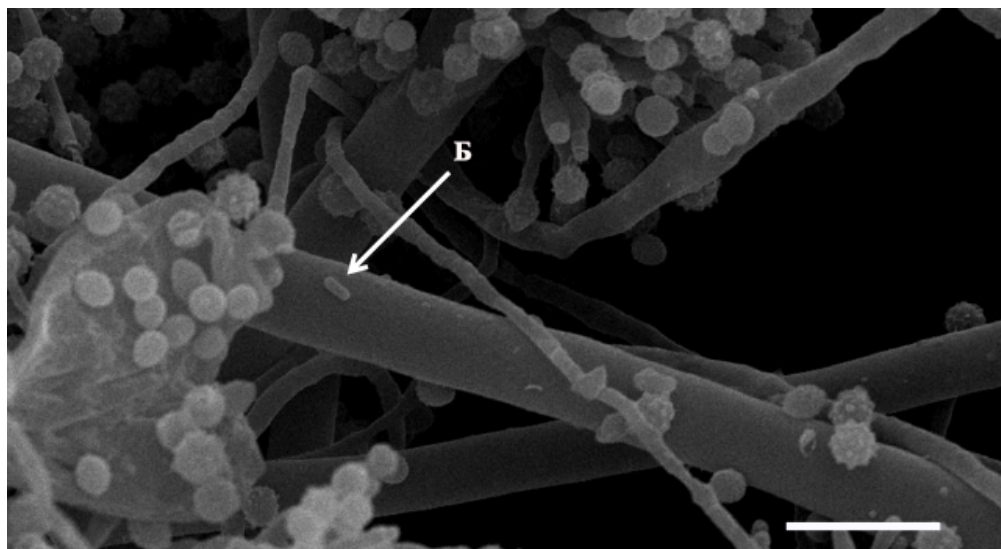


Рисунок 30. Анализ бактериального компонента сообществ, полученных из авиационного топлива ТС-1. Бактерии (Б) на гифах гриба в образце 18RJF9. Шкала: 10 μm .

3.8.2. Некультивируемые бактерии в биомассе микромицетов

ПЦР-анализ по генам *16S/18S pPHK* биомассы микромицетов выявил наличие двух ампликонов (рис. 31) длиной 1250 п.о. (в 18RJF6, 18RJF4.2, 18RJF2) и 900 п.о. (18RJF4.1, 18RJF4.2, 18RJF6, 18RJF9 и 18RJF10). Фрагмент длиной 900 п.о. соответствовал бактериальному гену *16S pPHK*, тогда как фрагмент 1250 п.о. – эукариотическому гену *18S pPHK* [полученной в результате неспецифического отжига праймеров с эукариотической *18S pPHK*]. В биомассе изолята 18RJF2 не наблюдалось продукта, соответствующего 900 п.о. Таким образом, биомасса пяти из шести штаммов микромицетов, выделенных из реактивного топлива ТС-1, содержала как бактерии, так и микромицеты и представляли собой микромицетно-бактериальные сообщества.

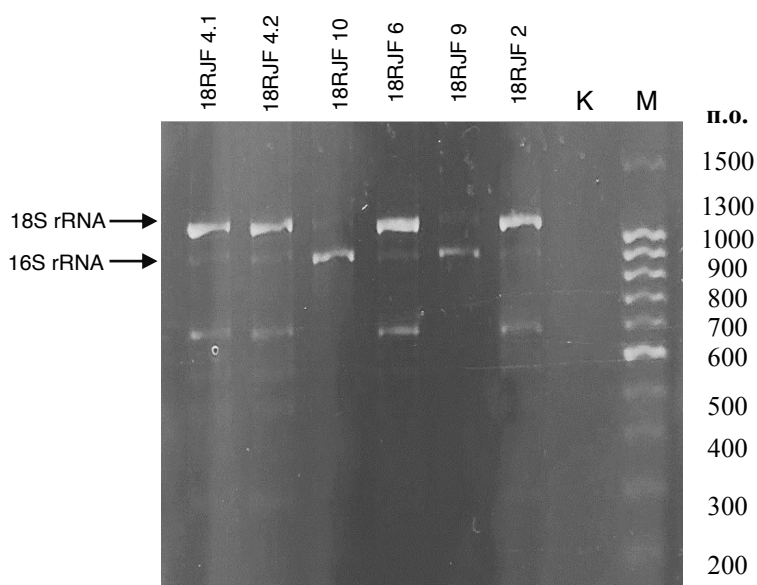


Рисунок 31. Разделение ПЦР-продукта, полученного с помощью универсальных праймеров на гены *16S/18S pPHK* в агарозном геле, М - 100+ bp DNA ladder, К – отрицательный контроль.

Образцы биомассы штаммов микромицетов, для которых был описан лизис, подвергли анализу методом метабаркодинга на основе гипервариабельного участка V4 гена *16S pPHK*. Большинство прочтений в метагеномных наборах данных были представлены митохондриальной 16S pPHK гриба из-за ее ортологии с бактериальной 16S pPHK [Chekanov et al. 2019]. По данным поиска гомологов в базе данных NCBI GenBank, наибольшая гомология считываний наблюдалась у микромицетов родов *Talaromyces*, *Penicillium* и *Aspergillus* (покрытие 98-100%, 99-100%, таблица 18). Хотя высокая гомология митохондриального рибосомального

гена малой субъединицы РНК не является убедительным доказательством точной идентификации микромицета, она является подтверждением идентификации полученных морфологических данных и визуальных наблюдений. Таким образом, предполагаемая таксономическая принадлежность микромицетов, полученная на основе микроскопических наблюдений, была подтверждена метагеномным анализом митохондриального рибосомального гена малой субъединицы РНК. Нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента депонированы в международную базу данных Genbank, им присвоены следующие номера: MW393516, MW393517, MW393518, MW393519, MW393520, MW393521.

Таблица 18. Микроорганизмы в образцах топлива ТС-1, определенные на основе данных метабаркодинга по гипервариабельному участку V4 гена *16S рРНК*: рода микромицетов на основании митохондриальной ДНК и бактерии с предполагаемой активностью к биodeградации УВ.

Изолят	Таксономическая принадлежность по митохондриальному рРНК	Бактерии с предполагаемой активностью к биodeградации УВ
18RFJ4.1	<i>Penicillium</i>	<i>Sphingomonas, Bacillus, Rhodococcus, Halomonas, Nocardioidea</i>
18RFJ4.2	<i>Aspergillus</i>	<i>Sphingomonas, Bacillus, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Arthrobacter, Halomonas, Nocardioidea</i>
18RFJ6	<i>Talaromyces</i>	<i>Sphingomonas, Bacillus, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Arthrobacter, Halomonas, Nocardioidea</i>
18RFJ9	<i>Talaromyces</i>	<i>Sphingomonas, Bacillus, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Arthrobacter, Streptomyces, Nocardioidea</i>
18RFJ10	<i>Talaromyces</i>	<i>Sphingomonas, Bacillus, Arthrobacter, Halomonas, Streptomyces, Nocardioidea</i>

На основе данных метабаркодинга по гипервариабельному участку V4 гена *16S рРНК* количество бактериальных родов в образцах находилось в пределах 39-110. Процент не идентифицированных прочтений после удаления последовательностей ДНК грибов из рассмотрения не превышал 9%. Метабаркодинг по гипервариабельному участку V4 гена *16S рРНК* сообщества микромицетов

18RJF4.1; 18RJF4.2; 18RJF6; 18RJF9; 18RJF10, содержащих бактерии, показало отсутствие архей и наличие четырех преобладающих бактериальных филумов: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes (рис. 33). Подавляющее большинство бактерий во всех образцах принадлежали к грамотрицательным кладам. Изолят 18RJF4.2 имел самый высокий показатель представленности филуму Bacteroidetes (0.4%). Actinobacteria преобладали в биомассе изолятов 18RJF9 и 18RJF10 и составляли 92% и 76%, соответственно. В биомассе изолята 18RJF4.1 филум протеобактерии присутствовал в количестве 99%. В биомассе микромицетов трех изолятов (18RJF4.1; 18RJF4.2; 18RJF4.6) также была обнаружена относительно высокая доля бактериальных прочтений, соответствующих филуму Bacteroidetes (рис. 32).

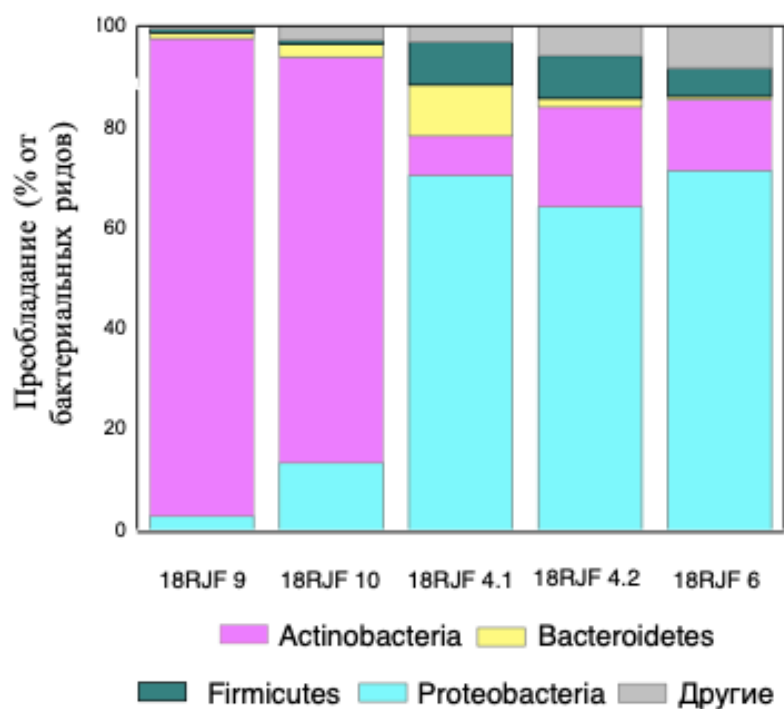


Рисунок 32. Преобладание бактериальных филумов в сообществах, полученных из авиационного топлива ТС-1 на основе метабаркодинга по гипервариабельному участку V4 гена *16S rPHK*. Показан процент бактериальных прочтений NGS, относящихся к каждому филуму (от всех прокариотических прочтений). «Другие» - не идентифицированные сиквенсы.

Изученные сообщества биомассы изолятов микромицетов содержали четыре общих рода бактерий: *Sphingomonas*, *Chthoniobacter*, *Bacillus*, *Nocardioides* (рис. 33).

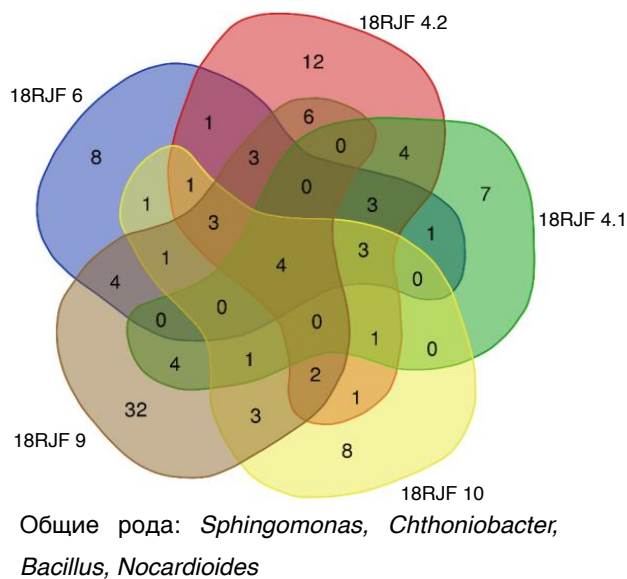


Рисунок 33. Число общих родов в сообществах на основании метагеномного анализа на платформе Illumina, диаграмма Венна.

В биомассе микромицетов изолятов 18RJF9 и 18RJF10 большая часть родов соответствовала *Streptomyces* - 56 и 69%, соответственно (рис. 34); другие рода филума Actinobacteria были немногочисленны. Несмотря на относительно высокую общую численность филума Bacteroidetes, преобладающих родов, относящихся к этому типу, не было обнаружено (рис. 34). В биомассе изолята 18RJF9 преобладали бациллы (33%). В биомассе изолятов 18RJF4.1, 18RJF4.2 и 18RJF6 доминировали протеобактерии родов *Shewanella* (6-18%), *Sphingomonas* (3-6%) и *Halomonas* (14-25%) (рис. 34).

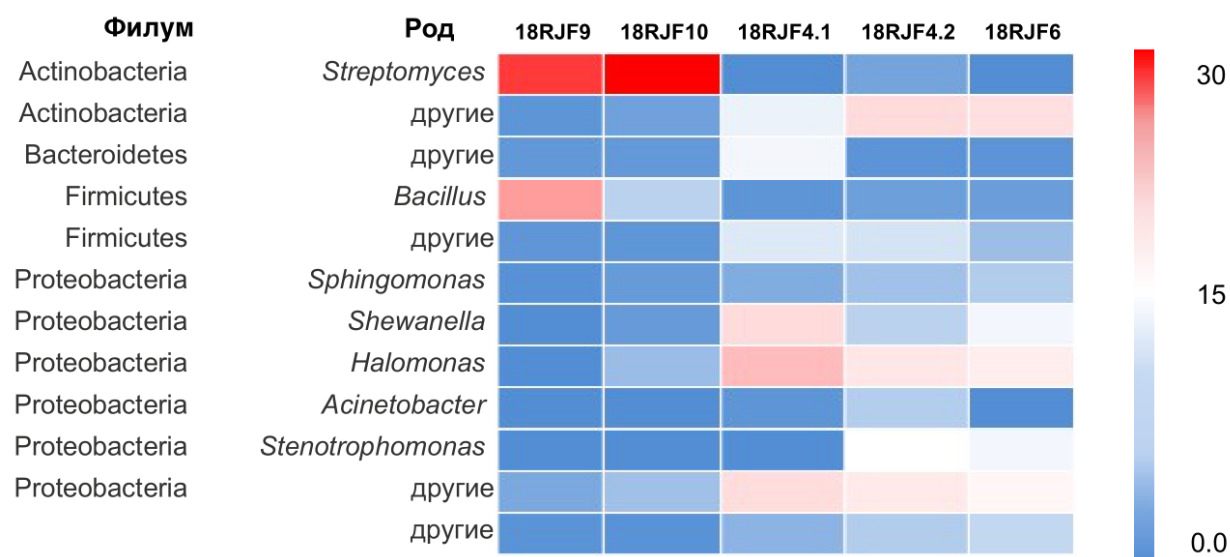


Рисунок 34. Тепловая карта, основанная на фракции прочтений NGS в каждом сообществе некультивируемых бактерий биомассы микромицетов на основании метабаркодинга по гипервариабельному участку V4 гена *16S рPHK*.

Известно, что наиболее распространенные УОБ, загрязняющие НП, относятся к филумам Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria [Shabir et al. 2008; B cker et al. 2014]. Они были обнаружены и выделены из нефтезагрязненных почв и образцов нефти [Ferradji et al. 2014; Liao et al. 2015; Das, Chandran 2011; Balachandran et al. 2012]. Кроме того, сообщалось об эффективном разложении нефти некоторыми группами архей – Euryarchaeota, Thaumarchaeota и Crenarchaeota. Нефтезагрязненные почвы и водоемы характеризуются очень сложными архейными сообществами, и их таксономическая структура более сложна, чем эубактерий [Liu et al. 2009; Tapilatu et al. 2010].

Полученные метагеномные данные выявили наличие этих основных групп УОБ во всех образцах биомассы микромицетов, в которых при длительном культивировании наблюдался лизис мицелия. Однако, в микромицетно-бактериальных сообществах в исследуемом образце реактивного топлива ТС-1 не было обнаружено значительного количества архей.

Деградация различных фракций УВ отмечена для многих родов бактерий, изолированных из загрязненных нефтью как почв, так и акваторий. Представители следующих родов эубактерий: *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Marinobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Cellulomonas*, *Rhodococcus*, и *Alcanivorax* являются типичными нефтедеструкторами [Shabir et al., 2008; Mnif et al.,

2009; Baoune et al., 2018]. Все изученные изоляты микромицетов представляющие собой микромицетно-бактериальные сообщества содержали бактериальные роды, обладающие способностью к деградации нефти (табл. 18), поэтому они также могут быть вовлечены и в биоповреждение НП включая различные виды топлива, например, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter* и *Streptomyces*. В двух изолятах биомассы микромицетов преобладали бактерии рода *Streptomyces*, которые согласно предыдущим исследованиям способны разлагать линейные УВ и ПАУ [Das, Chandran, 2011; Balachandran et al., 2012; Ferradji et al., 2014; Baoune et al., 2018].

В биомассе трех изолятов наблюдалось относительно высокое количество представителей pp. *Halomonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas* и *Acinetobacter*, а в одном образце преобладали *Bacillus*. Деградация нефти и НП хорошо известна для бактерий pp. *Shewanella*, *Stenotrophomonas* и *Acinetobacter* [Atlas, 1981; Liu et al., 2009; Das, Chandran, 2011; Chen et al., 2012]. Некоторые из этих бактерий проявляют биосурфактантную активность, что важно для эффективного использования гидрофобных субстратов [Das, Chandran, 2011; Chen et al., 2012]. Примечательно, что во всех исследованных образцах выявлены представители pp. *Bacillus*, *Nocardioides* и *Sphingobacterium*.

В разделе 3.2. показано, что из загрязненного топлива (ТС-1 и бензина АИ-95) общепринятыми микробиологическими методами на богатой среде были выделены четырнадцать культивируемых штаммов бактерий. Их таксономическая принадлежность была подтверждена идентификацией по гену *16S pPHK* [Ivanova et al., 2019]. Топливо ТС-1 характеризовалось разнообразным бактериальным составом, включающим следующие pp: *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Deinococcus*. Те же бактерии были обнаружены и в моноспоровых грибных изолятах на основе метабаркодинга по гипервариабельному участку V4 гена *16S pPHK* [Иванова и др., 2019]. Однако выделить бактерии из этих сообществ было невозможно. Рост культивируемых бактерий не был обнаружен на СА, СЭ и ЭМ. Это может указывать на тесную связь между микромицетами и бактериями.

В совокупности данные метабаркодинга свидетельствуют о том, что загрязненное топливо ТС-1 характеризуется типичной таксономической структурой нефтеразлагающего бактериального сообщества. В ранее опубликованных

исследованиях многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что деградации УВ осуществляется микромицетно-бактериальными ассоциациями УОМ.

Наличие бактериальной ДНК в биомассе мицелия изолятов указывает на наличие некультивируемых форм бактерий, которые не были обнаружены или выделены из сообществ микромицетов стандартными микробиологическими методами. Скорее всего, микромицеты, выделенные из реактивного топлива ТС-1, "прячут" бактериальный компонент в своей цитоплазме и / или ги́фосфере, образуя мутуалистическое сообщество. Бактериальный эндосимбиоз с грибным мицелием является хорошо известной стратегией их сосуществования для совместного производства биологически активных соединений и эффективного использования субстрата [Partida-Martinez, Hertweck, 2005; Pion et al., 2013]. Специфическое микроокружение этой зоны, благоприятное для бактерий, может быть обеспечено экзометаболитами микромицетами [Boer et al., 2005].

Синергизм бактерий и грибов в использовании субстрата хорошо известное явление. Компоненты этих сложных сообществ могут иметь общие ферментативные системы для деградации УВ [Rapp et al., 1992; Pion et al., 2013; Passman, 2013]. Кроме того, микроорганизмы могут быть вовлечены в формирование мультивидовых биопленок, обеспечивающих стабильность формирующихся сообществ [Seneviratne et al., 2008, Ножевникова и др., 2015]. Многочисленные исследования последних лет [Seneviratne et al., 2008; Herath et al., 2014; Pandit et al., 2020] показали перспективную тенденцию в применении микромицетно-бактериальной биопленки в различных областях.

Мы предполагаем, что выделенные микромицеты не могли самостоятельно осуществлять разложение топлива или проводили это с меньшей эффективностью, но приобрели способность разлагать НП при образовании сообщества с УОБ. Осадок, образующийся на дне или на границе раздела фаз жидкостей в емкостях, по-видимому, представляет собой биомассу мицелия микромицетов с бактериями.

Известно, что сообщество УОМ окисляет УВ НП с большей эффективностью, чем монокультура [de Almeida et al., 2017; Ivanova et al., 2019]. Более того, иммобилизация таких сообществ на специальном субстрате приводила к более глубокой деградации УВ. Характеристика микробного сообщества, связанного с мицелием микромицетов, и комбинации, образующиеся из различных штаммов,

пока мало изучены. В некоторых случаях отдельные УОМ не могут осуществлять такой сложный многостадийный процесс, как деградация УВ, а сообщество, в котором взаимодействуют разные группы УОМ по типу синтрофии, может [Diestra et al., 2005].

3.8.3. Способность полученных сообществ углеводородокисляющих микроорганизмов к росту на топливе ТС-1 и нефти

Оценена способность к росту изолятов микромицетов на топливе ТС-1 и нефти. Баллы, присвоенные изолятам, зависели от эффективности роста и варьировали от 0 - отсутствие роста до 5 - образования крупных серых или светлых сгустков в средней фазе или на границе фаз. Изоляты микромицетов (микромицетно-бактериальные ассоциации), полученные из реактивного топлива ТС-1, можно разделить на 3 группы в зависимости от их способности разлагать это топливо: (1) активные деструкторы (пять баллов), (2) потенциально активные деструкторы (четыре балла) и (3) неактивные или случайные (три или менее баллов). В первую группу входят 2 изолята – 18RJF4.2 и 18RJF6, во вторую – 3 18RJF4.1, 18RJF9 и 18RJF10, в третью – 1 (18RJF1) (табл.17). Рост изолятов микромицетов на нефти представлен на рисунке 35.

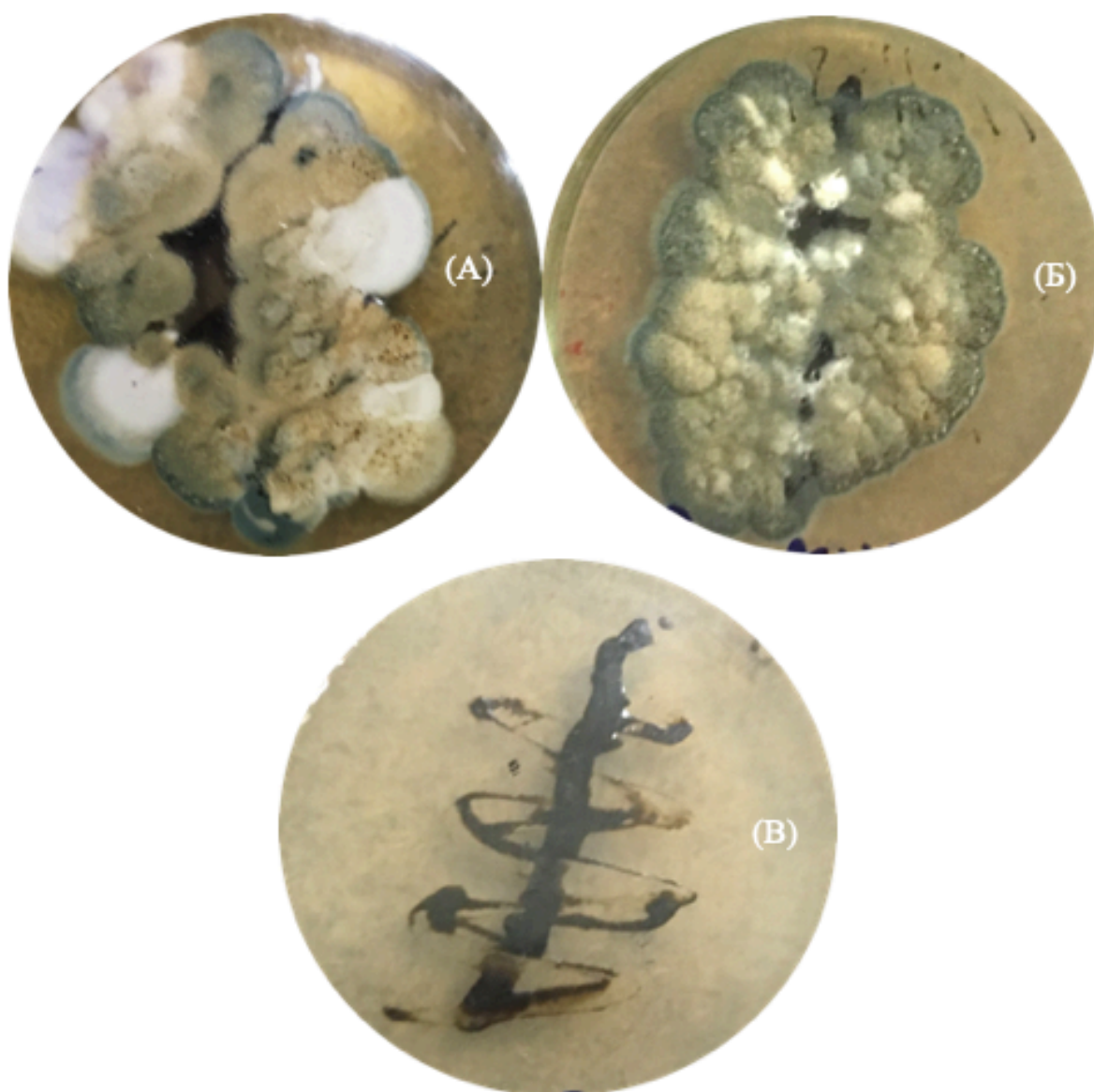


Рисунок 35. Рост микромицетов на плотной среде с добавлением нефти. А – изолят 18RJF4.2, Б – изолят 18RJF6, В – изолят 18RJF1, который не обладает способностью к росту на нефти.

Все изученные изоляты 18RJF6, 18RJF4.2, 18RJF9, 18RJF10 и 18RJF4.1, где первые два относились к группе активных деструкторов УВ, а остальные потенциально активные деструкторы, содержали в биомассе (гифосфере или цитоплазме) бактериальный компонент. Таким образом, наличие бактериального компонента в микромицетно-бактериальном сообществе обеспечивает эффективную деградацию УВ НП.

3.9 Иммобилизация культур углеводородокисляющих бактерий на нетканых полимерных носителях

Создание биополимерных материалов для обезвреживания и утилизации аварийных разливов нефти и НП и загрязнения экосистем предприятиями нефтегазового комплекса является крайне актуальной задачей. В качестве сорбентов нефти и НП в водных средах перспективно использование нетканых полимерных сорбентов, обладающих высокой нефтеемкостью, низким водопоглощением и возможностью регенерации [Dedov et al., 2017]. Модификации таких материалов, в том числе и биологическими растительными наполнителями, позволяет варьировать их свойствами и повышать «привлекательность» при заселении УОМ. Активным биологическим компонентом таких материалов являются УОМ, использующие в процессе роста УВ, переводя их в углекислый газ и воду [Ivanova et al., 2019; Lobakova et al., 2016]. То есть, такие биополимерные материалы не только способны сорбировать нефть и НП, но и проводить их деградацию, реализовывая безотходную технологию очистки акваторий.

3.9.1 Особенности колонизации полимерных матриц углеводородокисляющими бактериями

Процессе иммобилизации штаммами УОБ проводили на нетканых полимерных матрицах сополимера акрилонитрила и метилметакрилата (СПАН), обогащенного свекольным жомом, в качестве растительного наполнителя. Метилметакрилат в данной матрице является гидрофильным компонентом и хорошо смачивается водой, при сохранении достаточной плавучести. Введение в данный полимер растительного наполнителя повышало коэффициент сорбционной емкости полимера по сравнению с материалом без наполнителя [Кашеева, 2015; Ivanova et al., 2019]. Полимерные материалы с растительным наполнителем характеризовались наилучшей сорбцией нефти из водной смеси по сравнению с материалами без наполнителей [Кашеева, 2015]. Введение растительного наполнителя в состав полимерного материала позволяет создать благоприятные условия для иммобилизации клеток УОБ на поверхности волокон полимера, внедрения их в структуру волокон и заселения межволоконного пространства. Полимер с растительным наполнителем [свекольным жомом] был предоставлен кафедрой

неорганической химии ФГБОУ Российский государственный университет нефти и газа имени И.М. Губкина.

Полимерный материал на основе СПАНа получали методом аэродинамического формования фильерным способом из расплава полимера. Для модификации полимерных волокон биогенными наполнителями использовали свекольный жом (ГОСТ Р 54901-2012) в концентрации 25%.

Свекольный жом, промышленный продукт, который является сельскохозяйственным отходом. Как биогенный наполнитель, включенный в состав полимера, может обеспечить микроорганизмы биогенными элементами, необходимыми для их жизни и создать экосистему, близкую к естественной. Выбор свекольного жома в качестве растительного наполнителя и источника биогенных элементов обусловлен коммерческой доступностью данного продукта и стабильными показателями сорбционной емкости образцов СПАН-свекольный жом при различных температурах [Ivanova et al., 2019].

Волокнистая матрица, модифицированная свекловичным жомом, является материалом, сформированным путем свободно переплетения волокон разной формы и диаметра, а именно округлых с диаметром 2-12 мкм и сплюснутых шириной 25-30 мкм (рис. 36).



Рисунок 36. Внешний вид полимерной матрицы, использованной для иммобилизации клеток углеводородокисляющих бактерий.

Поверхность волокон имеет неровности, небольшие углубления и канавки. Некоторые волокна имеют утолщения, в которых, по-видимому, локализован свекольный жом (рис. 37, обозначение стрелками).

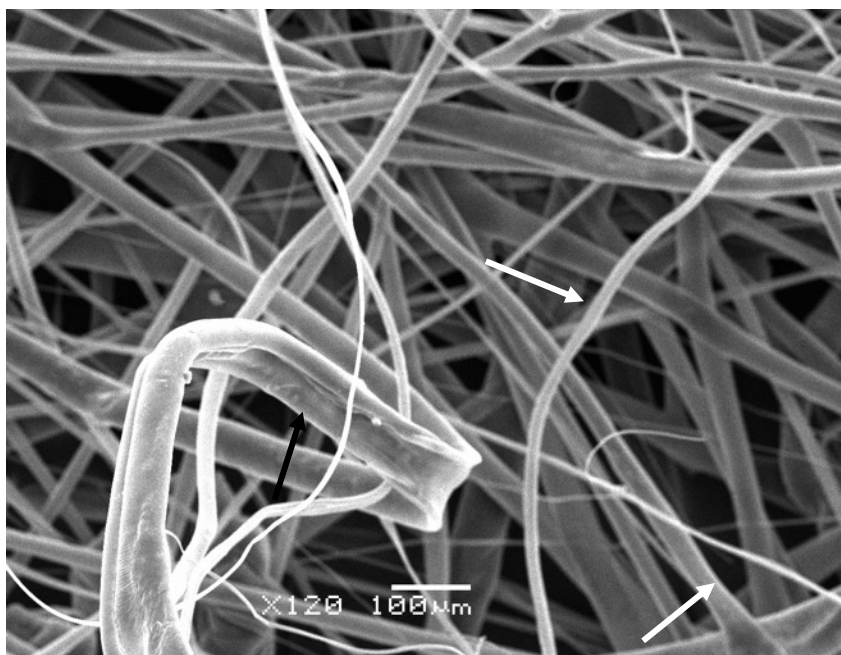


Рисунок 37. Структурные особенности нетканого волокнистого полимера СПАН. Белыми стрелками отмечены круглые волокна разного диаметра. Черной стрелкой - волокно с ложбинкой.

3.9.2. Иммобилизация монокультур углеводородокисляющих бактерий на полимерном носителе на примере штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7

Процесс иммобилизации бактериальных клеток на волокнах полимерных матриц, с одной стороны, зависит от эффективности адсорбции бактериальных клеток на поверхности волокон, с другой стороны, может отражать активную колонизацию пространства волокон и межволоконного пространства в результате размножения микробных клеток после их прикрепления к их поверхности. Последнее может привести к образованию бактериальных микроколоний, флоккул, биопленок на поверхности волокон и в межволоконном пространстве полимера, в результате активного деления клеток и/или секреции внеклеточного полимерного матрикса (рис. 38, 39).

Исследованы особенности иммобилизации на полимерном материале монокультуры штамма *Ochrobactrum* sp. Bi1 и смешанной культуры штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7. Смешанная культура создана на основе контрастности морфотипов бактериальных клеток штаммов.

Наличие отдельных бактериальных клеток, микроколоний и флоккул наблюдается на поверхность волокон полимерного материала, как при иммобилизации монокультуры штамма *Ochrobactrum* sp. Bi1, так и смешанной культуры штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7. В случае иммобилизации отмечается прикрепление к поверхности волокон разных типов бактериальных клеток, а именно, палочек (1-1,5 x 3 мкм) и кокков (1,5 x 1,5 мкм) (рис. 40). Одиночные клетки бактерий свободно расположены, образование слизистого полимерного матрикса не наблюдается.

На 7-21 день исследования образцов СПАНа наблюдалась активная колонизация поверхности волокон и межволоконного пространства полимерной матрицы бактериальными клетками (рис. 38), формирование микроколоний, образование на поверхности волокон биопленки и формирование микрофлоккул в межволоконном пространстве. В составе внеклеточного полимерного матрикса бактериальные клетки находятся в контакте с друг друга и способны быстро преобразовывать субстрат. Внеклеточный полимерный матрикс также является защитой от резких колебаний параметров культивирования и способствует сохранению жизнеспособности и эффективности метаболизма бактериальных клеток, составляющих сообщество (смешанную культуру), т. е. обеспечивает гомеостаз популяциям бактериальных клеток, их функциональную активность, и стабильность. Инкорпорация бактериальных клеток в слизистый полимерный матрикс и формирование биопленок может свидетельствовать о формировании микробного мутуалистического сообщества [Пиневиц и др., 2018]

В некоторых частях образцов СПАНа при иммобилизации смешанной культуры штаммов УОБ вся поверхность волокон на 21-е сутки культивирования оказывалась покрыта бактериальными клетками. При этом, бактериальные клетки обоих морфотипов детектируются в микроколониях и флоккулах. Это свидетельствует о том, что заселение полимерной матрицы происходит двумя различными типами бактерий, входящими в состав смешанной культуры (рис. 40) и может указывать на ее стабильность.



Рисунок 38. Внешний вид полимерной матрицы, использованной для иммобилизации клеток углеводородокисляющих бактерий, на 7 (слева) и 14 (справа) сутки.



Рисунок 39. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными УОБ на 7 сутки культивирования. На волокнах видны микроколонии бактерий и биопленка. Внеклеточный полимерный матрикс биопленки окрашен рутениевым красным.

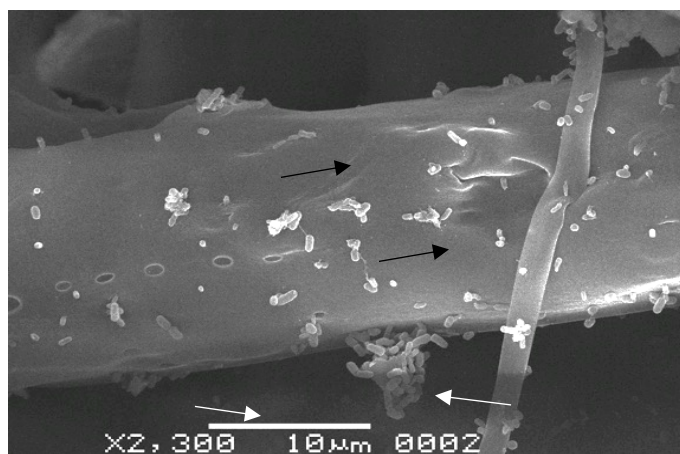


Рисунок 40. СЭМ. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными УОБ на 7 сутки культивирования. На разного диаметра волокнах видны прикрепившиеся к поверхности одиночные клетки бактерий (черные стрелки) и микроколонии (белые стрелки).



Рисунок 41. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными *Ochrobactrum* sp. B11 на 14 сутки культивирования. На волокнах видны биопленка бактерий в виде грибовидных тел. Внеклеточный полимерный матрикс биопленки окрашен в розовый цвет, окрашивание рутениевым красным.

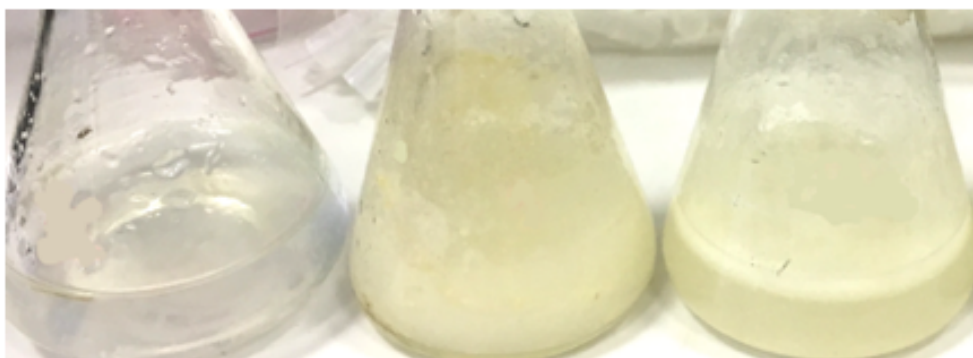


Рисунок 42. Внешний вид среды культивирования с формированием устойчивой эмульсии (14-е сутки). Слева контрольный образец без клеток УОБ, посередине *Ochrobactrum* sp. B11, справа - смешанная культура *Ochrobactrum* sp. B11 и *Deinococcus* sp. B17.

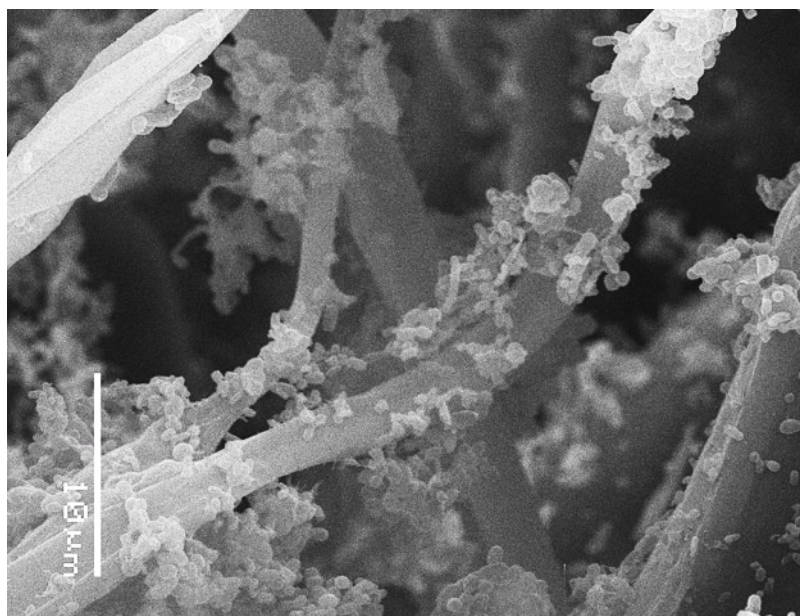


Рисунок 43. СЭМ. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными *Ochrobactrum* sp. B11 на 14 сутки культивирования. На поверхности волокон видны разного диаметра микроколонии. В межволоконном пространстве выявляются микрофлоркулы (указано стрелкой).

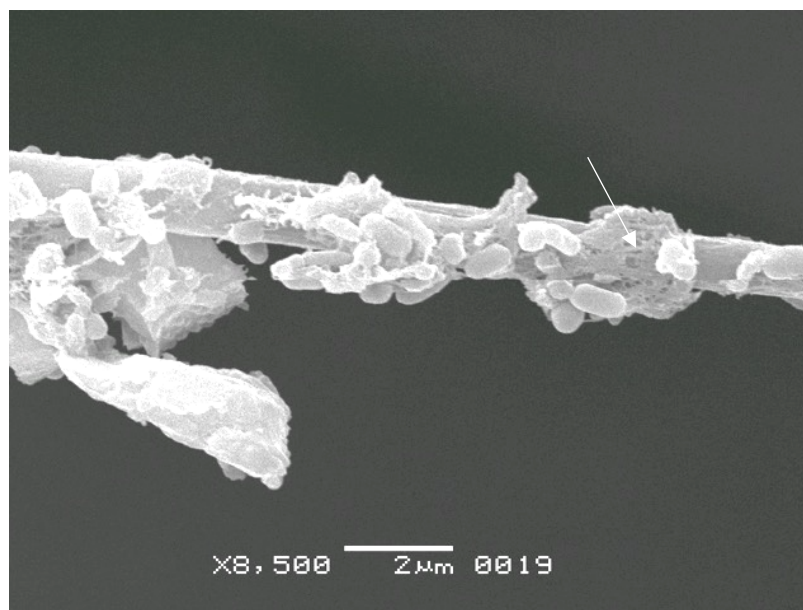


Рисунок 44. СЭМ. Фрагменты волокон СПАН-свекольный жом 25% с иммобилизованными клетками смешанной культуры *Ochrobactrum* sp. Vi1 и *Deinococcus* sp. Vi7. Формирование внеклеточного полимерного матрикса (указано стрелками) и формирование микроколоний смешанной культуры бактерий *Ochrobactrum* sp. Vi1 и *Deinococcus* sp. Vi7 (14-е сутки) на поверхности волокон матрицы.



Рисунок 45. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными *Ochrobactrum* sp. Vi1 на 21 сутки культивирования. На волокнах видны массивные образования биопленки в виде межволоконных микрофлоккул (указано черными стрелками) и биопленок на поверхности волокон (указано белыми стрелками). Внеклеточный полимерный матрикс биопленки окрашен в розовый цвет, окрашивание рутениевым красным.

В течение 21 суток наблюдался активный рост бактериальных клеток как на поверхности волокон, так и в межволоконном пространстве, что свидетельствует о том, что свекольный жом обеспечивает бактериальные клетки необходимыми биогенными элементами на протяжении всего периода культивирования и происходит образование биополимерного материала (рис. 41-46).

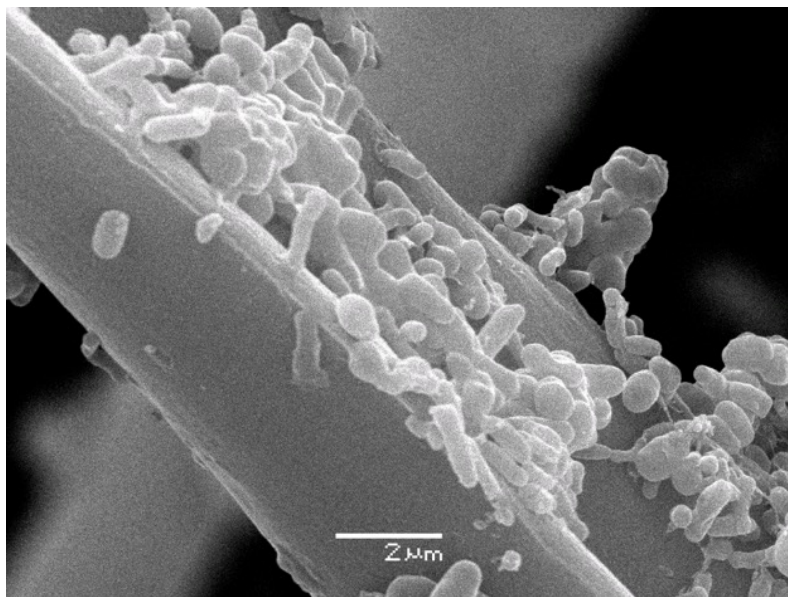


Рисунок 46. СЭМ. Фрагменты волокон СПАН-свекольный жом 25% с иммобилизованными клетками смешанной культуры *Ochrobactrum* sp. Vi1 и *Deinococcus* sp. Vi7. Полость в волокне матрицы, заполненная микроколониями клеток смешанной культуры *Ochrobactrum* sp. Vi1 и *Deinococcus* sp. Vi7 (21-е сутки), клетки бактерий интегрированы во внеклеточный полимерный матрикс.

Прирост биомассы клеток оценивали с помощью измерения сухого веса матрицы, а также подсчета количества КОЕ. Сухой вес матриц, на которых иммобилизовали смесь штаммов оказался больше, чем сухой вес матриц, инкорпорированных монокультурой (рис. 47).

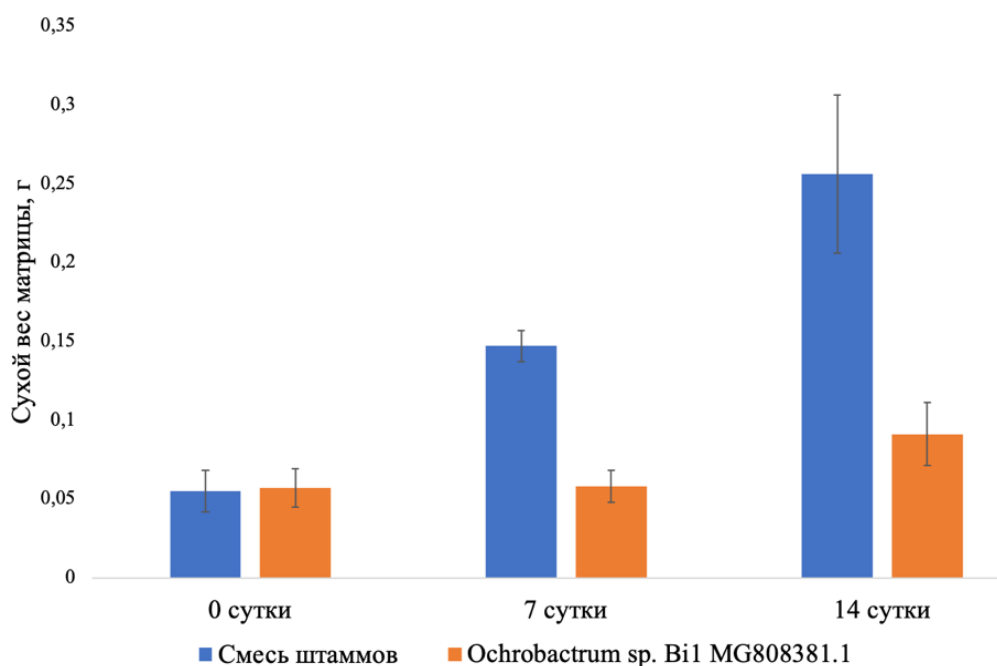


Рисунок 47. Сухой вес матриц с иммобилизованными на них клетками *Ochrobactrum* sp. Bi1, а также смешанной культурой штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 в течение 14 суток.

Заселение матриц смесью штаммов происходит более эффективно, нежели монокультурой *Ochrobactrum* sp. Bi1. Для смешанной культуры максимальный прирост биомассы происходил к 14 суткам эксперимента. При этом, изменение сухого веса матриц коррелирует с изменением числа КОЕ (рис. 48). Максимальное число КОЕ в случае смешанной культуры штаммов достигалось к 14-м суткам эксперимента. Большая часть клеток смешанной культуры штаммов, образующихся в результате деления в течение 14 суток эксперимента остаются жизнеспособными, о чем свидетельствует окрашивание с помощью ИНТ (рис. 49), что может косвенно указывать на наличие гомеостаза в структуре сорбента, что поддерживает жизнеспособность клеток на высоком уровне.

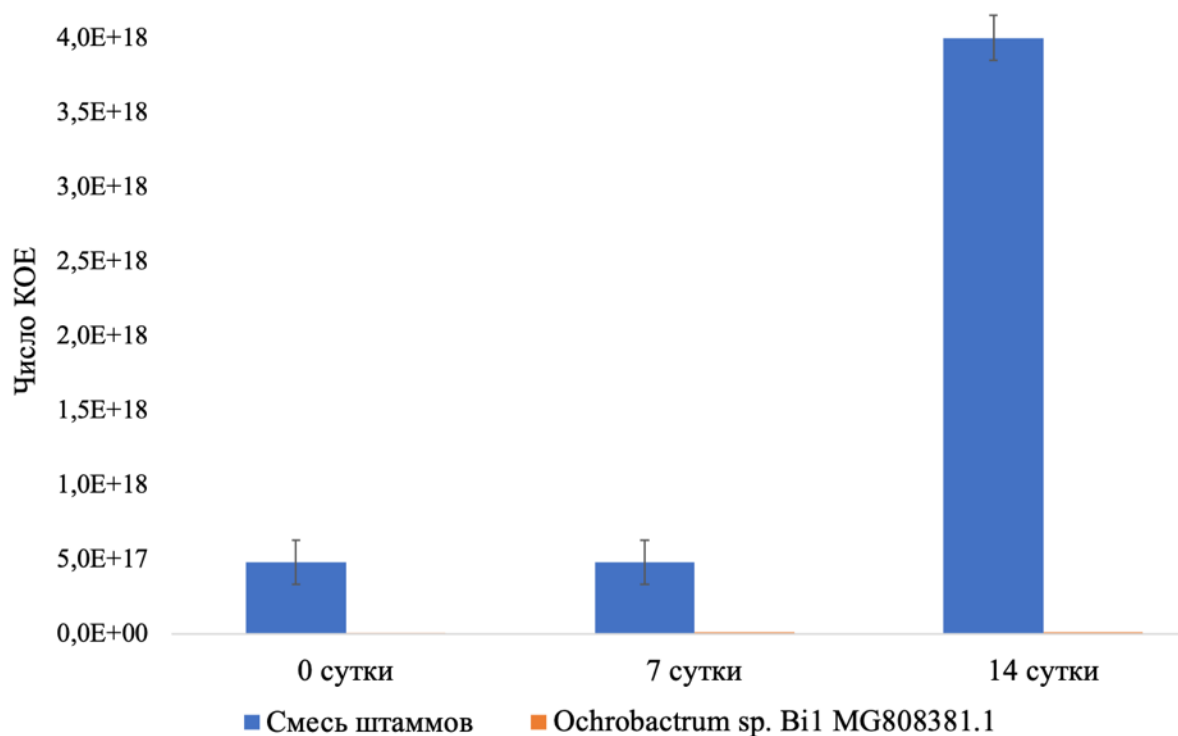


Рисунок 48. Число КОЕ *Ochrobactrum sp. Bi1*, а также смешанной культуры штаммов *Ochrobactrum sp. Bi1* и *Deinococcus sp. Bi7* в течение 14 суток.

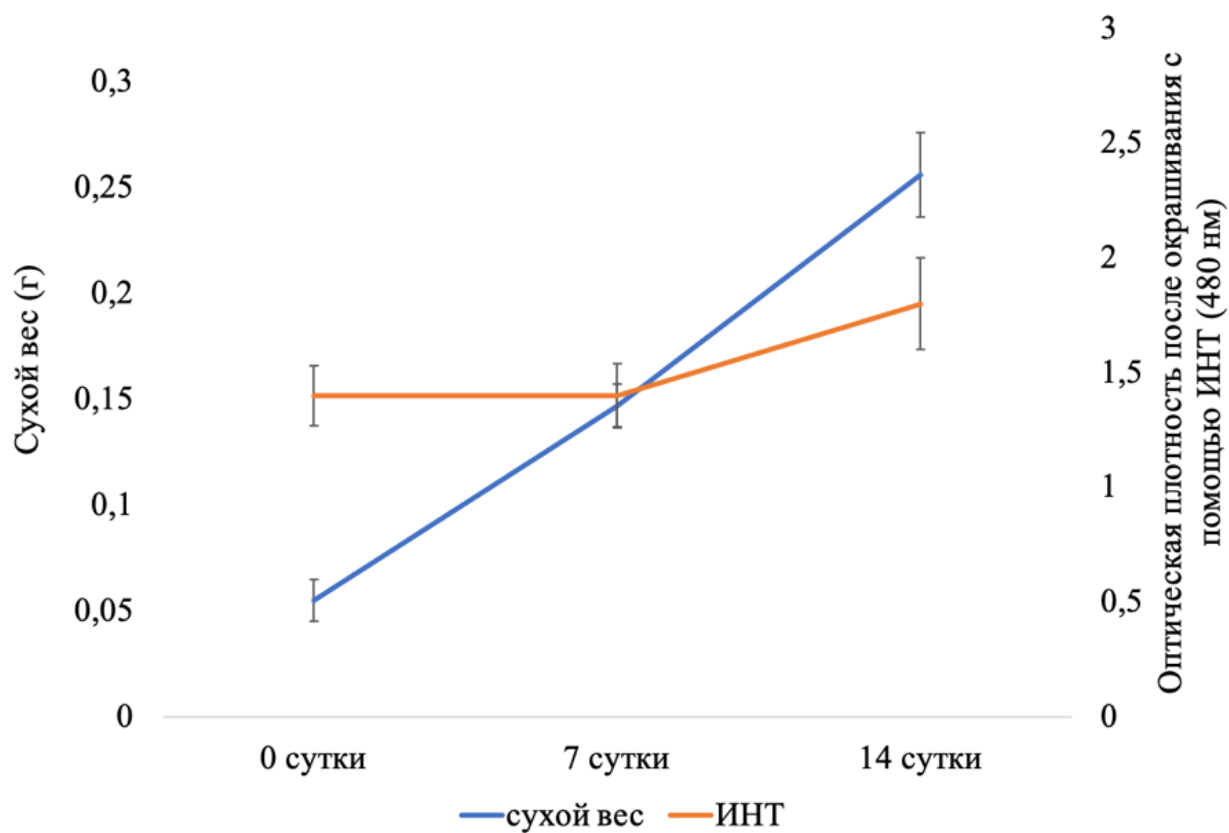


Рисунок 49. Корреляция между приростом биомассы смешанной культуры штаммов, определенного с помощью измерения сухого веса и числом живых клеток, определённых с помощью окрашивания с использованием красителя ИНТ.

В виду того, что штаммы *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 были выбраны для визуализации процесса иммобилизации смешанной культурой штаммов УОБ полимерного материала и показали стабильность присутствия клеток обоих штаммов в составе наполнителя в течение длительного периода мы сравнили процесс деградации модельной смеси УВ моно и смешанной культурой данными штаммами бактерий.

Следует отметить, что штаммы *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 проявляет сходную активность в процессах биodeградации н-алканов. Деградация алканов монокультурами *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 составляла от 43% для октадекана до 75% для пентадекана. Триметилбензол деградирует только *Ochrobactrum* sp. Bi1 (степень биodeградации составила 75%). Однако, штамм *Deinococcus* sp. Bi7 показал самый высокий ИЭ нефти, что свидетельствует о синтезе ПАВов, и может существенно изменить эффективность деградации УВ смешанной культурой (раздел 3.6.).

3.10. Биodeградация модельной смеси углеводородов смешанной культурой штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 в составе полимерного материала (СПАН - свекольный жом)

Результаты процесса биodeградации УВ модельной смеси биополимерным материалом на основе СПАН - свекольный жом - *Ochrobactrum* sp. Bi1 и СПАН - свекольный жом – смешанная культура штаммов бактерий *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 представлены на рисунках 50 и 51.

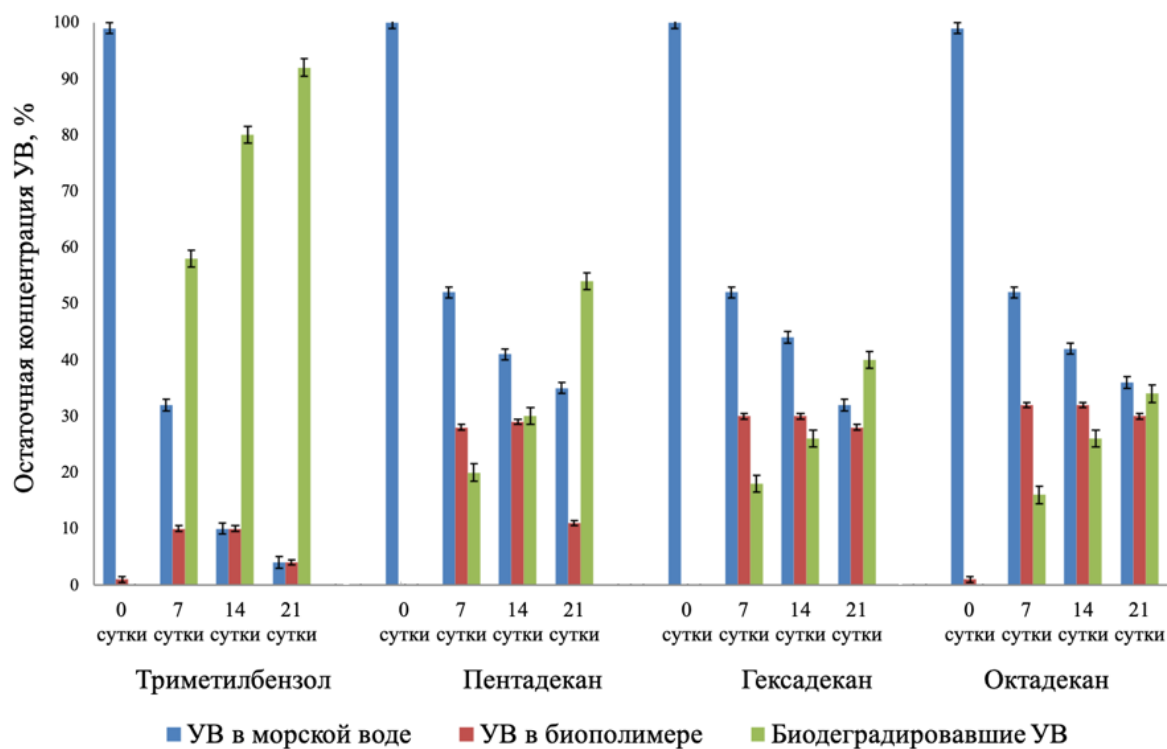


Рисунок 50. Биодергазация углеводородов модельной смеси №1 биополимером на основе СПАН-свекольный жом 25%, *Ochrobactrum* sp. Bi1.

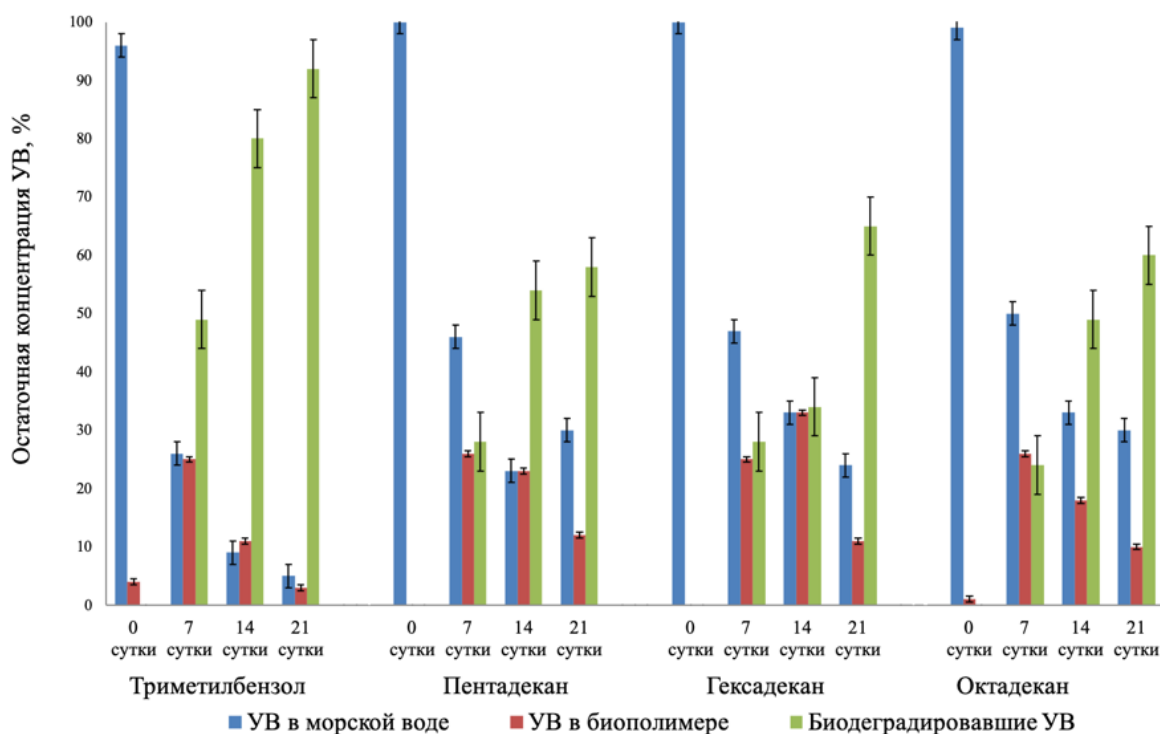


Рисунок 51. Биодергазация углеводородов модельной смеси №1 биополимером на основе СПАН-свекольный жом 25% + смешанная культура *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7.

Как видно на рисунке 50, СПАН-монокультура *Ochrobactrum* sp. Bi1 проявляет высокую активность в процессе биodeградации триметилбензола. Степень его биodeградации составила около 60% на 7-й день, выше 80% на 14-й день и 93% на 21-й день. Биodeградация н-алканов биополимером составляла около 20% на 7-й день, около 30% на 14 день, и 55% для н-пентадекана и около 40% для н-гексадекана и н-октадекана на 21 день (с учетом углеводов, находящихся в матрице биополимера). Концентрация н-алканов в морской воде составляла около 50% от начальной концентрации на 7-й день, около 40% на 14 сутки и немного выше 30% на 21 сутки.

Биополимер на основе смешанной культуры штаммов УОБ проявлял аналогичную активность при биodeградации триметилбензола и более высокую активности в отношении биodeградации н-алканов (рис. 51). Таким образом, степень биodeградации триметилбензола составила почти 50% на 7-й день, - более 80% на 14-й день и 93% на 21-й день. Биodeградация н-алканов при этом на 7 сутки составляла 30%, около 50% на 14 сутки и более 60% на 21 сутки (с учетом УВ, находящихся в матрице биополимера). Концентрация н-алканов в морской воде составляли около 45% от начальной концентрации на 7-й день, около 30% на 14 сутки и около 5% на 21 сутки.

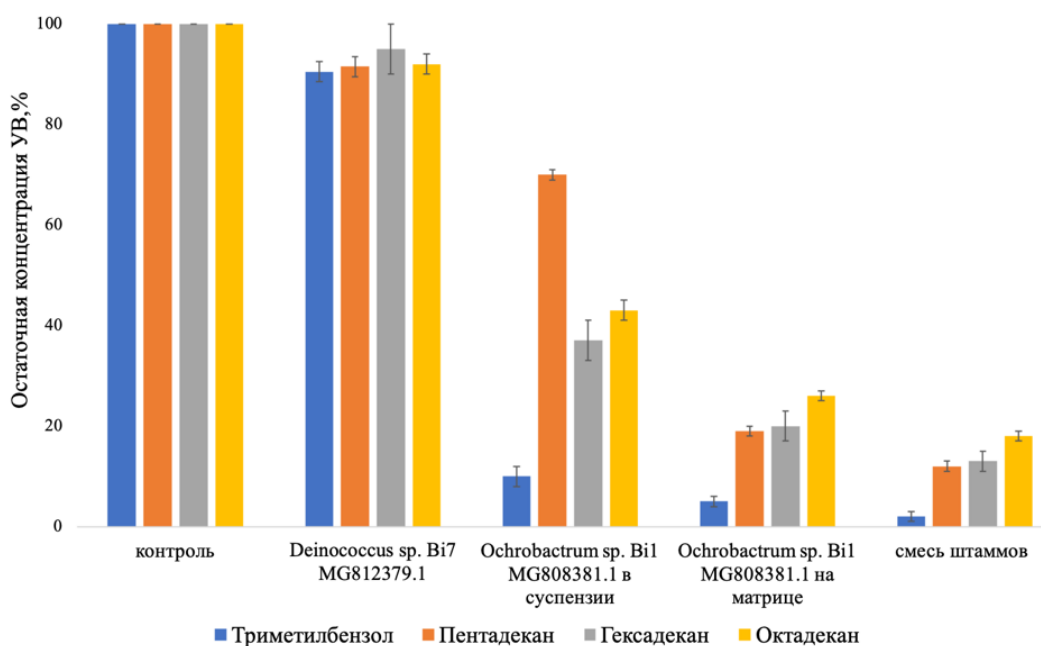


Рисунок 52. Остаточная концентрация УВ модельной смеси в среде после 14-ти суток в суспензии штаммов УОБ, биополимера на основе СПАН-свекольный жом 25% + монокультуры *Ochrobactrum* sp. Bi1 и биополимера на основе СПАН-свекольный жом 25% + смешанная культура *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7.

Как видно, бактерии в составе биополимерного материала (рис. 52), будучи инкорпорированы в структуры полимера и биопленки, способны более эффективно деградировать высокотоксичные ароматические соединения, чем свободноживущие бактерии. При этом важно отметить, что при иммобилизации в матрице полимерного материала смешанной культуры, деградация УВ возрастает, что может быть связано с синергидным эффектом штаммов и высокой эмульгирующей активностью штамма *Deinococcus* sp. Vi7. Таким образом, синтезированные биополимеры материалы, показали высокую активность в очистке искусственной морской воды, загрязненной УВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые НП авиационное топливо ТС-1 и бензин АИ-95 содержат микрофлоркулы гетерогенных микробных биопленок, в которых клетки УОБ интегрированы во внеклеточный полимерный матрикс, содержащий кислые полисахариды. Из НП выделены и идентифицированы по гену *16S rRNA* четырнадцать бактериальных штаммов УОБ. Топливо ТС-1 характеризовалось бактериальным сообществом, включающим роды: *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Deinococcus*, тогда как бактериальное сообщество бензина АИ-95, включало бактерии только двух родов: *Bacillus* и *Paenibacillus*. Бактерии рода *Deinococcus*, способные расти на УВ, впервые выделены из НП. Выделенные из бензина штаммы *B. safensis* Bi13 и *Bacillus* sp. Bi14 оказались наиболее эффективным биодеструкторами н-алканов, изо-алканов, циклоалканов, алкенов и ароматических УВ. Штамм *R. erythropolis* Bi6, выделенный из топлива ТС-1 – н-алканов и триметилбензола.

Проведенный анализ микробиома УОБ изученных НП показал, что в разных видах топлива формируются специфические сообщества УОБ, одни представители которых более проявляют способность к синтезу биоПАВов различной природы, либо могут продуцировать вещества, обладающие эмульгирующей активностью, либо имеют показатели гидрофобности клеточной стенки значительно выше среднего уровня, что характерно, например, для штаммов *B. safensis* Bi13, *B. pumilus* Bi12 и *Deinococcus* sp. Bi7, *A. faecalis* Bi3. Другие же компоненты сообществ УОБ топлива способны активно метаболизировать различные фракции УВ. При этом состав активных деструкторов УВ таких сообществ зависит от качественного состава НП. Об этом свидетельствует способность таких штаммов, как *R. erythropolis* Bi6, *Bacillus* sp. Bi14 и *S. mizutaii* Bi9 к использованию в процессе роста как н-алканов и ароматических УВ, так и их модельных смесей, а также нефти и НП.

Если сопоставить данные по измерению показателей ПН, ЭА и гидрофобности (рис. 23) с субстратной специфичностью штаммов [табл. 14, 15], можно отметить, что для штамма *Sphingobacterium* sp. Bi8 наблюдается корреляция между использованием различных видов субстратов и образованием ПАВов, которая у данного штамма выражена больше, чем у остальных. Штамм *S. multivorum* Bi2 также выделяет большое количество ПАВов, но при этом обладает средней

способностью к деградации субстратов. А штамм *R. erythropolis* Bi6 успешно деградирует НП, но при этом образует незначительное количество, определяемых использованными методами, экзо- и эндоПАВов.

Кроме того, согласно данным по деградации модельной смеси УВ штаммы *R. erythropolis* Bi6, *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8. были отнесены к группе универсально активных штаммов. Однако, по сумме полученных данных штамм *S. multivorum* Bi2, единственный штамм, который и по показателям ЭА и способности образовывать ПАВы, подтверждает свое положение в данной категории.

Известно, что наиболее полно деградация УВ происходит не отдельным видом микроорганизма, а гетерогенным сообществом УОМ [Dhar et al., 2014] состоящим не только из прокариотных, но и эукариотных микроорганизмов. Это связано с тем, что деградацию таких сложных субстратов как нефть и НП отдельные микроорганизмы способны осуществлять с достаточно низкой эффективностью. Как правило, происходит их кооперация в гетерогенные сообщества по типу синтрофии. Структурированная ассоциация УОМ позволяет увеличить эффективность и глубину разложения компонентов смесей УВ, НП или нефти. В нашей работе продемонстрировано, что наиболее эффективные деструкторы НП среди выделенных штаммов микромицетов в своей биомассе содержат некультивируемые формы бактерий. То есть, в образце поврежденного авиационного топлива ТС-1 формируется сложное сообщество УОМ включающее культивируемые формы бактерий, микромицеты и некультивируемые формы бактерий, связанные с мицелием грибов. Следует учитывать, что состав некультивируемых форм бактерий видоспецифичен для каждого штамма микромицета.

В неблагоприятных условиях микроорганизмы развиваются в виде биопленок [Николаев, Плакунов, 2007; Новевникова и др., 2015, Пиневич, 2018], в которых клетки микроорганизмов интегрированы и защищены от стрессовых воздействий окружающей среды внеклеточным полимерным матриксом [Смирнова и др., 2010, Стрелкова и др., 2013]. Стратегия развития микробных сообществ в агрессивной среде НП состоит не только в кооперации микроорганизмов, но и формировании морфологической структуры, обеспечивающей их выживания и поддержании гомеостаз для сообщества в целом. Нами отмечено формирование биопленок УОМ

в изученных образцах топлива и при иммобилизации смешанной культуры штаммов *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 в полимерном нетканом материале в присутствии модельной смеси УВ. При этом, в смешанной культуре УОБ *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 наблюдается значительно более эффективный прирост биомассы и поддерживается жизнеспособность бактерий, чем при планктонном росте. Рост значений биомассы в смешанной и монокультуре УОБ в иммобилизованном состоянии по сравнению с их ростом в планктонном состоянии, также может быть связан с интенсивным синтезом внеклеточного полимерного матрикса биопленки. Биоконпозиты, синтезированные на основе этих материалов, проявляют высокую активность при биодеградаци УВ различных классов в водно–органических смесях до углекислого газа и воды. Такие материалы в дальнейшем могут стать основой для создания полностью безотходных и безопасных технологий для очистки водоемов и сточных вод предприятий нефтегазового сектора от нефтезагрязнений.

ВЫВОДЫ

- 1) Из образцов исследованного топлива выделено и идентифицировано 19 штаммов микроорганизмов, 13 из которых относятся к эубактериям, а 6 к мицелиальным грибам. Культивируемое микробное сообщество реактивного топлива ТС-1 представлено 6 штаммами микромицетов, относящиеся к анаморфам аскомицетов и 9 штаммами бактерий. Сообщество УОБ бензина АИ-95 представлено 4 штаммами грамположительных бактерий. Впервые из нефтепродуктов выделены и описаны УОБ относящиеся к р. *Deinococcus*.
- 2) Сообщества УОБ топлив представлены как штаммами бактерий универсальных деструкторов УВ, так и потенциальных деструкторов, способны к синтезу различных ПАВов. При этом штаммы *Deinococcus* sp. Bi7 и *A. faecalis* Bi3, отнесенные к группе потенциальных деструкторов УВ, осуществляли максимальные изменения физико-химических параметров среды культивирования, а штаммы *R. erythropolis* Bi6, *S. mizutaii* Bi9 и *Sphingobacterium* sp. Bi8, относящиеся к группе активных деструкторов - наименьшую.
- 3) Выделенные штаммы УОБ, существенно различались по наличию исследованных генов деградации н-алканов. Штаммы *R. erythropolis* Bi6, *Rhodococcus* sp. Bi4 и *A. faecalis* Bi3 содержали 4 гена деградации н-алканов - *alkB*, *Cyp153*, *Alk1* и *Alk3*. Штамм *Deinococcus* sp. Bi7, выделенный из топлива ТС-1, так же, как и 3 штамма УОБ, выделенные из бензина АИ-95, кроме *P. agaridevorans* Bi11, не содержат исследуемые гены. Остальные штаммы (*Sphingobacterium multivorum* Bi2, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Sphingobacterium* sp. Bi8, *Sphingobacterium mizutaii* Bi9, *Rhodococcus* sp. Bi10), выделенные из топлива ТС-1 содержали как минимум один из изученных генов синтеза биоПАВов.
- 4) Впервые показано, что в составе биомассы мицелия штаммов микромицетов, способных к росту на топливе, присутствуют некультивируемые формы бактерий.
- 5) УОБ инкорпорированные в составе нетканой полимерной матрицы в составе биокomпозитных материалов как в моно-, так и в смешанной культурах способны более эффективно деградировать УВ, чем в планктонной форме.
- 6) Методами СЭМ и цитохимии показано, что как монокультуры, так и смешанные культуры УОБ активно заселяют как поверхности волокон нетканого

полимерного материала, формируя биопленки, так и межволоконного пространства, образуя флоккулы. В составе биопленок клетки бактерий инкорпорированы во внеклеточном полимерном матриксе, содержащем кислые полисахариды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев, С. В., Ивлиев, С. А., Киселева, А. С., Топилин, Н. Г. Сорбент для очистки поверхностей от нефти и нефтепродуктов и способ очистки с использованием сорбента. – 2013.
2. Алтынов А. А. Расчетные способы определения низкотемпературных свойств дизельных топлив. – 2016.
3. Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* (обзор) // Прикл. Биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 2. – С. 122-131.
4. Болтовский В. С. Оценка сырьевой базы Республики Беларусь для гидролизного производства и потребности в получаемой продукции. – 2020.
5. Борзенков И. А. Использование микроорганизмов при ликвидации нефтяных загрязнений почв // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: тез. докл. междунар. конф., Москва, 17-19 мая 1994 г. М., 1994. – С. 14-15.
6. Васильева А. А., Чекунова Л. Н., Полякова А. В. Влияние температуры на рост и жизнеспособность *Hormoconis resinae* и *Phialophora sp.*, развивающихся в авиационном топливе // Микология и фитопатология. Том 43, вып. 4, 2009. – С. 312-316.
7. Ветрова А. А. Биodeградация углеводов нефти плазмидо содержащими микроорганизмами-деструкторами //автореф. Дис.... К-та. Биол. Наук: 03.01. 06. – 2010.
8. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е., Пуптус И.Ф., Воронин А.М. Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биodeградации // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2008. – № 2. – С. 186-193.
9. Вишняков Д.Я., Новоселов А.Л., Авраменко А.А., Загвоздкин В.К., Заикин И.А. Экономический анализ методов ликвидации последствий аварийных разливов нефти // Экология и промышленность России. – 2005, июнь. – С. 42 - 45.

10. Волченко Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: Дис. ... канд. Биол. Наук. – Краснодар, 2006. – 148 с.
11. Гоголева О. А., Немцева Н. В. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем //Бюллетень Оренбургского научного центра урo РАН. – 2012. – №. 2.
12. Григорян М. Межмолекулярные взаимодействия в системе вода-акриламид-поверхностно-активное вещество //Журнал физической химии. – 2004. – Т. 78. – №. 4. – С. 651-655.
13. Дегтярева И. А., Давлетшина А. Я., Мотина Т. Ю. Ремедиация нефтезагрязненных почв с использованием наносорбента и консорциума аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов // Исследования в области нанобиотехнологий в сельском хозяйстве и международное сотрудничество с социалистической республикой вьетнам. – 2017. – С. 161-195.
14. Делеган Я. А., Филонов А. Е. Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводородов нефти: свойства и перспективы //Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. – 2016. – С. 131-134.
15. Дж Х. Определитель бактерий Берджи //М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.
16. Евдокимова Г. А., Месяц С. П., Мозгова Н. П. Пути биodeградации нефти в водоемах высоких широт. // Тез. докл. конф. «Интродукция микроорганизмов в окружающую среду». М.: ПНЦ РАН, 1994. – С.33-34.
17. Ермоленко З. М., Холоденко В. П., Чугунов В. А. и др. Биологическая характеристика штамма микобактерий, выделенного из нефти Ухтинского месторождения // Микробиология. 1997. - Т.66. – № 5. – С. 650-654.
18. Журина М. В., Стрелкова Е. А., Плакунов В. К., Беляев С. С. Влияние состава реконструированных биопленок на активность парафинокисляющих бактерий //Микробиология. – 2008. – Т. 77. – №. 5. – С. 701-703.
19. Журина М. В., Воронина Н. А., Безрукова Е. А., Лебедева И. В., Плакунов В. К. Зависимость способности микроорганизмов к окислению парафинов от состава реконструированных биопленок //Международная научная

- конференция «Микроорганизмы и биосфера». Тезисы докладов. Москва, 19-20 ноября. – 2007. – С. 46.
20. Заболотских В. В., Танких С. Н., Васильев А. В. Технологические подходы к детоксикации и биовосстановлению нефтезагрязнённых земель //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2018. – Т. 20. – №. 5-3.
21. Иванова А. Е., Сухачева М. В., Канатьева А. Ю., Кравченко И. К., Курганов А. А. Углеродородокисляющий потенциал и гены биодеградации n-алканов новой ацидофильной ассоциации микобактерий из серных карт //Микробиология. – 2014. – Т. 83. – №. 6. – С. 667-667.
22. Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития //Генетика. – 2004. – Т. 40. – №. 11. – С. 1445-1456.
23. Каримова С.А. Коррозия - главный враг авиации //Наука и жизнь. 2007. №6. С. 63-65.
24. Кашеева П. Б. Создание новых функциональных материалов для очистки водных сред от нефти и нефтепродуктов: дис. – Рос. Гос. Ун-т нефти и газа им. ИМ Губкина, 2015.
25. Квасников Е. И., Ключникова Т. М. Микроорганизмы деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова думка, 1981. – 132 с.
26. Кондратюк Т. А., Харкевич Е. С., Захарченко В. А., Наконечная Л. Т., Рой А. А., Жданова Н. Н., Пашкевич Р. Е. Биоповреждение авиационного топлива *ts-i* микроскопическими грибами //Микология и фитопатология. – 2007. – Т. 41. – №. 5. – С. 442-448.
27. Корженевская Т. Г., Запольнова И. Б., Гусев М. В. Роль микроорганизмов в преобразовании состава нефти и нефтяных биотехнологиях //Геология, методы поисков, разведки и оценки месторождений топливно-энергетического сырья/Акционер. О-во закрытого типа «Геоинформарк». – 2002.
28. Коронелли Т. В. Липиды сапрофитных микобактерий: Автореф. Дис. ... д-ра биол. Наук. – Москва, 1980. – 49 с.

29. Коронелли Т. В. Поступление углеводов в клетки микроорганизмов // Усп. Микробиологии. – 1996. – № 6. – С. 579-585.
30. Коронелли Т. В., Нестерова Е. Д. Экологическая стратегия бактерий, использующих гидрофобный субстрат // Микробиология. – 1990. – Т. 59. – № 6. – С. 993-997.
31. Коронелли Т.В., Калюжная Т.В. Изменение ультраструктуры клеток сапротрофных микобактерий под влиянием изониазида // Микробиология. – 1983. – Т.2. – С. 5.
32. Коронелли Т.В., Поршнева О.В. Липиды R- и S-вариантов *Rhodococcus erythropolis* // Микробиология. – 1995. – Т.6. – С. 4.
33. Коршунова А. В., Турова Т. П., Шестакова Н. М., Михайлова Е. М., Полтараус А. Б., Назина Т. Н. Детекция и транскрипция генов биodeградации n-алканов [alkb] в геноме углеводородокисляющей бактерии *Geobacillus subterraneus* K //Микробиология. – 2011. – Т. 80. – №. 5. – С. 669-678.
34. Коршунова Т. Ю., Четвериков С. П., Бакаева М. Д., Кузина Е. В., Рафикова Г. Ф., Четверикова Д. В., Логинов О. Н. Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения (обзор) //Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №. 4. – С. 338-349.
35. Коршунова Т. Ю., Четвериков С. П., Мухаматдьярова С. Р., Логинов О. Н. Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15. – №. 3-5. – С. 1637-1640.
36. Кривушина А. А., Чекунова Л. Н., Мокиева В. Л., Полякова А. В. Изучение микромицетов, обнаруженных в топливных баках эксплуатирующихся самолетов //Микология и фитопатология. – 2016. – Т. 50. – №. 2. – С. 108-114
37. Кривушина А. А. Микромицеты в авиационном топливе: дис. – Московский государственный университет им. МВ Ломоносова (МГУ). Биологический факультет, 2012.
38. Кураков А. В., Садчиков А. П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – 2006.

39. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А. Саморегенерирующие сорбенты для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – №9 (1). – С. 104-117.
40. Лыонг Т. М., Нечаева И. А., Петриков К. В., Филонов А. Е., Понаморева О. Н. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7. – №. 2 (21).
41. Лысак Л. В., Скворцова И. Н., Добровольская Т. Г. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. – МАКС пресс, 2003.
42. Матвеева Е. Л., Васильченко О. А., Демянко Д. А. Микробиологическое поражение авиационных топлив // Системи озброєння і військова техніка. – 2011. – №. 2. – С. 152-156.
43. Миронов О. Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря // Морской экологический журнал. – 2002. – № 1. – Т. 1. – С. 56-66.
44. Назина Т. Н., Соколова Д. Ш., Григорьян А. А., Сюэ Я.-Ф., Беляев С. С., Иванов М. В. Образование нефтewытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 2. – С. 206-211.
45. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии: учеб. Пособие для студ. Высш. Учеб. Заведений. (Под ред. А.И. Нетрусова). М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
46. Никовская Г. Н., Гордиенко А. С., Глоба Л. И. Гидрофильно-гидрофобные свойства микроорганизмов при различных условиях культивирования // Микробиология. – 1989. – Т. 58. – № 3. – С. 448-451.
47. Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Биопленка–“город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – №. 2. – С. 149-163.

48. Ножевникова А. Н., Бочкова Е. А., Плакунов В. К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии //Микробиология. – 2015. – Т. 84. – №. 6. – С. 623-623.
49. Омарова Е. О., Лобакова Е. С., Дольникова Г. А., Некрасова В. В., Идиатулов Р. К., Кашеева П. Б., Дедов А. Г. Иммобилизация бактерий на полимерных матрицах для деградации нефти и нефтепродуктов //Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2012. – №. 1.
50. Пиневиц А. В., Коженкова Е.В., Аверина С.Г. Биопленки и другие прокариотные консорциумы. СПб: Химиздат. – 2018. – 264 с.
51. Плакунов В. К., Журина М. В., Беляев С. С. Устойчивость нефтеокисляющего микроорганизма, *Dietzia* sp. К гиперосмотическому шоку в реконструированных биопленках //Микробиология. – 2008. – Т. 77. – №. 5. – С. 581-589.
52. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязнённой почвы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – №. 4. – С. 430-437.
53. Пучкова Т. А. Электронный учебно-методический комплекс по учебной дисциплине Биотехнология очистки промышленных отходов. УД-644. – 2017.
54. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Ленинград: Наука, 1974. – 193 с.
55. Рубцова Е.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние условия культивирования на адгезию родококков в отношении к н-гексадекану // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т.48. – №.5. – С. 9.
56. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практ. Пособие / под ред. Н. С. Егорова. 2-е изд. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1983. – 251 с.
57. Сазыкин И. С., Сазыкина М. А., Чистяков В. А. Разложение нефти микроорганизмами. Экологические аспекты // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2009. – № 6. – С. 88-92.
58. Серебренникова М. К., Головина Е. Э., Куюкина М. С., Ившина И. Б. Консорциум иммобилизованных родококков для очистки нефтепромысловой

- воды в колоночном биореакторе // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 53. – №. 4. – С. 380-386.
59. Сианавати Э., Реймонд Д. Б. Микробицидная композиция. – 2017.
60. Смирнова Л.Л. Комплексы гетеротрофных микроорганизмов прибрежного мелководья бухты Казачья (Черное море) //Морской экологический журнал. – 2010. – Т. IX. – № 2.– С. 81 – 88.
61. Сопрунова О. Б. Функционирование цианобактериальных сообществ в условиях техногенных экосистем //Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2006. – №. 2. – С. 42d-42.
62. Стрелкова Е. А., Позднякова Н. В., Журина М. В., Плакунов В. К., Беляев С. С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды //Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №. 2. – С. 131-131.
63. Сулова М. Ю., Липко И. А., Мамаева Е. В., Парфенова В. В. Разнообразие культивируемых бактерий, выделенных из водной толщи и донных осадков шельфа Карского моря // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 524-531.
64. Тимергазина И. Ф., Переходова Л. С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами //Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2012. – Т. 7. – №. 1. – С. 15-15.
65. Турова Т. П., Соколова Д. Ш., Семенова Е. М., Полтараус А. Б., Назина Т. Н. Разнообразие генов биodeградации n-алканов alkB у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *geobacillus*, *parageobacillus* и *aeribacillus* // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – № 3. – С. 225-232.
66. Федоренко В. Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей: дис. – М., 2016.
67. Шапиро Т. Н., Дольникова Г. А., Немцева Н. В., Санджиева Д. А., Лобакова Е. С. Идентификация и физиологическая характеристика консорциума углеводород окисляющих бактерий нефти и нефтепродуктов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – №. 4. – С. 107-113.

68. Иванова Е. А., Лобакова Е. С., Идиатулов, Р. К., Шапиро Т. Н., Санджиева Д. А., Кузнецова О. В., Дедов А. Г. Биокomпозитные материалы для очистки водных сред, загрязненных углеводородами //Нефтехимия. – 2019. – Т. 59. – №. 3. – С. 297-303
69. Шапиро Т. Н., Лобакова Е. С., Дольникова Г. А., Иванова Е. А., Санджиева Д. А., Бурова А. А., Джабраилова Х. С., Дедов А. Г. Сообщества углеводородокисляющих бактерий нефтепродуктов на примере авиационного топлива ТС-1 и автомобильного бензина АИ-95 // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, – №. 1. – С. 41-55.
70. Шахова Н.Е., Семилетов И.П. Метан в морях Восточной Арктики: избранные результаты исследования (1994 – 2014). Проект «Поисковые и фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации на 2014 год».
71. Щукин Е. Д., Перцов А. В., Амелина Е. А. Коллоидная химия: Учебник для студентов вузов. — М.: Высшая школа, 2006. — С. 444.
72. Янкевич М. И., Хадеева В. В., Мурыгина В. П. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра //Биосфера. – 2015. – Т. 7. – №. 2.
73. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria //Applied biochemistry and biotechnology. – 2015. – Т. 176. – №. 3. – P. 670-699.
74. Adebuseye S. A. Et al. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream //World journal of Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 23. – №. 8. – P. 1149-1159.
75. Al-Hawash A. B., Dragh M. A., Li S., Alhujaily A., Abbood H. A., Zhang X., Ma F. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment //The Egyptian Journal of Aquatic Research. – 2018. – V. 44. – №. 2. – P. 71-76.
76. Al-Tae A. M., Alkanany F. N., Gmais S. A., Alshawi H. A. Biodegradation of Aliphatic Hydrocarbons by Bacteria Isolated from Khor Al-Zubair Channel, Southern Iraq //International Journal of Marine Science. – 2017. – V. 7.

77. Alkhatib M. A. F., Alam Z., Muyibi S. A., Husain A. F. An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation //African Journal of Biotechnology. – 2011. – V. 10. – №. 81. – P. 18763-18767.
78. Altschul S. F. Et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs //Nucleic acids research. – 1997. – V. 25. – №. 17. – 3. 3389-3402.
79. Alvarez H. M. Relationship between β -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria //International biodeterioration & biodegradation. – 2003. – V. 52. – №. 1. – 3. 35-42.
80. Alvarez H. M., Silva R. A. Metabolic diversity and flexibility for hydrocarbon biodegradation by *Rhodococcus* //Actinobacteria. Application in Bioremediation and Production of Industrial Enzymes. CRC Press, London, New York. – 2013. – 3. 241-273.
81. Alvarez H.M., Silva R.A., Cesari A.C., Zamit A.L., Peressutti S.R., Reichelt R., Keller U. Physiological and morphological responses of the soil bacterium *Rhodococcus opacus* strain PD630 to water stress // FEMS Microbiol Ecol. – 2004. – V .50. – №.2. – P. 75-86.
82. Alvarez P. J., Vogel T. M. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries //Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – V. 57. – №. 10. – P. 2981-2985.
83. Amani H. Evaluation of biosurfactants and surfactants for crude oil contaminated sand washing //Petroleum Science and Technology. – 2015. – V. 33. – №. 5. – P. 510-519.
84. Amani H., Muller M.M., Sylatk C., Hausmann R. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery // Appl Biochem Biotechnol, – 2013. –V.170. – №.5. –P. 1080-1093.
85. Amani H., Mehrnia M. R., Sarrafzadeh M. H., Haghighi M., Soudi M. R. Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery //Applied biochemistry and biotechnology. – 2010. – V. 162. – №. 2. – P. 510-523
86. Amund O. O., Nwokoye N. Hydrocarbon degradation potentials of yeast isolates from a polluted lagoon. – 1993.

87. Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M., van Beilen J.B., Cavalca L. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN // *Environ. Microbiol.* – 2000. V. 2. – P. 572-577.
88. Atlas R. M. Effects of hydrocarbons on microorganisms and petroleum biodegradation in arctic ecosystems // *Petroleum effects in the arctic environment.* – 1985. – P. 63-100.
89. Atlas R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective // *Microbiological reviews.* – 1981. – V. 45. – №. 1. – P. 180.
90. Atlas R. M. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* – 1991. – V. 52. – №. 2. – P. 149-156.
91. Atlas R. M., Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation // *Advances in microbial ecology.* – Springer, Boston, MA, 1992. – P. 287-338.
92. Atlas R., Bragg J. Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience // *Microbial biotechnology.* – 2009. – V. 2. – №. 2. – P. 213-221.
93. Balachandran C., Duraipandiyan V., Balakrishna K., Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil // *Bioresource Technology.* – 2012. – V. 112. – P. 83-90.
94. Banat I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review // *Bioresource technology.* – 1995. – V. 51. – №. 1. – P. 1-12.
95. Baoune H., El Hadj-Khelil A.O., Pucci G., Sineli P., Loucif L., Polti M.A. Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria // *Ecotoxicology and environmental safety.* – 2018. – V. 147. – P. 602-609.
96. Barabás G., Vargha G., Szabó I. M., Penyige A., Damjanovich S., Szöllösi J., Szabó I. N-Alkane uptake and utilisation by *Streptomyces* strains // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2001. – V. 79. – №. 3-4. – P. 269-276.
97. Bartha R., Atlas R. M. The microbiology of aquatic oil spills // *Advances in Applied Microbiology.* – 1977. – V. 22. – P. 225-266.

98. Bartha R., Bossert I. The treatment and disposal of petroleum wastes. – 1984.
99. Bates S. T., Berg-Lyons D., Caporaso J. G., Walters W. A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil //The ISME journal. – 2011. – V. 5. – №. 5. – P. 908.
100. Batista S.B., Mounteer A.H., Amorim F.R., Tótola M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites // Bioresource Technology. – 2006. – V. 97. – № 6. – P. 868-875.
101. Batts B. D., Fathoni A. Z. A literature review on fuel stability studies with particular emphasis on diesel oil //Energy & Fuels. – 1991. – V. 5. – №. 1. – P. 2-21.
102. Beccati A., Gerken J., Quast C., Yilmaz P., Glöckner F.O. SILVA tree viewer: interactive web browsing of the SILVA phylogenetic guide trees //BMC bioinformatics. – 2017. – V. 18. – №. 1. – P. 1-4.
103. Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* //Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – V. 62. – №. 7. – P. 2554-2559.
104. Bezza F. A., Chirwa E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2 //Biochemical engineering journal. – 2015. – V. 101. – P. 168-178.
105. Bicca F.C., Ayub M.A. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis* // Revista de Microbiologia. – 1999. – V.30. – P. 6.
106. Binazadeh M., Karimi I. A., Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449 //Enzyme and Microbial Technology. – 2009. – V. 45. – №. 3. – P. 195-202.
107. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification //Canadian journal of biochemistry and physiology. – 1959. – V. 37. – №. 8. – P. 911-917.
108. Bødtker G., Hvidsten I. V., Barth T., Torsvik T. Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2009. – V. 96. – №. 4. – P. 459-469.

109. Boer W.D., Folman L.B., Summerbell R.C., Boddy L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development //FEMS microbiology reviews. – 2005. – V. 29. – №. 4. – P. 795-811.
110. Bogusławska-Wąs E., Dąbrowski W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon //International journal of hygiene and environmental health. – 2001. – V. 203. – №. 5-6. – P. 451-458.
111. Boonchan S., Britz M. L., Stanley G. A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures //Applied and environmental microbiology. – 2000. – V. 66. – №. 3. – P. 1007-1019.
112. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies //Bioresource technology. – 2000. – V. 74. – №. 1. – P. 63-67.
113. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.-Y., Vandecasteele J.-P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 86. P. 3842–3849.
114. Brinkmeyer R., Knittel K., Jürgens J., Weyland H., Amann R., Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus Antarctic pack ice // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – № 11. – P. 6610-6619.
115. Brooijmans R. J. W., Pastink M. I., Siezen R. J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew //Microbial biotechnology. – 2009. – V. 2. – №. 6. – P. 587-594.
116. Bücker F., Barbosa C. S., Quadros P. D., Bueno M. K., Fiori P., te Huang C., Bento F. M. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – V. 95. – P. 346-355.
117. Buddie A.G., Bridge P.D., Kelley J., Ryan M.J. *Candida keroseneae* sp. nov., a novel contaminant of aviation kerosene //Letters in applied microbiology. – 2011. – V. 52. – №. 1. – P. 70-75.
118. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications // BMC Bioinformatics. – 2009. – 10:421.

119. Campos A. C., Lemmers H., Bieler R. A. Ensaios realizados em derivados de petróleo: Significado e interpretação //Petróleo e Petroquímica. – 1974. – V. 16. – №. 17. – P. 12-14.
120. Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2008. Canada-wide Standard for Petroleum Hydrocarbon (PHC) in Soil. User Guidance. PN 1398. Canada.
121. Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health.
122. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E. K., Fierer N. Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data //Nature methods. – 2010. – V. 7. – №. 5. – P. 335-336.
123. Cappelletti M., Fedi S., Frascari D., Ohtake H., Turner R. J., Zannoni D. Analyses of both the alkb gene transcriptional start site and alkb promoter-inducing properties of Rhodococcus sp. Strain BCP1 grown on n-alkanes //Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – №. 5. – P. 1619-1627.
124. Cassidy M. B., Lee H., Trevors J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review //Journal of Industrial Microbiology. – 1996. – V. 16. – №. 2. – P. 79-101.
125. Cerniglia C. E., Gibson D. T., Van Baalen C. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae //Microbiology. – 1980. – V. 116. – №. 2. – P. 495-500.
126. Cerniglia C. E., Heitkamp M. A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment //Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. – 1989. – P. 41-68.
127. Chabukdhara M., Gupta S. K., Ansari F. A., Bajhaiya A. K., Kumar M. Bioremediation of Organic Xenobiotics from Wastewater //Microbial Biodegradation of Xenobiotic Compounds. – 2019. – P. 111.
128. Chaillan F., Le Flèche A., Bury E., Phantavong Y. H., Grimont P., Saliot A., Oudot J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms //Research in microbiology. – 2004. – V. 155. – №. 7. – P. 587-595.

129. Chaudhary D. K., Bajagain R., Jeong S. W., Kim J. Biodegradation of diesel oil and n-alkanes (C 18, C 20, and C 22) by a novel strain *Acinetobacter* sp. K-6 in unsaturated soil //Environmental Engineering Research. – 2020. – T. 25. – №. 3. – C. 290-298.
130. Chekanov K., Kublanovskaya A., Lobakova E. Eukaryotic sequences in the 16Sr RNA metagenomic dataset of algal–bacterial consortia of the White Sea coastal zone //Journal of Eukaryotic Microbiology. – 2019. – T. 66. – №. 5. – C. 853-856.
131. Chen A. J., Frisvad J. C., Sun B. D., Varga J., Kocsubé S., Dijksterhuis J., Kim D.H., Hong S.B., Houbraken J., Samson R. *Aspergillus* section *Nidulantes* [formerly *Emericella*]: polyphasic taxonomy, chemistry and biology //Studies in mycology. – 2016. – T. 84. – C. 1-118.
132. Colwell R. R., Walker J. D., Cooney J. J. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment //CRC critical reviews in microbiology. – 1977. – V. 5. – №. 4. – P. 423-445.
133. Cookson Jr, John T. Bioremediation engineering: Design and application. – McGraw-Hill, Inc., 1995. – P. 68–77.
134. Coon M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2005. – V. 45. – P. 1-25.
135. Cooney J. J. The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. – 1984.
136. Cooney J. J., Silver S. A., Beck E. A. Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes //Microbial ecology. – 1985. – V. 11. – №. 2. – P. 127-137.
137. Cooper D.G., Goldenberg G.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species //Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – № 2. – P. 224-229.
138. Cui J., Huang L., Wang W., Xu P., Zanaroli G., Tang H. Maximization of the petroleum biodegradation using a synthetic bacterial consortium based on minimal value algorithm //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2020. – V. 150. – P. 104964.
139. Cyplik P., Schmidt M., Szulc A., Marecik R., Lisiecki P., Heipieper H.J. Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions //Bioresource technology. – 2011. – V. 102. – №. 6. – P. 4347-4352.

140. Das K., Mukherjee A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India // *Bioresource technology*. – 2007. – V. 98. – №. 7. – P. 1339-1345.
141. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // *Biotechnology research international*. – 2011. – T. 2011.
142. Daugulis A. J., mccracken C. M. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp // *Biotechnology letters*. – 2003. – V. 25. – №. 17. – P. 1441-1444.
143. De Almeida D. G., da Silva M. D. G. C., do Nascimento Barbosa R., Silva D. D. S. P., da Silva R. O., de Souza Lima G. M., de Queiroz M. D. F. V. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2017. – V. 116. – P. 73-82.
144. De Boer W, Folman LB, Summerbell RC. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development // *FEMS microbiology reviews*. – 2005. – V. 29. – №. 4. – P. 795-811.
145. De Carvalho C. C. C. R., Wick L. Y., Heipieper H. J. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2009. – V. 82. – №. 2. – P. 311-320.
146. De Vasconcellos S. P., Angolini C. F. F., García I. N. S., Dellagnezze B. M., Da Silva C. C., Marsaioli A. J., De Oliveira V. M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs // *Organic Geochemistry*. – 2010. – V. 41. – №. 7. – P. 675-681.
147. Dedov A.G., Ivanova E.A., Sandzhieva D.A., Kashcheeva P.B., Buznik V.M., Lobakova E.S., Kirpichnikov M.P., Ishkov A.G. New materials and ecology: biocomposites for aquatic remediation // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. – 2017. – V. 51. – №. 4. – P. 617-630.

148. Deepika K. V., Sheela G. M., Bramhachari P. V. Marine Microbial Biosurfactants: Ecological and Environmental Applications //Environmental Biotechnology Vol. 3. – Springer, Cham, 2021. – P. 221-232.
149. Delean Y. A., Valentovich L. N., Shafieva S. M., Ganbarov K. G., Filonov A. E., Vainstein M. B. Recent Advanced Technologies for the Characterization of Xenobiotic-Degrading Microorganisms and Microbial Communities //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – V 9. – P. 31.
150. Dellagnezze B. M., de Sousa G. V., Martins L. L., Domingos D. F., Limache E. E., de Vasconcellos S. P., de Oliveira V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs //Marine pollution bulletin. – 2014. – V. 89. – №. 1-2. – P. 191-200.
151. Deppe U., Richnow H. H., Michaelis W., Antranikian G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium //Extremophiles. – 2005. – V. 9. – №. 6. – P. 461-470.
152. Deziel E., Lepine F., Milot S., Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids //Microbiology. – 2003. – V. 149. – №. 8. – P. 2005-2013.
153. Dhar K., Dutta S., Anwar M.N. Biodegradation of petroleum hydrocarbon by indigenous fungi isolated from ship breaking yards of Bangladesh //International Research Journal of Biological Sciences. – 2014. – V. 3. – №. 9. – P. 22-30.
154. Diestra E., Solé A., Martí M., De Oteyza T. G., Grimalt J. O., Esteve I. Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy //Scanning. – 2005. – V. 27. – №. 4. – P. 176-180.
155. Dombrowski N., Donaho J. A., Gutierrez T., Seitz K. W., Teske A. P., Baker B. J. Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill //Nature microbiology. – 2016. – V. 1. – №. 7. – P. 16057.
156. Dutta T.K., Harayama S. Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – №. 4. – P. 1970-1974.

157. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput //Nucleic acids research. – 2004. – V. 32. – №. 5. – P. 1792-1797.
158. Etoumi A. Microbial treatment of waxy crude oils for mitigation of wax precipitation //Journal of Petroleum Science and Engineering. – 2007. – V. 55. – №. 1-2. – P. 111-121.
159. Evans C. G. T., Herbert D., Tempest D. W. Chapter XIII the continuous cultivation of micro-organisms: 2. Construction of a chemostat //Methods in microbiology. – Academic Press, 1970. – V. 2. – P. 277-327.
160. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap //Evolution. – 1985. – V. 39. – №. 4. – P. 783-791.
161. Feng L., Wang W., Cheng J., Ren Y., Zhao G., Gao C., Wang L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – V. 104. – №. 13. – P. 5602-5607.
162. Ferradji F.Z., Mnif S., Badis A., Rebbani S., Fodil D., Eddouaouda K., Sayadi S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria) //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – V. 86. – P. 300-308.
163. Floodgate G.D. The fate of petroleum in marine ecosystems. / In: RM Atlas, Petroleum microbiology. New York: macmillan, 1984. – P. 355-397.
164. Foght J. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects //Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2008. – V. 15. – №. 2-3. – P. 93-120.
165. Foster R. C., Bowen G. D. Plant Surfaces and Bacterial Growth: The Rhizosphere and Rhizoplarze //Phytopathogenic Prokaryotes V1. – 2012. – V. 1. – P. 159.
166. Francy D.S., Thomas J.M., Raymond R.L., Ward. C.H. Emulsification of hydrocarbon by subsurface bacteria // Journal of Industrial Microbiology. –1991. – № 8. – P. 237-246.
167. Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., La Colla P., Tamburini E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains // FEMS Microbiol. Ecol. – 2008. – V. 63. – P. 283–248.

168. Funhoff E. G., Bauer U., García-Rubio I., Witholt B., van Beilen J. B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation //Journal of bacteriology. – 2006. – V. 188. – №. 14. – P. 5220-5227.
169. Gardner A. C., Williams G. R. The growth of *Pseudomonas putida* in fuel samples containing 2-methoxyethanol (2-ME) //INT. BIODETERIOR. BULL. – 1982. – V. 18. – №. 3. – P. 93-94.
170. Gassen J., Bento F. M., Frazzon A. P. G., Ferrão M. F., Marroni I. V., Simonetti A. B. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection //Brazilian Journal of Biology. – 2015. – V. 75. – №. 3. – P. 541-547.
171. Gaylarde C. C., Bento F. M., Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control //Revista de microbiologia. – 1999. – V. 30. – №. 1. – P. 01-10.
172. Gein S. V., Kochina O. A., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. Effects of Glycolipid Rhodococcus Biosurfactant on Innate and Adaptive Immunity Parameters In Vivo //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – V. 165. – №. 3. – P. 368-372.
173. Gerdes B., Brinkmeyer R., Dieckmann G., Helmke E. Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice // FEMS Microb. Ecol. – 2005. – V. 53. – №. 1. – P. 129-139.
174. Ghazali F. M., Rahman R. N. Z. A., Salleh A. B., Basri M. Effects of glycolipid Rhodococcus Biosurfactant on innate and adaptive immunity parameters in vivo //Bulletin of experimental biology and medicine. – 2018. – V. 165. – №. 3. – P. 368-372.
175. Ghiglione J.-F., Galand P.E., Pommier T., Pedrós-Alió C., Maas E.W., Bakker K., Bertilson S., Kirchman D.L., Lovejoy C., Yager P.L., Murray A.E. Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – V. 109. – P. 17633-17638.
176. Gorelova O. A., Kosevich I. A., Baulina O. I., Fedorenko T. A., Torshkoeva A. Z., Lobakova E. S. Associations between the White Sea invertebrates and oxygen-

- evolving phototrophic microorganisms //Moscow University biological sciences bulletin. – 2009. – V. 64. – №. 1. – P. 16-22.
177. Govarthanan M., Fuzisawa S., Hosogai T., Chang Y. C. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity //RSC advances. – 2017. – V. 7. – №. 34. – P. 20716-20723.
 178. Guarino C., Spada V., Sciarrillo R. Assessment of three approaches of bioremediation [Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation–Assistited Landfarming] for a petroleum hydrocarbons contaminated soil //Chemosphere. – 2017. – V. 170. – P. 10-16.
 179. Gupta A. K., Yunus M., Pandey P. Bioremediation: ecotechnology for the present century //Inter. Soc. Environ. Botanists Environnews. – 2003. – V. 9. – №. 2.
 180. Gürtler V., Seviour R. J. Systematics of members of the genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al. 1998 //Biology of *Rhodococcus*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 1-28.
 181. Habib S., Ahmad S. A., Wan Johari W. L., Shukor M. Y. A., Yasid N. A. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon in Antarctica by Microbial Species: An Overview //Pertanika Journal of Science & Technology. – 2018. – V. 26. – №. 1.
 182. Hackbusch S., Noirungsee N., Viamonte J., Sun X., Bubenheim P., Kostka J. E., Liese A. Influence of pressure and dispersant on oil biodegradation by a newly isolated *Rhodococcus* strain from deep-sea sediments of the Gulf of Mexico //Marine pollution bulletin. – 2020. – V. 150. – P. 110683.
 183. Hamamura N., Yeager C. M., Arp D. J. Two Distinct Monooxygenases for Alkane Oxidation in *inocardioides* sp. Strain CF8 //Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67. – №. 11. – P. 4992-4998.
 184. Handley K. M., Piceno Y. M., Hu P., Tom L. M., Mason O. U., Andersen G. L., Gilbert J. A. Metabolic and spatio-taxonomic response of uncultivated seafloor bacteria following the Deepwater Horizon oil spill //The ISME journal. – 2017. – V. 11. – №. 11. – P. 2569-2583.
 185. Harayama S., Kasai Y., Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater //Current opinion in biotechnology. – 2004. – V. 15. – №. 3. – P. 205-214.

186. Harding T., Jungblut A.D., Lovejoy C., Vincent W.F. Microbes in high arctic snow and implications for the cold biosphere // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – P. 3234-3243.
187. Harms H., Schlosser D., Wick L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals //Nature Reviews Microbiology. – 2011. – V. 9. – №. 3. – P. 177-192.
188. Hashem M., Alamri S. A., Al-Zomyh S. S., Alrumman S. A. Biodegradation and detoxification of aliphatic and aromatic hydrocarbons by new yeast strains //Ecotoxicology and environmental safety. – 2018. – V. 151. – P. 28-34.
189. Hedlund B.P., Geiselbrecht A.D., Bair T.J., Staley J.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. Nov., sp. Nov. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – № 1. – P. 251-259.
190. Heider J., Schühle K. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane //The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. – 2013. – P. 605-634.
191. Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Rüegg I., Bucheli-Witschel M., Springael D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site //Journal of microbiological methods. – 2006. – V. 64. – №. 2. – P. 250-265.
192. Herath H.M.L.I., Rajapaksha A.U., Vithanage M., Seneviratne, G. Developed fungal–bacterial biofilms as a novel tool for bioremoval of hexavalent chromium from wastewater //Chemistry and Ecology. – 2014. – V. 30. – №. 5. – P. 418-427.
193. Herrick J.B., Madsen E.L., Batt C.A., Ghiorse W.C. Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria //Applied and Environmental Microbiology. – 1993. – V. 59. – №. 3. – P. 687-694.
194. Herter S., Mikolasch A., Schauer F. Identification of phenylalkane derivatives when *Mycobacterium neoaurum* and *Rhodococcus erythropolis* were cultured in the presence of various phenylalkanes //Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – V. 93. – №. 1. – P. 343-355.

195. Holliger C., Gaspard S., Glod G., Heijman C., Schumacher W., Schwarzenbach R. P., Vazquez F. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants //FEMS Microbiology Reviews. – 1997. – V. 20. – №. 3-4. – P. 517-523.
196. Hua F., Wang H.Q. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms // Biotechnol Biotechnol Equip. – 2014. – V.28. – №.2. – P. 165-175.
197. Huang B., Sadeghinejad L., Adebayo O. I., Ma D., Xiao Y., Siqueira W. L., Finer Y. Gene expression and protein synthesis of esterase from *Streptococcus mutans* are affected by biodegradation by-product from methacrylate resin composites and adhesives //Acta biomaterialia. – 2018. – V. 81. – P. 158-168.
198. Hugh R., Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria //Journal of bacteriology. – 1953. – V. 66. – №. 1. – P. 24.
199. Huse S.M., Welch D.B.M., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures //BMC bioinformatics. – 2014. – V. 15. – №. 1. – P. 1-7.
200. Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Nomura N. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 //Applied and environmental microbiology. – 2013. – V. 79. – №. 22. – P. 7082-7090.
201. Itah A.Y., Brooks A.A., Ogar B.O., Okure A.B. Biodegradation of international jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems //Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2009. – V. 83. – №. 3. – P. 318-327.
202. Iutynska G. O., Vortman M. Y., Abdulina D. R., Kopteva A. Y., Rudenko A. V., Tretyak V. V., Shevchenko V. V. Biodegradation and antimicrobial activity of guanidine-containing polyethylene oxide hydrogel //Biotechnologia Acta. – 2020. – V. 13. – №. 4. – P. 60-70.
203. Ivanova E.A., Lobakova E. S., Idiatulov R. K., Shapiro T. N., Sandzhieva D. A., Kuznetsova O. V., Dedov A. G. Biocomposite materials for purification of aqueous

- media contaminated with hydrocarbons// Neftekhimiya. – 2019. –V. 59. – №. 3. – P. 297–303.
204. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World J Microbiol Biotechnol. – 1998. – V.14. – №.5. – P. 711-717.
205. Ivshina I. B., Kuyukina M. S., Krivoruchko A. V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation //Microbial Resources. – Academic Press, 2017. – P. 121-148.
206. Jaekel U., Musat N., Adam B., Kuypers M., Grundmann O., Musat F. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps //The ISME journal. – 2013. – V. 7. – №. 5. – P. 885-895.
207. Janbandhu A., Fulekar M. H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment //Journal of Hazardous Materials. – 2011. – V. 187. – №. 1-3. – P. 333-340.
208. Jaramillo J. E. C. C., Alvarez O. A., Achenie L., González-Barrios A. F. Molecular dynamics analysis of membrane proteins as biosurfactants into triglycerides water mixtures //Leadership. – 2020.
209. Jegan J., Vijayaraghavan K., Senthilkumar R., Velan M. Naphthalene degradation kinetics of *Micrococcus* sp., isolated from activated sludge //CLEAN–Soil, Air, Water. – 2010. – V. 38. – №. 9. – P. 837-842.
210. Johnson E. L., Hyman M. R. Propane and n-butane oxidation by *Pseudomonas putida* gpo1 //Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – №. 1. – P. 950-952.
211. Jones D. M., Douglas A. G., Parkes R. J., Taylor J., Giger W., Schaffner C. The recognition of biodegraded petroleum-derived aromatic hydrocarbons in recent marine sediments //Marine Pollution Bulletin. – 1983. – V. 14. – №. 3. – P. 103-108.
212. Joshi S. J., Desai A. J. Bench-scale production of biosurfactants and their potential in ex-situ MEOR application //Soil and Sediment Contamination: An International Journal. – 2013. – V. 22. – №. 6. – P. 701-715.

213. Jurelevicius D., Alvarez V. M., Peixoto R., Rosado A. S., Seldin L. The use of a combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria //PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 6. – P. e66565.
214. Kanga S.A., Page C.A., Mills M.A. Autenrieth R. L., Solubilization of Naphthalene and Methyl-Substituted Naphthalenes from Crude Oil Using Biosurfactants // Environmental Science & Technology. – 1997. – V.31. – №.2. – P. 556-561.
215. Karanth N.G.K., Deo P.G., Veenanadig N.K. Microbial production of biosurfactant and their importance // Ferment. Sci. Technol. – 1999. – V. 77. – P. 116-126.
216. Karlapudi A. P., Venkateswarulu T. C., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru, B. K., ramu Dirisala V., Kodali V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review //Petroleum. – 2018. – V. 4. – №. 3. – P. 241-249.
217. Karlyshev A. V., Mccrossan M. V., Wren B. W. Demonstration of polysaccharide capsule in Campylobacter jejuni using electron microscopy //Infection and immunity. – 2001. – V. 69. – №. 9. – P. 5921-5924.
218. Kato T, Miyanaga A, Kanaya S, Morikawa M. Alkane inducible proteins in Geobacillus thermoleovorans B23 //BMC microbiology. – 2009. – V. 9. – №. 1. – P. 1-9.
219. Kim I.S., Foght J.M. Gray M.R. Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He // Biotechnol Bioeng. – 2002. – V.80. – №.6. – P. 650-9.
220. Kim M. K., Srinivasan S., Back C. G., Joo E. S., Lee S. Y., Jung H. Y. Complete genome sequence of Deinococcus swuensis, a bacterium resistant to radiation toxicity //Molecular & Cellular Toxicology. – 2015. – V. 11. – №. 3. – P. 315-321.
221. Klich, M. Identification of common Aspergillus species. – CBS. – 2002. – p. 116.
222. Kloos K., Munch J. C., Schlöter M. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization //Journal of Microbiological Methods. – 2006. – V. 66. – №. 3. – P. 486-496.
223. Knoblauch C., Sahm K., Jørgensen B.B. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. Nov., sp. Nov., *Desulfofrigus fragile* sp. Nov., *Desulfofaba gelida* gen. Nov., sp. Nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. Nov., sp.

- Nov. And *Desulfotalea arctica* sp. Nov. // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – V. 49. – P. 1631-1643.
224. Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria // Microbes Environ. – 2002. – V.17. – P. 114-121.
 225. Kopp-Holtwiesche B. Biocrack // BFE (Biotech. Forum Eur). 1992. - V. 9 – №.6. - P. 627-632.
 226. Korshunova T., Chetverikov S., Bakaeva M., Kuzina E., Rafikova G., Chetverikova D., Loginov O. Microorganisms in the elimination of oil pollution consequences //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – V. 55. – №. 4. – P. 344-354.
 227. Kotani T., Kawashima Y., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing Mycobacterium sp. TY-6 and Pseudonocardia sp. TY-7 //Journal of bioscience and bioengineering. – 2006. – V. 102. – №. 3. – P. 184-192.
 228. Kotani T., Yamamoto T., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. Propane monooxygenase and NAD⁺-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by Gordonia sp. Strain TY-5 //Journal of bacteriology. – 2003. – V. 185. – №. 24. – P. 7120-7128.
 229. Kotsyurbenko O.R., Simankova M.V., Nozhevnikova A.N., Zhilina T.N., Bolotina N.P., Lysenko A.M., Osipov G.A. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. Nov., *A. Paludosum* sp. Nov., *A. Fimetarium* sp. Nov. // Arch. Microbiol. – 1995. – V. 163. – P. 29-34.
 230. Kravzova T. R., Ilinsky V. V., Lazebnaya I. V., Lazebny O. E., Akulova A. U., Mosharova I. V., Koksharova O. A. Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria from Urban Lake Beloye [Moscow]: Identification and Phylogenetic Analysis //Inland Water Biology. – 2020. – V. 13. – №. 2. – P. 178-185.
 231. Kumar M., León V., Materano A. D. S., Ilzins O. A. A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp. Degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 23. – №. 2. – P. 211-220.
 232. Kumar R., Das A. J. Rhamnolipid Biosurfactants and Their Properties //Rhamnolipid Biosurfactant. – Springer, Singapore, 2018. – P. 1-13.

233. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets //Molecular biology and evolution. – 2016. – V. 33. – №. 7. – P. 1870-1874.
234. Kuyukina M. S., Ivshina I. B. Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus* //Biology of *Rhodococcus*. – Springer, Cham, 2019. – P. 271-298.
235. Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Kamenskikh, T. N., Bulicheva, M. V., Stukova, G. I. Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – V. 84. – P. 118-125.
236. Kvenvolden K. A., Cooper C. K. Natural seepage of crude oil into the marine environment //Geo-Marine Letters. – 2003. – V. 23. – №. 3-4. – P. 140-146.
237. La Rosa G., De Carolis E., Sali M., Papacchini M., Riccardi C., Mansi A., Muscillo M. Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rna gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting //Microbiological research. – 2006. – V. 161. – №. 2. – P. 150-157.
238. Lal B., Khanna S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans* //Journal of applied bacteriology. – 1996. – V. 81. – №. 4. – P. 355-362.
239. Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82. – №. 20. – P. 6955-6959.
240. Lang S., Philp J.C. Surface-active lipids in *Rhodococci* // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1998. – V.74. – №. [1-3]. – P. 59-70.
241. Lan F. S., Destain, J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment //Water, Air, & Soil Pollution. – 2016. – V. 227. – №. 2. – P. 58.
242. Launen L. A., Pinto L. J., Moore M. M. Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology //Applied microbiology and biotechnology. – 1999. – V. 51. – №. 4. – P. 510-515.

243. Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1990. – V. 54. – №. 3. – P. 305-315.
244. Li J-L., Chang B.-H. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // Materials. – 2009. – V.2. – №.1. – P. 76-94.
245. Li Y. Y., Li B. Study on fungi-bacteria consortium bioremediation of petroleum contaminated mangrove sediments amended with mixed biosurfactants //Advanced Materials Research. – Trans Tech Publications Ltd, 2011. – V. 183. – P. 1163-1167.
246. Li Y., Wang H., Hua F. Uptake Modes of Fluoranthene by Strain *Rhodococcus* Sp. Bap-1// Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2014. – V.27. – №.6. – P. 4256-4262.
247. Liao J., Wang J., Jiang D., Wang M.C., Huang Y. Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils //Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – V. 99. – №. 23. – P. 10299-10310.
248. Lin S.C. Biosurfactants: recent advances //Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology. – 1996. – V. 66. – №. 2. – P. 109-120.
249. Liu C., Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. Nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – V. 55. – №. 3. – P. 1181-1186.
250. Liu R., Zhang Y., Ding R., Li D., Gao Y., Yang M. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils //Journal of bioscience and bioengineering. – 2009. – V. 108. – №. 5. – P. 400-407.
251. Lobakova E., Vasilieva S., Dolnikova G., Chekanov K., Kirpichnikov M., Kashcheeva P., Ivanova E., Idiatulov R., Buznik V., Dedov A. New bio-hybrid materials for bioremoval of crude oil spills from marine waters // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2016. – V. 108. – P. 99- 107.
252. Logeshwaran P., Megharaj M., Chadalavada S., Bowman M., Naidu R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches //Environmental technology & innovation. – 2018. – V. 10. – P. 175-193.

253. Lotfinasabasl S., Gunale V.R., Rajurkar N.S. Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi //Bioscience discovery. – 2012. – V. 3. – №. 2. – P. 186-192.
254. Ma J., Zhang Q., Chen F., Zhu Q., Wang Y., Liu G. Remediation of resins-contaminated soil by the combination of electrokinetic and bioremediation processes //Environmental Pollution. – 2020. – V. 260. – P. 114047.
255. Maamar A., Lucchesi M. E., Debaets S., Nguyen van Long N., Quemener M., Coton E., Matallah-Boutiba A. Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria) //Diversity. – 2020. – V. 12. – №. 5. – P. 196.
256. Margesin R., Schinner F. Characterization of Hydrocarbon-oxidizing microbial populations in contaminated and pristine alpine soils //Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – №. 6. – P. 3085-3092.
257. Marinescu M., Lacatusu A., Gament E., Plopeanu G., Carabulea V., Marinescu M. A review of biological methods to remediate crude oil polluted soil //Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series. – 2017. – V. 46. – №. 1. – P. 35-340.
258. Martin-Sanchez P. M., Gorbushina A. A., Toepel J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture-and qpcr-based approaches //International biodeterioration & biodegradation. – 2018a. – V. 126. – P. 216-223.
259. Martin-Sanchez P. M., Becker R., Gorbushina A. A., Toepel J. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2018b. – V. 129. – P. 89-94.
260. Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* //Environment International. – 2009. – V. 35. – №. 1. – P. 162-177.
261. Matlakowska R., Sklodowska A. The culturable bacteria isolated from organic-rich black shale potentially useful in biometallurgical procedures //Journal of Applied Microbiology. – 2009. – V. 107. – №. 3. – P. 858-866.
262. Meckenstock R. U., Boll M., Mouttaki H., Koelschbach J. S., Tarouco P. C., Weyrauch P., Himmelberg A. M. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic

- aromatic hydrocarbons //Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2016. – V. 26. – №. 1-3. – P. 92-118.
263. Medić A., Lješević M., Inui H., Beškoski V., Kojić I., Stojanović K., Karadžić I. Efficient biodegradation of petroleum n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity //RSC Advances. – 2020. – V. 10. – №. 24. – P. 14060-14070.
 264. Michaud L., Giudice A. L., Saitta M., De Domenico M., Bruni V. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment //Marine Pollution Bulletin. – 2004. – V. 49. – №. 5-6. – P. 405-409.
 265. Miller J. I., Techtmann S., Joyner D., Mahmoudi N., Fortney J., Fordyce J. A., Pelz O. Microbial Communities across Global Marine Basins Show Important Compositional Similarities by Depth //Mbio. – 2020. – V. 11. – №. 4.
 266. Mitchell R., Alexander M. Lysis of soil fungi by bacteria //Canadian Journal of Microbiology. – 1963. – V. 9. – №. 2. – P. 169-177.
 267. Miteva V.I., Sheridan P.P., Brenchley J.E. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep greenland glacier ice core // Appl. Environ. Microb. – 2004. – V. 70. – № 1. – P. 202-213.
 268. Mittal A., Singh P. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. – 2009.
 269. Mnif S., Chamkha M., Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions //Journal of applied microbiology. – 2009. – V. 107. – №. 3. – P. 785-794.
 270. Mohanty G., Mukherji S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia* //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2008. – V. 61. – №. 3. – P. 240-250.
 271. Monzón G. C., Nisenbaum M., Seitz M. K. H., Murialdo S. E. New findings on aromatic compounds' degradation and their metabolic pathways, the biosurfactant production and motility of the halophilic bacterium *Halomonas* sp. KHS3 //Current microbiology. – 2018. – V. 75. – №. 8. – P. 1108-1118.

272. Morgan P., Watkinson R. J. Biodegradation of components of petroleum. In: Biochemistry of Microbial Degradation, eds. Ratledge, p. – 1994.
273. Morikawa M.D., Takao H., Murata T., Shimonishi S., Imanaka Y. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38 // J Bacteriol. – 1993. – V.175. – №.20. – P. 6459-66.
274. Mukred A. M., Hamid A. A., Hamzah A., Yusoff W. W. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water //Online J. Biol. Sci. – 2008. – T. 8. – №. 4. – C. 73-79.
275. Neihof R. A., Bailey C. A. Biocidal properties of anti-icing additives for aircraft fuels //Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – V. 35. – №. 4. – P. 698-703.
276. Neu T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces //Microbiological reviews. – 1996. – V. 60. – №. 1. – P. 151.
277. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria // J Bacteriol. – 1996. – V. 178. – №.20. – P. 5853-9.
278. Nikolaev Y. A., Loiko N. G., Demkina E. V., Atroshchik E. A., Konstantinov A. I., Perminova I. V. Functional Activity of Humic Substances in Survival Prolongation of Populations of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria *Acinetobacter junii* //Microbiology. – 2020. – V. 89. – №. 1. – P. 74-85.
279. Ovsyannikova V. S., El'chaninova E. A., Kuvshinov I. V., Altunina L. K., Shcherbakova A. G. Effect of Retarded Acid System and Hydrocarbon-Oxidizing Microflora on the Usinskoye Field Oil Composition under Laboratory and Pilot Conditions //Petroleum Chemistry. – 2020. – P. 1-9.
280. Paisse S., Duran R., Coulon F., Goñi-Urriza M. Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – V. 92. – №. 4. – P. 835-844.
281. Pandey P., Pathak H., Dave S. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: a review //Research Journal of Environmental Toxicology. – 2016. – V. 10. – №. 1. – P. 1.
282. Pandit A., Adholeya A., Cahill D., Brau L., Kochar M. Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications //Journal of applied microbiology. – 2020. – V. 129. – №. 2. – P. 199-211.

283. Partida-Martinez L.P., Hertweck C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production //Nature. – 2005. – V. 437. – №. 7060. – P. 884-888.
284. Passman F. J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980—a review //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – V. 81. – P. 88-104.
285. Peng R.H., Xiong A. S., Xue Y., Fu X. Y., Gao F., Zhao W., Tian Y. S., Yao Q. H.: Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons //FEMS microbiology reviews. – 2008. – V. 32. – №. 6. – P. 927-955.
286. Pereira E., Napp A. P., Allebrandt S., Barbosa R., Reuwsaat J., Lopes W., Vainstein M. H. Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by autochthonous microorganisms //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2019. – V. 145. – P. 104789.
287. Pérez-Pantoja D., González B., Pieper D.H. Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons //Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – 2010.
288. Pion M., Spangenberg J.E., Simon A., Bindschedler S., Flury C., Chatelain A., Bshary R., Job D., Junier P. Bacterial farming by the fungus *Morchella crassipes* //Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2013. – V. 280. – №. 1773. – P. 20132242.
289. Pitt G. I., Hocking A. D. A laboratory guide to common *Penicillium* species. – North Ryde, NSW Australia: CSIRO Food Research Laboratory, 1988. – p. 188.
290. Plotnikova E. G., Altyntseva O. V., Kosheleva I. A., Puntus I. F., Filonov A. E., Gavrish E. Y., Boronin A. M. Bacterial degraders of polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from salt-contaminated soils and bottom sediments in salt mining areas //Microbiology. – 2001. – V. 70. – №. 1. – P. 51-58.
291. Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivorutchko A.B., Philp J.C., Cunningham C.J. Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber* //Bioresource Technology. – 2008. – V. 99. – №. 6. – P. 2001-2008.
292. Pothuluri J. V., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E. Fungal transformation of fluoranthene //Applied and environmental microbiology. – 1990. – V. 56. – №. 10. – P. 2974-2983.

293. Powell S. M., Ferguson S. H., Bowman J. P., Snape I. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation //Microbial ecology. – 2006. – V. 52. – №. 3. – P. 523-532.
294. Prathyusha K., Jagan Mohan Y. S. Y. V., Sridevi S., Sandeep B. V. Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam //International Journal of Advanced Research. – 2016. – V. 4. – №. 3. – P. 357-362.
295. Prince R.C., Gramain A., McGenity T.J. Prokaryotic Hydrocarbon Degradars. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, – 2010. – P. 1671-1691.
296. Prince R. C., Amande T. J., McGenity T. J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. – 2019. – P. 1-39.
297. Rabodonirina, S., Rasolomampianina R., Krier F., Drider D., Merhaby D., Net S., Ouddane B. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using Pseudomonas and Bacillus strains isolated from oil spill sites //Journal of environmental management. – 2019. – V. 232. – P. 1-7.
298. Rahim R., Ochsner U. A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam J. S., Soberón-Chávez G. Cloning and functional characterization of the Pseudomonas aeruginosa rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis //Molecular microbiology. – 2001. – V. 40. – №. 3. – P. 708-718.
299. Rahman K. S. M., Rahman T. J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R., Banat I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients //Bioresource Technology. – 2003. – V. 90. – №. 2. – P. 159-168.
300. Rahman K. S. M., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium //Bioresource technology. – 2002. – V. 85. – №. 3. – P. 257-261.
301. Rahman R. N. Z. A., Ghazali F. M., Salleh A. B., Basri M. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells //Journal of Microbiology. – 2006. – V. 44. – №. 3. – P. 354-359.

302. Raper K.B., Fennel D.I. The genus *Aspergillus* //The genus *Aspergillus*. – 1965. – p. 686.
303. Raper K.B., Thom C., Fennell D.I. A mmanual of the ppenicillia. Hefner Publishing Co., New York, – 1968. – p. 875.
304. Rapp P., Backhaus S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria //Enzyme and Microbial Technology. – 1992. – V. 14. – №. 11. – P. 938-943.
305. Rauch M.E., Graef H.W., Rozenzhak S.M., Jones S.E., Bleckmann C.A., Kruger R.L., Naik R.R., Stone M.O. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks //Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 33. – №. 1. – P. 29-36.
306. Redmond M. C., Valentine D. L., Sessions A. L. Identification of novel methane-, ethane, and propane-oxidizing bacteria at marine hydrocarbon seeps by stable isotope probing //Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – №. 19. – P. 6412-6422.
307. Revelle R. Troubled waters of the Gulf of Mexico // Oceanography. 2011. – V. 24. – №. 2. - P. 200–211.
308. Rodríguez-Rodríguez C.E., Rodríguez E., Blanco R., Cordero I., Segura D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment //Journal of Environmental Sciences. – 2010. – V. 22. – №. 10. – P. 1595-1601.
309. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria //Environmental microbiology. – 2009. – V. 11. – №. 10. – P. 2477-2490.
310. Ron E.Z., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // Environ Microbiol. – 2001. – V.3. – №4. – P. 229-236.
311. Rosenberg E. Biosurfactants. In: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria 3rd ed. V. 1. New York, Springer Science+Business Media Inc., 2006. – P. 834-849.
312. Saborimanesh N., Mulligan C. N. Biosurfactants and their Applications in Petroleum Industry //Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications. – 2019. – P. 209.

313. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees //Molecular biology and evolution. – 1987. – V. 4. – №. 4. – P. 406-425.
314. Sajna K. V., Sukumaran R. K., Gottumukkala L. D., Pandey A. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth //Bioresource technology. – 2015. – V. 191. – P. 133-139.
315. Sakai Y., Takahashi H., Wakasa Y., Kotani T., Yurimoto H., Miyachi N., Kato N. Role of α -methylacyl coenzyme A racemase in the degradation of methyl-branched alkanes by *Mycobacterium* sp. Strain P101 //Journal of bacteriology. – 2004. – V. 186. – №. 21. – P. 7214-7220.
316. Salam L. B., Ilori M. O., Amund O. O., LiiMien Y., Nojiri H. Characterization of bacterial community structure in a hydrocarbon-contaminated tropical African soil //Environmental technology. – 2018. – V. 39. – №. 7. – P. 939-951.
317. Salleh A. B., Ghazali F. M., Rahman R. N. Z. A., Basri M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. – 2003.
318. Sameshima Y., Honda K., Kato J., Omasa T., Ohtake H. Expression of *Rhodococcus opacus* *alkB* genes in anhydrous organic solvents //Journal of bioscience and bioengineering. – 2008. – V. 106. – №. 2. – P. 199-203.
319. Samson R.A., Frisvard J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. – Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, – 2004. – V. 49, – p. 251.
320. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – V. 84. – P. 5463-5467.
321. Shapiro T., Chekanov K., Alexandrova A., Dolnikova G., Ivanova E., Lobakova E. Revealing of Non-Cultivable Bacteria Associated with the Mycelium of Fungi in the Kerosene-Degrading Community Isolated from the Contaminated Jet Fuel //Journal of Fungi. – 2021. – V. 7. – №. 1. – P. 43-56.
322. Sathishkumar M., Binupriya A. R., Baik S. H., Yun S. E. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas //CLEAN–Soil, Air, Water. – 2008. – V. 36. – №. 1. – P. 92-96.

323. Sato S., Fukuoka T., Saika A., Koshiyama T., Morita T. A New Screening Approach for Glycolipid-type Biosurfactant Producers Using MALDI-TOF/MS //Journal of Oleo Science. – 2019. – V. 68. – №. 12. – P. 1287-1294.
324. Satpute S. K., Kulkarni G. R., Banpurkar A. G., Bana, I. M., Mone N. S., Patil R. H., Cameotra S. S. Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications //Journal of basic microbiology. – 2016. – V. 56. – №. 11. – P. 1140-1158.
325. Schmidberger A., Henkel M., Hausmann R., Schwartz T. Expression of genes involved in rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in a bioreactor cultivation //Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – V. 97. – №. 13. – P. 5779-5791.
326. Scoma A., Barbato M., Hernandez-Sanabria E., Mapelli F., Daffonchio D., Borin S., Boon N. Microbial oil-degradation under mild hydrostatic pressure (10 mpa): which pathways are impacted in piezosensitive hydrocarbonoclastic bacteria? //Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 23526.
327. Sei K., Sugimoto Y., Mori K., Maki H., Kohno T. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes //Environmental Microbiology. – 2003. – V. 5. – №. 6. – P. 517-522.
328. Sekhon K. K., Khanna S., Cameotra S. S. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release //Microbial cell factories. – 2011. – V. 10. – №. 1. – P. 1-10.
329. Seneviratne G., Zavahir J.S., Bandara W.M.M.S., Weerasekara M.L.M.A.W. Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – V. 24. – №. 6. – P. 739-743.
330. Shabir G., Afzal M., Anwar F., Tahseen R., Khalid Z.M. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2008. – V. 61. – №. 2. – P. 161-166.
331. Shennan J. L. Utilisation of C2–C4 gaseous hydrocarbons and isoprene by microorganisms //Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International

- Research in Process, Environmental & Clean Technology. – 2006. – V. 81. – №. 3. – P. 237-256.
332. Shumkova E.S., Egorova D.O., Korsakova E.S., Dorofeeva L.V., Plotnikova E.G. Molecular biological characterization of biphenyl-degrading bacteria and identification of the biphenyl 2,3-Dioxygenase α -subunit genes // Microbiology. – 2014. – V. 83. – № 1. – P. 160-168.
333. Sierra-Garcia I. N., Alvarez J. C., de Vasconcellos S. P., de Souza A. P., dos Santos Neto E. V., de Oliveira V. M. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs //plos One. – 2014. – V. 9. – №. 2. – P. E90087
334. Silva M., Cerniglia C. E., Pothuluri J. V., Canhos V. P., Esposito E. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2003. – V. 19. – №. 4. – P. 399-405.
335. Singh H. Mycoremediation: fungal bioremediation. – John Wiley & Sons, 2006.
336. Singh P., Jain R., Srivastava N., Borthakur A., Pal D. B., Singh R., Mishra P. K. Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review //Critical Reviews in Environmental Science and Technology. – 2017. – V. 47. – №. 3. – P. 155-201.
337. Smibert R. M., Krieg N. R. Enrichment and isolation //Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC. – 1981. – P. 112-142.
338. Smith C. B., Tolar B. B., Hollibaugh J. T., King G. M. Alkane hydroxylase gene (alkB) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton //Frontiers in microbiology. – 2013. – V. 4. – P. 370.
339. Smits T. H. M., Röthlisberger M., Witholt B., Van Beilen J. B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains //Environmental Microbiology. – 1999. – V. 1. – №. 4. – P. 307-317.
340. Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* //Applied microbiology and biotechnology. – 2005. – V. 68. – №. 6. – P. 718-725.

341. Sørensen G., Pedersen D.V., Nørgaard A.K., Sørensen K.B., Nygaard S.D. Microbial growth studies in biodiesel blends // *Bioresource technology*. – 2011. – V. 102. – №. 8. – P. 5259-5264.
342. Soriano A. U., Martins L. F., de Assumpção Ventura E. S., de Landa F. H. T. G., de Araújo Valoni É., Faria F. R. D., Peixoto R. S. Microbiological aspects of biodiesel and biodiesel/diesel blends biodeterioration // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. – V. 99. – P. 102-114.
343. Srinivas T.N.R., Nageswara Rao S.S.S., Vishnu V.R.P., Pratibha M.S., Sailaja B., Kavya B., Hara K.K., Begum Z., Singh S. M., Shivaji S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active lipases, amylases and proteases, from culturable bacteria of Kongsfjorden and Ny-Alesund, Svalbard, Arctic. // *Current Microbiology*. – 2009. – V. 39. – № 5. – P. 537-547.
344. Staff C.P. Mutant bacteria decontaminates spilled crude oil site // *Chem. Proc. (USA)*. – 1982. – V. 45. – №. 14. – P. 96.
345. Staley J.T., Gosink J.J. Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1999. – V. 53. – № 1. – P. 189-215.
346. Suflita J.M., Aktas D.F., Oldham A.L., Perez-Ibarra B.M., Duncan K. Molecular tools to track bacteria responsible for fuel deterioration and microbiologically influenced corrosion // *Biofouling*. – 2012. – V. 28. – №. 9. – P. 1003-1010.
347. Suzuki T., Tanaka K., Matsubara I., Kinoshita S. Trehalose Lipid and α -Branched- β -hydroxy Fatty Acid Formed by Bacteria Grown on n-Alkanes // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 2014. – V.33. – №.11. – P. 1619-1627.
348. Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nomura N., Matsumura M., Kamagata Y. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques // *Applied and environmental microbiology*. – 2005. – V. 71. – №. 4. – P. 2162-2169.
349. Tapilatu Y.H., Grossi V., Acquaviva M., Militon C., Bertrand J.C., Cuny P. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France) // *Extremophiles*. – 2010. – V. 14. – №. 2. – P. 225-231.
350. Teske A., Durbin A., Ziervogel K., Cox C., Arnosti C. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an

- Arctic Fjord of Svalbard // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V. 77. – № 6. – P. 2008-2018.
351. Thamer M., Al-Kubaisi A. R., Zahraw Z., Abdullah H. A., Hindy I., Abd Khadium, A. Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq. – 2013.
 352. Thom C., Church M. B. The aspergilli //The Aspergilli. – 1926.
 353. Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874 //Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73. – №. 10. – P. 3327-3332.
 354. Tuleva B., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters [biosurfactants] from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // J Appl Microbiol. – 2008. – V.104. – №.6. – P.1703-10.
 355. Ulrici W. Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants //Biotechnology: Environmental Processes II. – 2000. – V. 11. – P. 5-41.
 356. Urlacher V. B., Eiben S. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application //Trends in biotechnology. – 2006. – V. 24. – №. 7. – P. 324-330.
 357. Van Beilen J. B., Smits T. H., Whyte L. G., Schorcht S., Röthlisberger M., Plaggemeier T., Witholt B. Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains //Environmental microbiology. – 2002. – V. 4. – №. 11. – P. 676-682.
 358. Van Beilen J. B., Funhoff E. G., van Loon A., Just A., Kaysser L., Bouza M., Witholt B. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases //Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72. – №. 1. – P. 59-65.
 359. Van Beilen J. B., Li Z., Duetz W. A., Smits T. H., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment //Oil & gas science and technology. – 2003. – V. 58. – №. 4. – P. 427-440.
 360. Van Beilen J. B., Funhoff E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – V. 74. – №. 1. – P. 13-21.

361. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. – №. 4. – P. 503-549.
362. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Physiological aspects. Part 1 in series of papers devoted to biosurfactants in microbiology and biotechnology // *Biotechnol Adv.* – 2006. – V. 24. – P. 604–620.
363. Vandieken V., Finke N., Jørgensen B.B. Pathways of carbon oxidation in an Arctic fjord sediment (Svalbard) and isolation of psychrophilic and psychrotolerant Fe (III)-reducing bacteria // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 2006. – V. 322. – P. 29-41.
364. Varjani S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology.* – 2017. – V. 223. – P. 277-286.
365. Varjani S. J., Upasani V. N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 // *Bioresource technology.* – 2016. – V. 222. – P. 195-201.
366. Varjani Sunita, J., Rana Dolly P., Bateja S., Upasani Vivek N. Original research article isolation and screening for hydrocarbon utilizing bacteria (HUB) from petroleum samples // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2013. – V. 2. – №. 4. – P. 48-60.
367. Varjani S. J., Rana D. P., Jain A. K., Bateja S., Upasani V. N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2015. – V. 103. – P. 116-124.
368. Vasilieva S., Lobakova E., Solovchenko A. Biotechnological Applications of Immobilized Microalgae // *Environmental Biotechnology Vol. 3.* – Springer, Cham, 2021. – P. 193-220.
369. Vijayan D. Biodegradation of aromatic hydrocarbons using microbial adsorbed bioreactor // *3 Biotech.* – 2020. – V. 10. – №. 6. – P. 249-249.
370. Vomberg A., Kliner U. Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria // *Journal of Applied Microbiology.* – 2000. – V. 89. – №. 2. – P. 339-348.
371. Walker J. D., Colwell R. R., Vaituzis Z., Meyer S. A. Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii* // *Nature.* – 1975. – V. 254. – №. 5499. – P. 423.

372. Wang X. B., Chi C. Q., Nie Y., Tang Y. Q., Tan Y., Wu G., Wu X. L. Degradation of petroleum hydrocarbons [C6–C40] and crude oil by a novel *Dietzia* strain // *Bioresource technology*. – 2011. – V. 102. – №. 17. – P. 7755-7761.
373. Wang Y., Tian R.M., Gao Z.M., Bougouffa S., Qian P.-Y. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – №. 3. – P. e90053.
374. Wasmund K., Burns K. A., Kurtböke D. I., Bourne D. G. Novel alkane hydroxylase gene [alkb] diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75. – №. 23. – P. 7391-7398.
375. Watkinson R. J., Morgan P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms // *Physiology of Biodegradative Microorganisms*. – Springer, Dordrecht, 1991. – P. 79-92.
376. Wei Q. F., Mather R. R., Fotheringham A. F. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant // *Bioresource technology*. – 2005. – V. 96. – №. 3. – P. 331-334.
377. Wei Q. F., Mather R. R., Fotheringham A. F., Yang R. D. Evaluation of nonwoven polypropylene oil sorbents in marine oil-spill recovery // *Marine Pollution Bulletin*. – 2003. – V. 46. – №. 6. – P. 780-783.
378. Weid I., Marques J. M., Cunha C. D., Lippi R. K., Dos Santos S. C., Rosado A. S., Seldin L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamomea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil // *Systematic and applied microbiology*. – 2007. – V. 30. – №. 4. – P. 331-339.
379. Wentzel A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B., Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2007. – V. 76. – №. 6. – P. 1209-1221.
380. White J., Gilbert J., Hill G., Hill E., Huse S. M., Weightman A. J., Mahenthiralingam E. Culture-independent analysis of bacterial fuel contamination provides insight into the level of concordance with the standard industry practice of aerobic cultivation // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – №. 13. – P. 4527-4538.
381. Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W. E., Greer C. W. Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a

- Psychrotrophic *Rhodococcus* sp //Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – №. 7. – P. 2578-2584.
382. Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 //Applied and environmental microbiology. – 2002. – V. 68. – №. 12. – P. 5933-5942.
 383. Widdel F., Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons //Current opinion in biotechnology. – 2001. – V. 12. – №. 3. – P. 259-276.
 384. Wilkes H., Buckel W., Golding B. T., Rabus R. Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria //Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2016. – P. 26. – №. 1-3. – P. 138-151.
 385. Wilson P., Braley S. M. Nature, chronostratigraphy and origin of late Holocene coastal sands at Portrush, Co. Antrim //Irish Geography. – 1996. – V. 29. – №. 2. – P. 96-105.
 386. Wong P. K., Lam K. C., So C. M. Removal and recovery of Cu (II) from industrial effluent by immobilized cells of *Pseudomonas putida* II-11 //Applied Microbiology and Biotechnology. – 1993. – V. 39. – №. 1. – P. 127-131.
 387. Wrenn B. A., Venosa A. D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure //Canadian journal of microbiology. – 1996. – V. 42. – №. 3. – P. 252-258.
 388. Yakimov M. M., Timmis K. N., Golyshin P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria //Current opinion in biotechnology. – 2007. – V. 18. – №. 3. – P. 257-266.
 389. Yakimov M.M., Giuliano L., Gentile G., Crisafi E., Chernikova T.N., Abraham W.-R., Lünsdorf H., Timmis K.N., Golyshin P.N. *Oleispira antarctica* gen. Nov., sp. Nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2003. – V. 53. – (Pt 3). – P. 779-785.
 390. Yam K. C., van der Geize R., Eltis L. D. Catabolism of aromatic compounds and steroids by *Rhodococcus* //Biology of *Rhodococcus*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – P. 133-169.

391. Yemashova N. A., Murygina V. P., Zhukov D. V., Zakharyantz A. A., Gladchenko M. A., Appanna V., Kalyuzhnyi S. V. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review //Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2007. – V. 6. – №. 4. – P. 315-337.
392. Yilmaz N., Houbraken J., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Visagie C. M., Samson R. A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species //Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. – 2012. – V. 29. – P. 39-54.
393. Yilmaz N., Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces* //Studies in Mycology. – 2014. – V. 78. – P. 175-341.
394. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K. N., Knapp R.M., McInerney M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms // J Microbiol Methods. – 2004. – V.56. – №.3. – P. 339-47.
395. Youssef N., Simpson D. R., McInerney M. J., Duncan K. E. In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – V. 81. – P. 127-132.
396. Zhang G., Yang C., Serhan M., Koivu G., Yang Z., Hollebone B., Brown C. E. Characterization of nitrogen-containing polycyclic aromatic heterocycles in crude oils and refined petroleum products //Advances in marine biology. – 2018. – V. 81. – P. 59-96.
397. Zhao F., Zhou J., Han S., Ma F., Zhang Y., Zhang J. Medium factors on anaerobic production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* SG and a simplifying medium for in situ microbial enhanced oil recovery applications //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 32. – №. 4. – P. 54.
398. Żur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization //Molecules. – 2016. – V. 21. – №. 7. – P. 958.