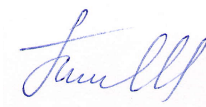


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Шапиро Татьяна Наумовна

**СООБЩЕСТВА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В
НЕФТЕПРОДУКТАХ**

03.02.03-микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ
имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель

Лобакова Елена Сергеевна,
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты —

Манучарова Наталия Александровна
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
факультет Почвоведения, кафедра биологии
почв, профессор

Ильинский Владимир Викторович
доктор биологических наук,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
Биологический факультет, кафедра общей
экологии и гидробиологии, профессор

Бабич Тамара Леонидовна
кандидат биологических наук,
ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии», Институт
микробиологии имени С.Н.Виноградского РАН,
лаборатория нефтяной микробиологии, старший
научный сотрудник

Защита диссертации состоится «27» апреля 2021 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.03.13 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 12, биологический факультет, аудитория М-1.

E-mail: nvkostina@mail.ru

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/359505768/>.

Автореферат разослан «____» марта 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, к.б.н.

Костина Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. 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., 2018). Принято считать, что прямые и косвенные потери от микробиологически обусловленной коррозии нефти и нефтепродуктов (НП) в промышленно развитых странах составляют от 2% до 5% годового валового внутреннего продукта (Каримова, 2007).

Основными группами микроорганизмов, вызывающих биоповреждение топлива, являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, грибы родов *Hormoconis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и др. (Passman, 2013). Бактерия *P. aeruginosa* и гриб *Hormoconis resinae* ("керосиновый грибок") выявлены в большинстве образцов моторных масел, подвергшихся биодеструкции (Матвеева и др., 2011).

При хранении нефти и НП углеводородоокисляющие микроорганизмы (УОМ) образуют сообщества, составляющие единую цепь окисления УВ (Varjani, 2017). Каждый микроорганизм в таком сообществе использует преимущественно определенные группы УВ по специфическим метаболическим путям. При совместном воздействии УОМ сообществ из нефти и НП извлекается как большее количество, так и более широкий спектр УВ (Handley et al., 2017; Martin-Sanchez et al., 2018).

Для роста УОМ достаточно тонкой пленки воды на поверхности или в глубине нефти и НП (Dombrowski et al., 2016). Многие добавки, используемые в настоящее время в топливной промышленности, содержат минеральные элементы, способствующие росту УОМ и, следовательно, процессу деструкции нефти и НП (Scoma et al., 2016).

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) микробного происхождения, являются мощными регуляторами активности сообществ УОМ в деструкции УВ (Bezza, Chirwa, 2015; Depikka et al., 2021). Эмульгирование УВ ПАВами улучшает приток гидрофобных органических веществ в микробные клетки и, следовательно, их деградацию. БиоПАВы или микроорганизмы, их продуцирующие, являются необходимым звеном в процессе биологической деструкции нефти и НП (Karlapudi et al., 2018).

Целью работы явилось изучение микробных сообществ образцов реактивного (ТС-1) и автомобильного (АИ-95) топлива и возможности создания полифункциональных материалов на основе нетканых полимерных сорбентов с выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий.

Задачи работы:

- 1) 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 фрагментов гена *16S rRNA*) методов.
- 2) Изучить физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов углеводород окисляющих бактерий, определить их субстратный спектр с использованием модельных углеводов (предельных, непредельных, ароматических, полициклических углеводов), выявить наиболее активные и универсальные штаммы углеводород окисляющих бактерий. Определить способность выделенных штаммов бактерий к деструкции модельной смеси углеводов;
- 3) Проанализировать с помощью универсальных праймеров гена *16S rRNA* и методами высокопроизводительного секвенирования (NGS) на основе библиотек V4 фрагмента гена *16S rRNA* наличие некультивируемых форм бактерий в препаратах ДНК мицелия выделенных штаммов микромицетов;
- 4) Выявить у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий наличие функциональные генов, отвечающих за начальные этапы окисления н-алканов (*alkB*, *Cyp153*, *alk1*, *alk2* и *alk3*), синтеза биоПАВов (*RhlA* и *spf0*);
- 5) Исследовать возможность создания полифункциональных материалов на основе нетканых полимерных сорбентов с выделенными штаммами углеводородокисляющих бактерий.

Научная новизна работы. Впервые исследована филогенетическая структура микробных сообществ двух типов НП - реактивного топлива ТС-1 и автомобильного бензина марки АИ-95, различающихся по химическому составу УВ¹. Установлено, что в реактивном топливе ТС-1 присутствуют микроорганизмы двух доменов: *Bacteriae* и *Eukaria (Fungi)*, а в автомобильном бензине только домена *Bacteriae*. Впервые молекулярными методами в ДНК мицелия изолятов грибов из реактивного топлива ТС-1 обнаружено присутствие некультивируемых форм бактерий. Выделены и охарактеризованы из реактивного (ТС-1) и автомобильного

¹ Автор выражает благодарность заведующему кафедрой ОиНХ профессору, Академику А.Г. Дедову за постоянную помощь, поддержку, предоставленные образцы НП и доброжелательное отношение.

(бензина АИ-95) топлива 14 штаммов углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и 6 штаммов микромицетов, способных к биодegradации УВ.

По способности к росту на модельных УВ установлены штаммы: а) активных деструкторов углеводов (*S. mizutaii* Bi9, *Sphingobacterium* sp. Bi8 и *R. erythropolis* Bi6), для которых характерна низкая субстратная специфичность и эффективная деструкция топлива и модельной смеси УВ и б) потенциальных деструкторов УВ и НП, обладающих высокой субстратной специфичностью и более низкой интенсивностью окисления модельной смеси УВ. Штаммы первой группы углеводородокисляющих бактерий могут быть рекомендованы для использования при создании биопрепаратов, для биоремедиации окружающей среды. Установлено, что штаммы бактерий второй группы способны к синтезу эндо и экзо биоПАВов.

Методами сканирующей электронной микроскопии и цитохимии показано, что как монокультуры, так и смешанные культуры УОБ активно заселяют поверхности волокон полимерного нетканого сорбента, формируя биопленки и микрофлоркулы в межволоконном пространстве. 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 смешанных культурах способны более эффективно деградировать УВ, чем планктонные формы.

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 УВ НП. Создана коллекция УОМ 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 сорбентов или биопрепаратов, применяемых на этапе биологической очистки в случае аварийных разливов нефти и НП в водных средах и почве.

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

Объекты, предмет и 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 хроматографии². 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 биокomпозитных 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 углеводов.

Часть бактериальных компонентов сообществ – универсальных деструкторов -

² Автор выражает благодарность доценту кафедры ОиХХ 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.

преимущественно специализирована на окислении различных групп углеводов, 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: V Международный Байкальский Микробиологический Симпозиум «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» в рамках VII Международной Верещагинской Байкальской Конференции (онлайн, 2020); Всероссийская конференция с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии», приуроченная к 95-летию кафедры микробиологии, МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, 2019); 2-ой Российский Микробиологический Конгресс (Саранск, 2019); Всероссийская конференция с международным участием «Микология и альгология в России. XX – XXI век: смена парадигм», посвященная 100-летию кафедры микологии и альгологии, 110-летию со дня рождения М.В. Горленко и памяти Ю.Т. Дьякова, МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, 2018); 9-я ежегодная Международная конференция РХО им. Д. И. Менделеева: химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов (Москва, 2018); IX Российская научная конференция с международным участием "Персистенция и симбиоз микроорганизмов" (Опенбург, 2018); V Moscow International Conference «Molecular phylogenetics and biodiversity biobanking», МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва, 2018); XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» 2018, МГУ (Москва, 2018); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» 2017, МГУ (Москва, 2017). 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, из них 72 – русским и 326 – на английском языке. Работа изложена на 175 страницах, содержит 52 рисунка и 18 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «**Введении**» обоснована актуальность выбранной темы работы, сформулированы цели и задачи исследования, изложена научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы.

В **главе 1 «Обзор литературы»** дано описание НП как смеси УВ – специфической среды обитания микроорганизмов. Приведены сведения о проблеме биоповреждения НП, включая различные виды топлива, об особенностях микроорганизмов способных развиваться в нефти и НП, об их видовом составе. Приводятся данные о способах поступления УВ в клетки микроорганизмов и возможных путях их деградации. Описаны биоПАВы, которые повышают доступность УВ для микроорганизмов. Проведен анализ способов утилизации НП в окружающей среде при аварийных ситуациях, в том числе биологических методов с применением УОМ. Приводятся данные по применению в биоремедиации УОМ, иммобилизованных на полимерных сорбентах.

В **главе 2 «Материалы и методы исследования»** описаны исследуемые образцы горюче-смазочных материалов, принципы подбора сред для выделения и культивирования УОМ, а также детекции некультивируемых бактерий (с помощью ПЦР на гены *16/18S rPHK*), локализованных в гиофосфере микромицетов исследуемых образцов, методы изучения физиолого-биохимических свойств, выделенных штаммов, подготовка образцов для СЭМ, методика выделения ДНК, получения ПЦР продукта для высокопроизводительного секвенирования (NGS) и определения наличия генов углеводород окисления и продукции биосурфактантов, принципы иммобилизации УОБ на полимерных сорбентах, а также методы оценки параметров эмульгирующей активности, гидрофобности, снижения поверхностного натяжения и субстратного спектра выделенных штаммов УОМ.

В главе 3 «Результаты исследований и их обсуждение» проведено:

Выделение и идентификация микроорганизмов из образцов топлива. Из образца реактивного топлива ТС-1 на минеральной среде Эванса (ЭМ) и среде с низким содержанием органических веществ (УС10) получено 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. 4 выделенных культур бактерий относились к грамположительному морфотипу, а 6 – к грамотрицательному. 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. Колонии первого типа были образованы мелкими неподвижными палочками, другого типа – подвижными палочками, характерными 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 изолятов бактерий была проведена молекулярно-генетическая идентификация на основе рибосомальной филогении. Определены представители 7 родов бактерий: *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Deinococcus*, *Bacillus* и *Paenibacillus*. Полученные последовательности депонированы в международную базу данных Genbank (рис. 1). В результате идентификации чистых культур, выделенных из образца бензина, по фрагментам гена *16S rRNA*, оказалось, что два морфологических типа колоний, относятся к двум родам бактерий: *Bacillus* и *Paenibacillus* и принадлежат к 4 видам бактерий: *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *B. safensis* и *Paenibacillus agarivorans*.

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

Оценка способности штаммов углеводородокисляющих бактерий к использованию углеводородов модельной смеси³. Активность штаммов бактерий, выделенных из реактивного топлива, в отношении использования 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* Bi6 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.

³ Работа по определению остаточного содержания УВ проводилась на инструментальной базе кафедры ОиНХ РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина совместно с Джабраиловой Х.С.

Штаммы *S. multivorum* Bi2 и *Sphingobacterium* sp. Bi8 также 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. 2). Для штаммов *A. faecalis* Bi3, *Deinococcus* sp. Bi7, *Rhodococcus* sp. Bi10, *Rhodococcus* sp. Bi4 разница в деградации компонентов модельной смеси УВ (рис. 2) была статистически незначимой, при этом рост штаммов *A. faecalis* Bi3 и *Rhodococcus* sp. Bi4 в модельной смеси УВ практически отсутствовал.

Среди штаммов УОБ, выделенных из бензина АИ-95, наиболее эффективным рост на модельной смеси УВ №2, состоящей из н-алканов ($C_{15}H_{32}$, $C_{12}H_{26}$ и $C_{18}H_{38}$), изоалкана ($C_{12}H_{26}$), циклоалкана ($C_{16}H_{32}$), алкенов ($C_{12}H_{24}$, $C_{14}H_{28}$) и ароматических углеводородов (триметилбензола (C_9H_{12}), нонилбензола ($C_{15}H_{24}$)), был у *P. agaridevorans* Bi11, а наименьший у *B. pumilus* Bi12. Однако, наиболее эффективно как модельную смесь, так и индивидуальные УВ использовали штаммы *B. safensis* Bi13 и *Bacillus* sp. Bi14 (рис. 3). Таким образом, биodeградация алканов 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 pp. *Sphingobacterium*, *Rhodococcus* и *Bacillus*, что согласуется с данными других исследователей (Leahy, Colwell, 1990; Salleh et al., 2003; Janbandhu, Fulekar, 2011).

Детекция генов окисления н-алканов у выделенных штаммов УОБ. Бактерии, выделенные из реактивного топлива ТС-1, кроме штамма *Deinococcus* sp. Bi7, содержат как минимум один из исследованных генов деградации н-алканов. 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. Исключением является штамм *P. agaridevorans* Bi11, имеющий ген *Cyp153*.

Оценка изменения физико-химических параметров среды культивирования выделенными штаммами УОБ.

Индекс эмульгирующей активности штаммов УОБ. Максимально высокий индекс эмульгирования имеет штамм *Deinococcus* sp. Bi7. Штаммы УОБ рода *Sphingobacterium* и *A. faecalis* Bi3 имеют показатели эмульгирующей активности больше 50%: $56,5\% \pm 4,9$, $50,8\% \pm 5,7$ и $51,5\% \pm 2,1$ для штаммов *S. multivorum* Bi2,

Sphingobacterium sp. Bi5 и *A. faecalis* Bi3, соответственно. Из штаммов р. *Rhodococcus* только штамм *Rhodococcus* sp. Bi4 имел индекс эмульгирования $53,3\% \pm 3,2$. Штамм *R. erythropolis* Bi6 показал самую низкую эмульгирующую активность, равную $15,9\% \pm 5,7$ (рис. 4).

Определение показателя гидрофобности поверхности клеток УОБ. Регистрация показателя гидрофобности может служить дополнительным критерием отбора бактерий, синтезирующих связанные с клетками биоПАВы. Поэтому для исследования были взяты отмытые от среды и ресуспендированные в среде ЭМ клетки УОБ.

Исследование показателя гидрофобности поверхности клеток показало, что для полученных штаммов он находится в пределах от 28% до 81% и, в основном, не превышает 50%. Для штамма *Sphingobacterium* sp. Bi5 этот показатель оказался максимальным и составил более 80%. Для данного штамма отмечен практически полный переход клеток в гидрофобную фазу (рис. 4).

Изменения показателя поверхностного натяжения (ПН) культуральной жидкости с клетками. Установлено, что снижение показателя ПН среды зависело от штамма УОБ. Штамм *S. multivorum* Bi2 снижал показатель ПН культуральной среды более чем на 21 мН/м, что является наибольшим среди всех штаммов, выделенных из топлива ТС-1 (рис. 4). Среди штаммов, выделенных из бензина, показатели снижения ПН оказались еще выше и достигал 43,9 мН/м для штамма *B. safensis* Bi13. Штаммы *Sphingobacterium* sp. Bi8 и *A. faecalis* Bi3 также сильно снижали показатель ПН среды. Остальные штаммы *Rhodococcus* sp. Bi4, *Rhodococcus* sp. Bi10, *Sphingobacterium* sp. Bi5, *Deinococcus* sp. Bi7 снижали поверхностное натяжение среды в среднем на 5 - 15 мН/м. Штаммы *R. erythropolis* Bi6 и *S. mizutaii* Bi9 незначительно повышали значение ПН среды культивирования.

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

Согласно литературным данным, организмы, способные к снижению ПН жидкости более чем на 10 мН/м, могут являться перспективными продуцентами ПАВов (Francy et al., 1991; Григорьян, 2004). Показатель гидрофобности клеток указывает на наличие у выделенных штаммов не экскретирующихся в водную среду эндоПАВов, что особенно выражено у штамма *Sphingobacterium* sp. Bi5. 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*. Штаммы *Sphingobacterium sp.* Bi5, *S. mizutaii* Bi9, и *Deinococcus sp.* Bi7 можно отнести к селективно активным, так как в отсутствии способности к снижению показателя ПН среды, они обладают высокими показателями ЭА и ПГ.

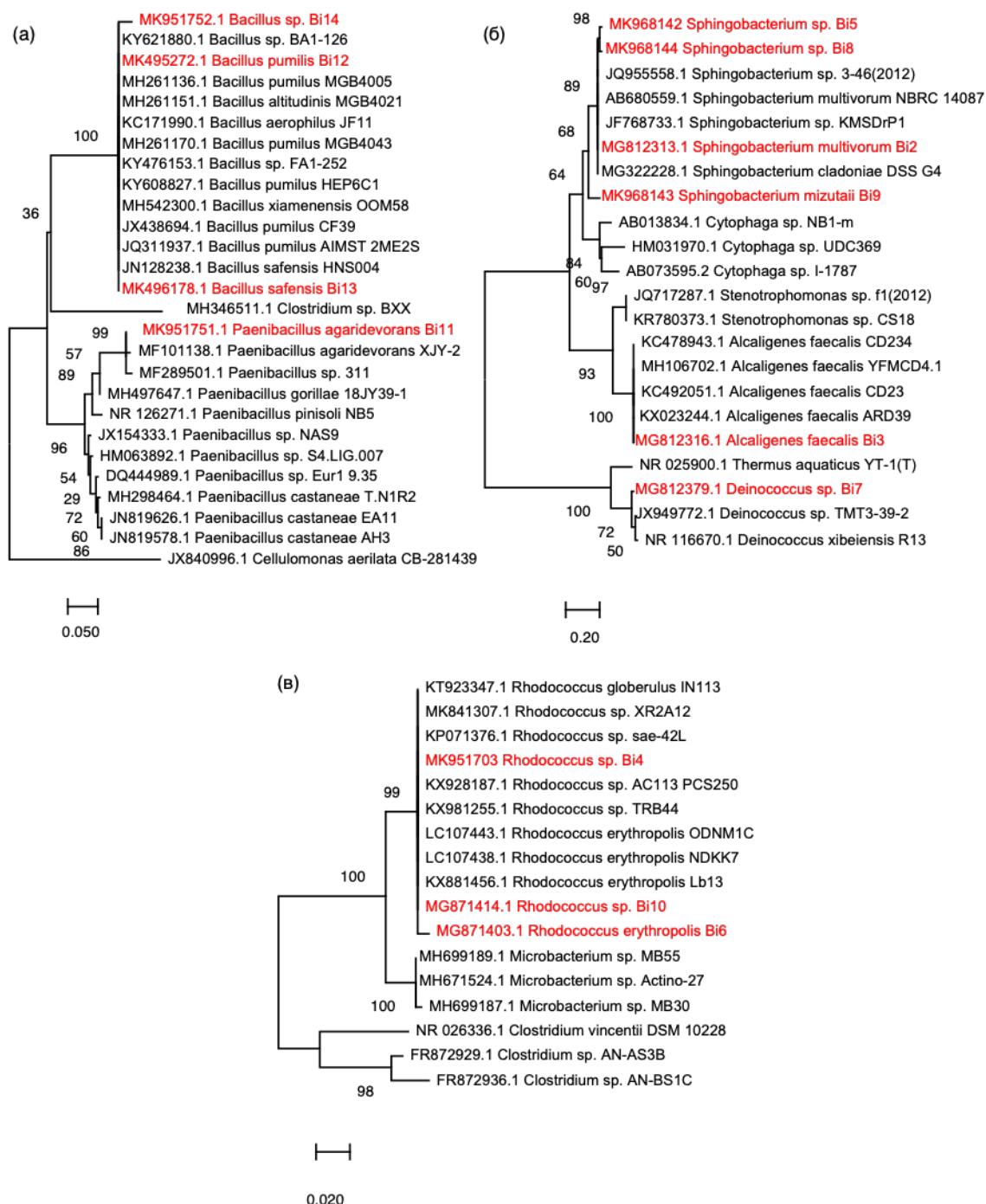


Рисунок 1. Филогенетическое родство штаммов УОБ, выделенных из бензина (а) и из образца топлива ТС-1 (б, в). Оценка точности топологии дерева показана рядом с ветвями в виде процента начальной загрузки (1000 повторов). Масштабная шкала: число замен азотистых оснований на один сайт во множественном выравнивании.

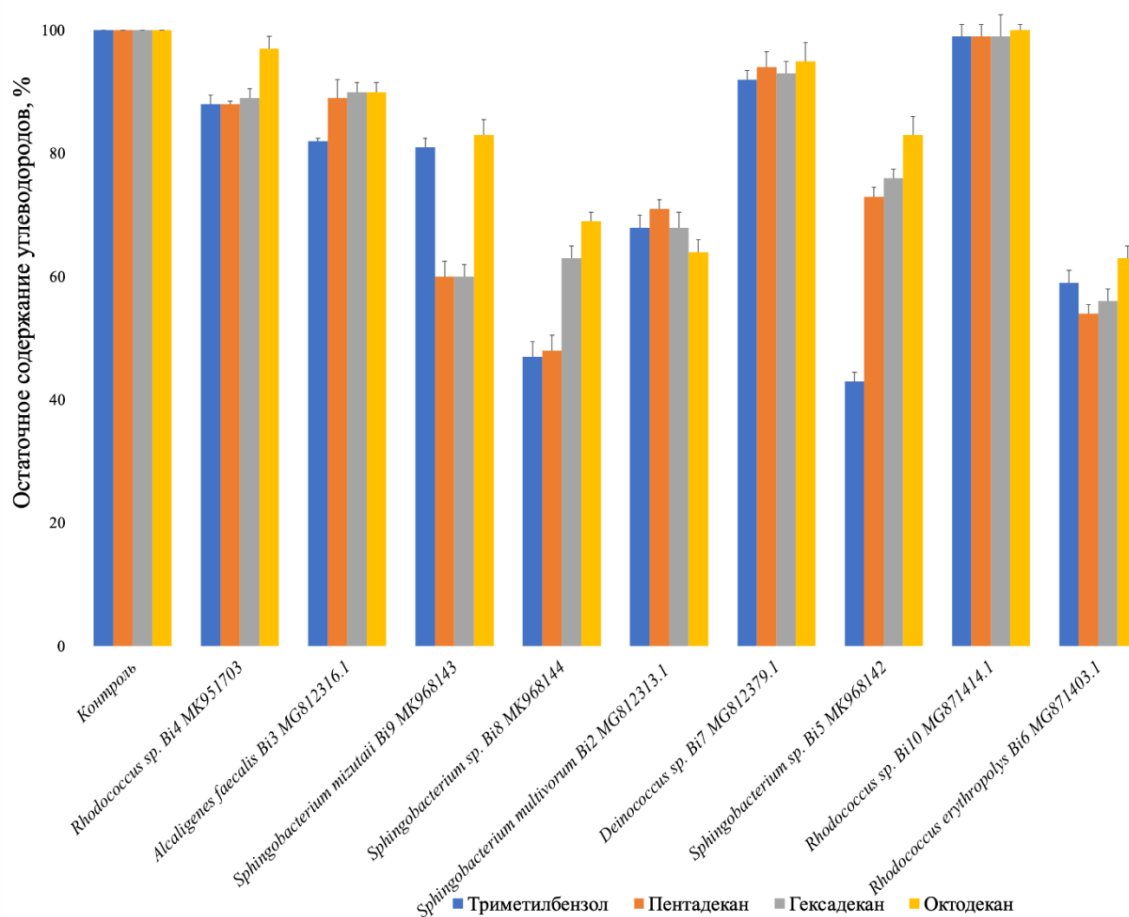


Рисунок 2. Процентное содержание компонентов смеси УВ №1, деградированных культурами, выделенными из топлива ТС-1 за 7 дней культивирования.

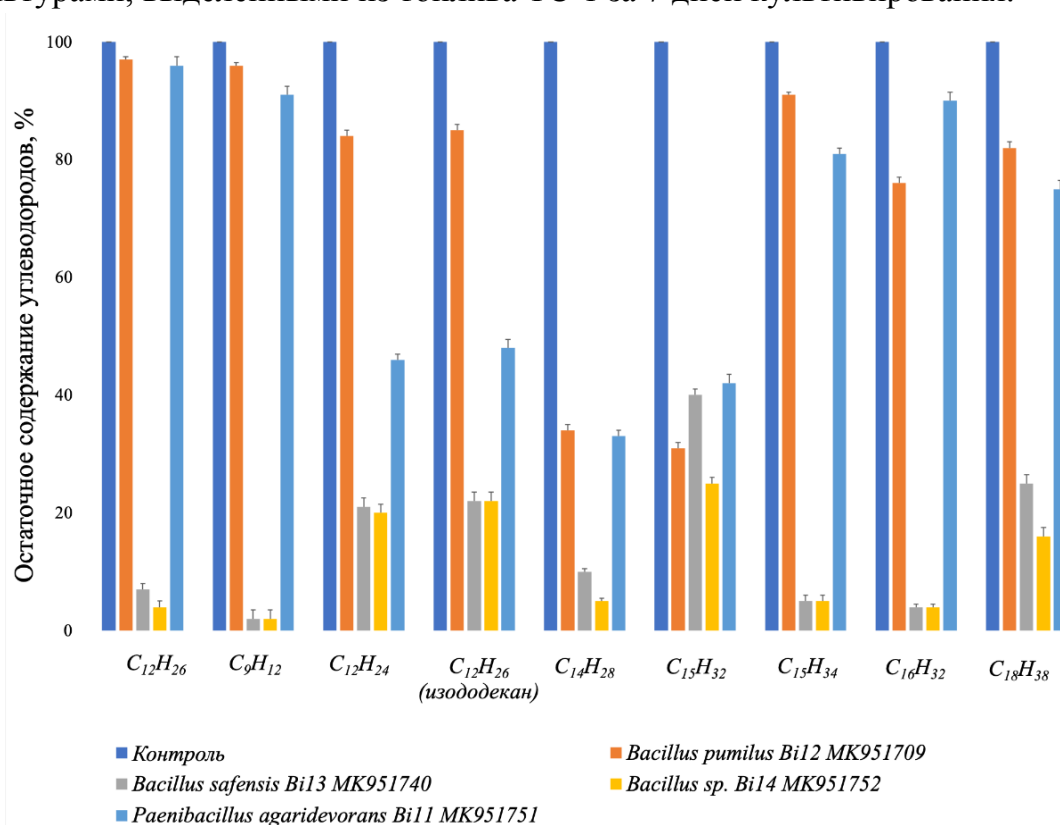


Рисунок 3. Процентное содержание компонентов смеси УВ №2, деградированных культурами, выделенными из бензина АИ-95 за 7 дней культивирования.

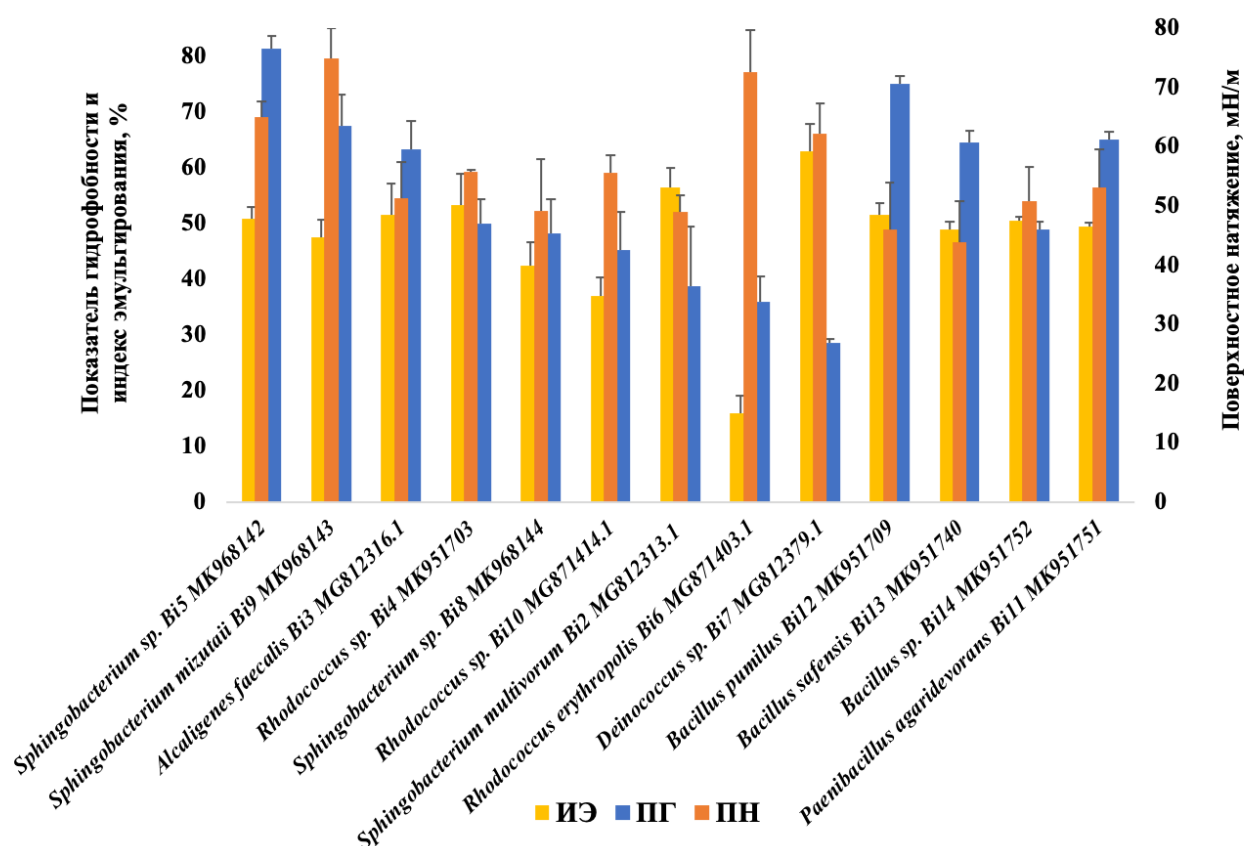


Рисунок 4. Определение поверхностного натяжения (ПН), эмульгирующей активности (ЭА) и показателя гидрофобности (ПГ) штаммов УОБ, выделенных из топлива ТС-1. ПН среды без клеток УОБ - 70 мН/м.

Детекция генов синтеза биоПАВов у выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий. Изучено наличие у выделенных штаммов УОБ генов *RhlA* и *spf0*, отвечающих за синтез биосурфактантов рамнолипидной и липопептидной природы, соответственно. Все выделенные штаммы грамположительных бактерий, кроме *Rhodococcus* sp. Bi10, содержат ген *spf0*, отвечающих за синтез биосурфактантов липопептидной природы, характерный для представителей р. *Bacillus* и некоторых других грамположительных бактерий (Satpute, 2016). Известно, что бактерии р. *Rhodococcus* синтезируют также и трегалолипиды, продукция которых, связана с наличием гена *AlkB* (Inaba et al., 2013). Все штаммы, выделенные из топлива ТС-1, кроме штамма *Deinococcus* sp. Bi7, содержат ген *AlkB*, и, возможно, синтезируют ПАВы данной группы. Все штаммы грамотрицательных бактерий, выделенные из образца топлива ТС-1, характеризуются наличием гена *RhlA*, отвечающего за синтез рамнолипидных биоПАВов (Kumar, 2018). Таким образом, способность некоторых из выделенных штаммов бактерий синтезировать биоПАВы подтверждается наличием генов *RhlA*, *AlkB* и *spf0*.

Изучение способности штаммов УОБ к росту на различных УВ. В качестве единственного источника углерода в минеральную среду вносили следующие УВ:

н-алканы (изооктан, ундекан, гексадекан), ароматические (бензол, бифенил), полиароматические (нафталин, фенантрен, антрацен), НП (дизельное топливо, ТС1) 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).

Штаммы УОБ р. *Rhodococcus* отличаются по способности использовать разные типы УВ: *Rhodococcus* sp. Bi 4 активно использует н-алканы и НП. Штамм *R. erythropolis* Bi6 наиболее активно использует НП. Штаммы *Rhodococcus* sp. Bi10 и *A. faecalis* Bi3 с одинаковой активностью используют все типы модельных УВ. Представители рода *Sphingobacterium* менее активны в использовании н-алканов, ароматических и полиароматических УВ, чем представители р. *Rhodococcus*. *S. multivorum* Bi2 слабо использует топлива (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. *S. mizutaii* Bi9 и *Sphingobacterium* sp. Bi8 наиболее активные из изученных штаммов в отношении использования всех типов УВ.

Deinococcus sp. Bi7 обладает избирательным отношением к разным типам УВ. Использование н-алканов сопоставимо с активностью использования н-алканов другими выделенными штаммами. Использование ароматических и полиароматических УВ происходит менее активно (причем нафталин *Deinococcus* sp. Bi7 не используется вовсе), а нефть и ДТ данный штамм использует с наименьшей активностью из всех выделенных УОБ. Если сопоставить данные по измерению показателей ПН, ЭА и гидрофобности (рис. 4) с субстратной специфичностью штаммов (рис. 4), можно отметить, что для штамма *Sphibgobacterium* sp. Bi8 наблюдается корреляция между использованием различных видов субстратов и образованием ПАВ, которая у данного штамма выражена больше, чем у остальных.

Выделение изолятов микромицетов из образца топлива ТС-1. Всего из исследованных образцов топлива с видимыми признаками контаминации было выделено шесть моноспоровых культур микромицетов. Все они были получены из образца реактивного топлива ТС-1. В совокупности, основываясь на морфологическом анализе и характеристиках колоний грибов, полученные микромицеты относятся к аскомицетам порядка Eurotiales: *Talaromyces amestolkiae* (рис. 5а, д), *Penicillium chrysogenum* (рис. 5б, е), *Aspergillus sydowii* (рис. 5в, ж) и *T. rugulosus* (рис. 5г, з)⁴.

⁴ Автор выражает благодарность 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.

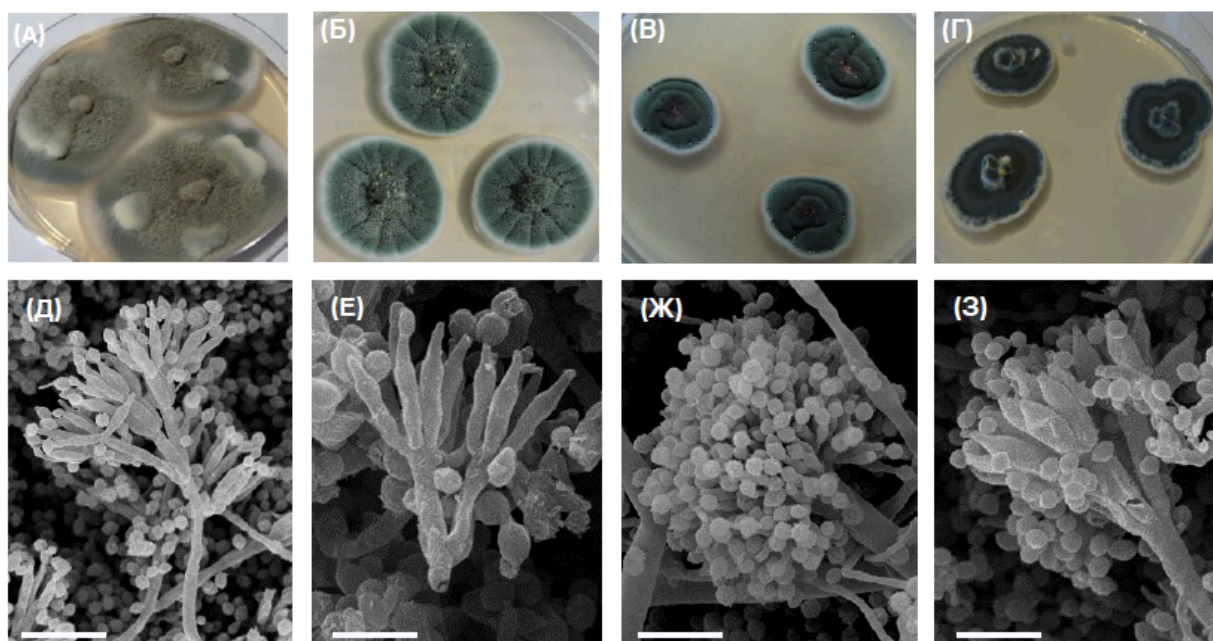


Рисунок 5. Колонии выделенных микромицетов на твердой питательной среде на 7 сутки культивирования (А-Г). СЭМ мицелия микромицетов (Д-З), выделенных из авиационного топлива ТС-1. А, Д - *Talaromyces amestolkiae*; Б, Е - *Penicillium chrysogenum*; В, Ж - *Aspergillus sydowii* и Г, З - *Talaromyces rugulosus*.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

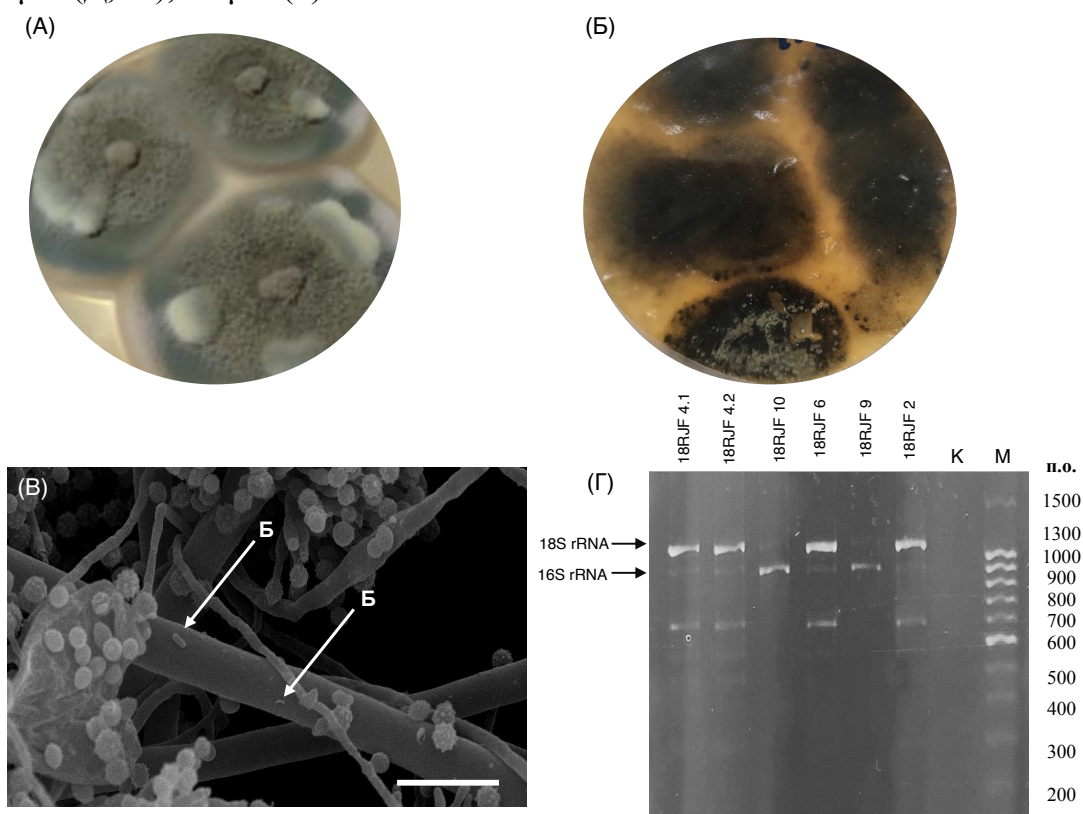


Рисунок 6. Анализ бактериального компонента сообществ, полученных из авиационного топлива ТС-1. А – исходная культура микромицета; Б – лизис мицелия; В – бактерии (Б) на гифах гриба в образце 18RJF9. Шкала: 10 μm ; Г – разделение ПЦР-продукта, полученного с помощью праймеров на *16S/18S pPHK* в агарозном геле, М - 100+ bp DNA ladder, К – отрицательный контроль.

На начальных этапах культивирования колонии грибов были геометрически правильными без видимых признаков повреждения (рис. 6а). В то же время после хранения изолятов микромицетов в течение 30 суток на чашках Петри, в некоторых из них происходил лизис мицелия (рис. 6б). Как правило, лизис грибного мицелия связан с присутствием активно делящихся бактерий (Mitchell, Alexander, 1963).

Ни один из микробиологических подходов к получению культивируемых форм бактерий из биомассы полученных изолятов микромицетов не дал результатов. Хотя 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 ги́фосферой микромицета бактериальные клетки в одном штамме микромицета (рис. 6в).

Образцы биомассы микромицетов, для которых был описан лизис, подвергли анализу методом метабаркодинга на основе гипервариабельного участка V4 гена *16S рPHK*. Большинство прочтений в метагеномных наборах данных были представлены митохондриальной *16S рPHK* гриба из-за ее ортологии с бактериальной *16S рPHK* (Chekanov et al., 2019). По данным поиска гомологов в базе данных NCBI GenBank наибольшая гомология считываний наблюдалась у родов *Talaromyces*, *Penicillium* и *Aspergillus* (покрытие 98-100%, 99-100%). Нуклеотидные последовательности секвенированного фрагмента депонированы в международную базу данных Genbank, им присвоены следующие номера: MW393516, MW393517, MW393518, MW393519, MW393520, MW393521.

ПЦР-анализ по гену *16S/18S рPHK* биомассы микромицетов выявил наличие двух ампликонов (рис. 6г) 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 рPHK*, тогда как фрагмент 1250 п.о. - эукариотической *18S рPHK* (полученной в результате неспецифического отжига праймеров с эукариотической *18S рPHK*). В биомассе изолята 18RJF2 не наблюдалось продукта, соответствующего 900 п.о. Таким образом, биомасса пяти из шести образцов микромицетов, выделенных из реактивного топлива ТС-1, содержала как бактерии, так и микромицеты и представляла собой микромицетно-бактериальные сообщества.

16S рPHK метагеномное исследование сообщества микромицетов биомассы изолятов 18RJF4.1; 18RJF4.2; 18RJF6; 18RJF9; 18RJF10, содержащих бактерии, показало отсутствие архей и наличие четырех преобладающих бактериальных филумов: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes (рис. 7а).

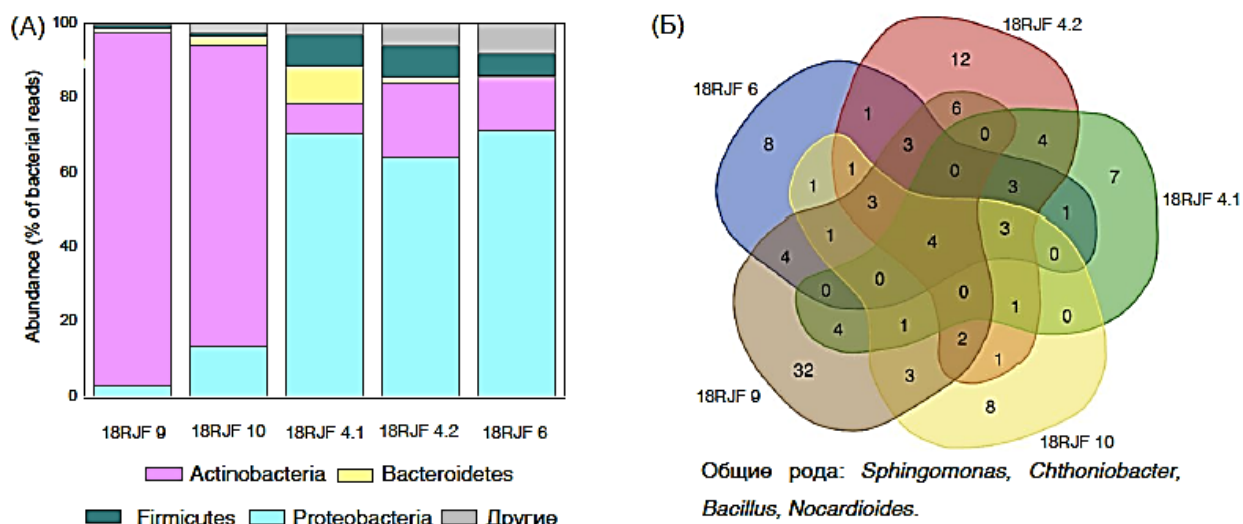


Рисунок 7. А – преобладание бактериальных филумов в сообществах биомассы микромицетов, полученных на основе секвенирования библиотек *16S rRNA*. Показан процент бактериальных прочтений NGS, относящихся к каждому филуму (от всех прокариотических прочтений), «другие» - не идентифицированные сиквенсы. Б – число общих родов в сообществах на основании метагеномного анализа.

Подавляющее большинство бактерий во всех образцах принадлежали к грамтрицательным кладам. Изолят 18RJF4.2 имел самый высокий показатель представленности филума 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. Изученные сообщества биомассы изолятов микромицетов содержали четыре общих рода бактерий: *Sphingomonas*, *Chthoniobacter*, *Bacillus*, *Nocardioides* (рис. 7б). В совокупности данные метабаркодинга свидетельствуют о том, что поврежденное топливо ТС-1 характеризуется типичной таксономической структурой нефтеразлагающего бактериального сообщества. 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.

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 раздела фаз. Изоляты микромицетов (микромицетно-бактериальные ассоциации), можно разделить на 3 группы в

зависимости от их способности использовать в процессе роста 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). 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.

Моделирование биополимерного материала на основе выделенных штаммов УОБ. Для получения биополимеров, использовали полимерную нетканую матрицу на основе сополимера акрилонитрила-метилметакрилата (СПАН), в которую при формовании был добавлен растительный наполнитель – свекольный жом (Ivanova et al., 2019) и штаммы *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 имеющие контрастную морфологию клеток и сходную активность в использовании компонентов модельной смеси УВ №1. При этом штамм *Deinococcus* sp. Bi7 имел самый высокий показатель ИЭ среди выделенных штаммов УОБ (рис. 4).



Рисунок 8. Фрагмент полимера СПАН с иммобилизованными *Ochrobactrum* sp. Bi1 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.

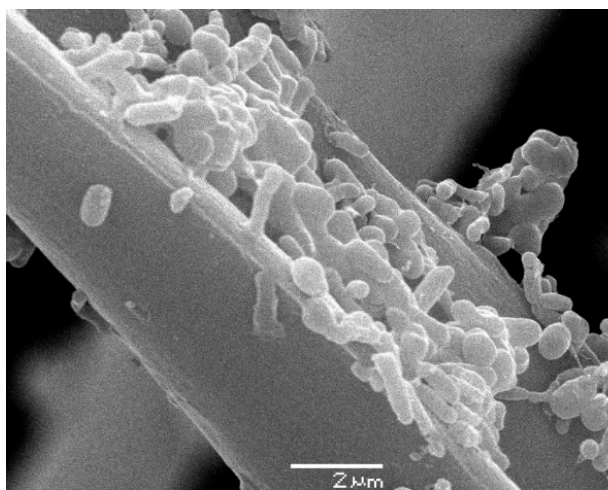


Рисунок 9. Фрагменты волокон СПАН-свекольный жом 25% с иммобилизованными клетками смешанной культуры *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7. Полость в волокне матрицы, заполненная микроколониями клеток ассоциации *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7 (21-е сутки), клетки бактерий интегрированы во внеклеточный полимерный матрикс.

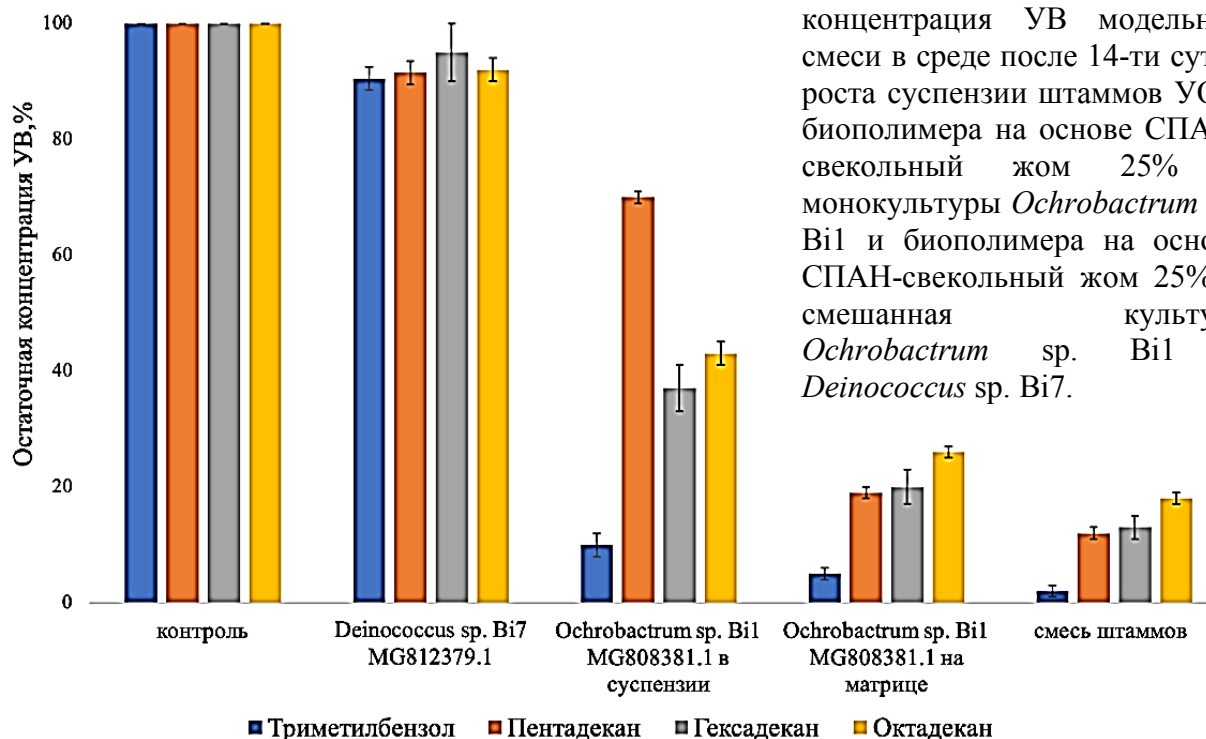


Рисунок 10. Остаточная концентрация УВ модельной смеси в среде после 14-ти суток роста суспензии штаммов УОБ, биополимера на основе СПАН-свекольный жом 25% + монокультуры *Ochrobactrum* sp. Bi1 и биополимера на основе СПАН-свекольный жом 25% + смешанная культура *Ochrobactrum* sp. Bi1 и *Deinococcus* sp. Bi7.

При иммобилизации моно- и смешанной культуры УОБ на полимерном сорбенте наблюдается активная колонизация поверхности волокон и межволоконного пространства полимерной матрицы бактериальными клетками, формирование микроколоний, образование на поверхности волокон биопленки и микрофлуккул в межволоконном пространстве (рис. 8, 9). Как видно на рисунке 10, сорбент на основе СПАН+монокультура *Ochrobactrum* sp. Bi1 проявляет высокую активность в процессе биodeградации триметилбензола. Степень его биodeградации составляла около 60% на 7-е сутки, 80% на 14-е сутки и 93% на 21-е сутки. Биodeградация н-алканов биополимером в эти же сроки составляла около 20% на 7-е сутки, 30% на 14-е сутки, и 55% для н-пентадекана, около 40% для н-гексадекана и н-октадекана на 21-е сутки (учитывая УВ, присутствующие в полимерной матрице). При иммобилизации смешанной культуры штаммов УОБ на полимерном сорбенте наблюдали деградацию триметилбензола аналогичную полимерной матрице с *Ochrobactrum* sp. Bi1, а показатели биodeградации н-алканов были значительно выше. Степень биodeградации триметилбензола составляла около 50% на 7-е сутки, 80% на 14-е сутки, и 93% на 21-е сутки. Биodeградация н-алканов данным биополимером составляла около 30% на 7-е сутки, 50% на 14-е сутки, и более 60% на 21-е сутки (учитывая УВ, присутствующие в полимерной матрице). Как видно, бактерии в составе биополимера, будучи защищенными полимерной матрицей, способны более эффективно деградировать высокотоксичные ароматические соединения, чем свободноживущие бактерии. Таким образом, синтезированные полимерные сорбенты, показали высокую активность в очистке загрязненной УВ модели морской воды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ микробиома УОМ изученных НП показал, что в разных видах топлива формируются специфические сообщества УОМ, одни представители которых способны активно метаболизировать различные фракции УВ, тогда как другие более проявляют способность к синтезу биоПАВов различной природы. При этом состав активных деструкторов УВ таких сообществ зависит от качественного состава НП. 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. 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; Ножевникова 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 выживание и поддержание гомеостаза. Нами отмечено формирование биопленок УОМ в изученных образцах топлива и при иммобилизации смешанной культуры штаммов *Ochrobactrum* sp. Vi1 и *Deinococcus* sp. Vi7 в полимерном нетканом сорбенте в присутствии модельной смеси УВ. Биополимеры, синтезированные на основе этих материалов, проявляют высокую активность при биodeградации 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 исследованных образцов топлива выделено и идентифицировано 20 штаммов микроорганизмов, 14 из которых относятся к эубактериям, а 6 к мицелиальным грибам. Культивируемое микробное сообщество реактивного топлива ТС-1 представлено 6 штаммами микромицетов, относящихся к анаморфам аскомицетов и 10 штаммами бактерий. Сообщество УОБ бензина АИ-95 представлено 4 штаммами грамположительных бактерий. Впервые из нефтепродуктов выделены и описаны УОБ относящиеся к р. *Deinococcus*.
- 2) По способности к росту в присутствии углеводов (нефти и нефтепродуктах) все штаммы УОМ разделены на 3 группы: 1) универсальные деструкторы, 2) потенциальные деструкторы и 3) частично адаптированные к среде и/или случайные. К первой группе отнесены микроорганизмы с высокой способностью к деградации топлива и УВ разных групп. Ко второй – микроорганизмы, эффективно деградирующие отдельные группы УВ. К третьей – все остальные исследованные штаммы микроорганизмов.
- 3) 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.
- 4) Выделенные штаммы УОБ, существенно различались по наличию исследованных генов деградации н-алканов и синтеза различных классов биоПАВов. Штаммы *R. erythropolis* Bi6, *Rhodococcus sp.* Bi4 и *A. faecalis* Bi3 содержали 4 гена деградации н-алканов - *alkB*, *Cyp153*, *Alk1* и *Alk3*. Штаммы *Deinococcus sp.* Bi7, *Bacillus pumilus* Bi12, *Bacillus safensis* Bi13 и *Bacillus sp.* Bi14 не содержат исследуемые гены. Остальные штаммы содержали как минимум один из изученных генов. Все штаммы грамположительных бактерий, кроме *Rhodococcus sp.* Bi10, содержали ген *spf0*, отвечающий за синтез биоПАВов липопептидной природы, все грамотрицательные штаммы бактерий содержали ген *RhlA* – отвечающий за синтез рамнолипидов.
- 5) Впервые показано, что в составе биомассы мицелия штаммов микромицетов, способных к росту на топливе, присутствуют некультивируемые формы бактерий.
- 6) УОБ инкорпорированные в нетканом полимерном сорбенте, как в моно-, так и в смешанной культурах способны более эффективно деградировать УВ, чем в

планктонной форме. Методами СЭМ и цитохимии показано, что как монокультуры, так и смешанные культуры УОБ активно заселяют поверхности волокон полимерного материала, формируя биопленки, и межволоконного пространства, образуя флоккулы. В составе биопленок УОБ располагаются во внеклеточном полимерном матриксе, содержащем кислые полисахариды.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science и/или RSCI:

- 1) 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. IF РИНЦ: **0,436**. IF SJR: **0,104**.
- 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. [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. – №. 4. P. 420-426.] DOI: 10.1134/S0028242119030080. IF РИНЦ: **1,146**. IF SJR: **0,155**.
- 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. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-41-55. IF РИНЦ: **0,557**. IF SJR: **0,119**. **Q4**.
- 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. DOI: 10.3390/jof7010043. IF 2019: **4,621**. IF SJR: **1,416**. **Q1**.

Прочие публикации:

- 1) **Shapiro T.**, Dolnikova, G., Ivanova E., Lobakova E. Bacterial biofilm formation in fuel //Limnology and Freshwater Biology. – 2020. – P. 1023-1025.
- 2) **Шапиро Т.Н.**, Лобакова Е.С. Детекция генов синтеза биосурфактантов штаммами бактерий, изолированных из топлив. //Сборник тезисов конференции «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии». М.: МАКС Пресс, 2019. Москва, 23-24 декабря 2019. – С. 134.
- 3) **Шапиро Т.Н.**, Дольникова Г.А., Лобакова Е.С. Детекция генов окисления н-алканов у штаммов бактерий, выделенных из образцов автомобильного и реактивного топлив. //Сборник тезисов 2-го российского микробиологического конгресса, г. Саранск. – 2019. – С. 56.
- 4) **Шапиро Т.Н.**, Дольникова Г.А., Лобакова Е.С. Грибо-бактериальный консорциум микроорганизмов зараженного реактивного топлива ТС-1. //Сборник тезисов конференции «Микология и альгология России. XX – XXI век: смена парадигм», г. Москва. – 2018. – С. 239.
- 5) **Shapiro T.N.** et al. Fungi-bacterial association of contaminated jet fuel TS-1. //V Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics and Biodiversity Biobanking (MolPhy-5) ». М.: Torus press, 2018. – P. 61.
- 6) Джабраилова Х.С., Иванова Е.А., Лобакова Е.С., Идиатулов Р.Ф., **Шапиро Т.Н.**, Санджиева Д.А., Дедов А.Г. Биокompозитные материалы для очистки акваторий от углеводородных загрязнений. //Химическая технология и биотехнология новых материалов. – 2018. – С. 93.
- 7) **Шапиро Т.Н.** Углеводородокисляющие бактерии реактивного топлива ТС1. //В кн.: материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018». М.: МАКС Пресс, 2018. Москва, 9 -13 апреля 2018.
- 8) **Шапиро Т.Н.** Углеводородокисляющие микроорганизмы горюче-смазочных материалов. //В кн.: материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов -2017». М.: МАКС Пресс, 2017. Москва, 10-14 апреля 2017.