

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПУЩИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЕСТЕСТВЕННО-НАУЧНЫЙ ИНСТИТУТ»

*На правах рукописи*

ДЕЛЕГАН  
ЯНИНА АДАЛЬБЕРТОВНА

**ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ УГЛЕВОДОРОДОВ  
НЕФТИ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
кандидат биологических наук  
А.Е. Филонов

Пушино – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	6
ВВЕДЕНИЕ .....	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА .....	9
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.....	9
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ .....	10
ПУБЛИКАЦИИ .....	11
СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ .....	11
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	12
2.1. Проблемы и актуальность ремедиации территорий, загрязненных нефтью, в регионах с жарким климатом .....	12
2.1.1. Особенности состава нефти, добываемой на территориях с жарким климатом. ....	13
2.1.2. Методы очистки от нефтяных загрязнений, применяемые на территориях с жарким климатом .....	14
2.2. Методы биоремедиации.....	17
2.2.1. Факторы, влияющие на биоремедиацию в условиях жаркого климата .....	17
2.2.2. Особенности микроорганизмов, обнаруженных и применяемых при биоремедиации в условиях повышенных температур, их разнообразие и таксономическая принадлежность .....	20
2.3. Организация метаболических путей деструкции углеводов термотолерантными штаммами .....	23
2.3.1. Микробная деградация алифатических углеводов при повышенных температурах .....	24
2.3.2. Микробная деградация ароматических углеводов при повышенных температурах .....	28
2.4. Поверхностно-активные соединения, продуцируемые термотолерантными нефтеокисляющими бактериями.....	33
2.4.1. Продукция биосурфактантов грамотрицательными термотолерантными бактериями.....	34
2.4.2. Продукция биосурфактантов грамположительными термотолерантными бактериями.....	36

2.5. Применение термотолерантных бактерий для ремедиации нефтезагрязненных грунтов в регионах с жарким климатом .....	40
2.5.1. Биостимуляция органическими и неорганическими удобрениями как инструмент ремедиации нефтезагрязненных экосистем в жарком климате .....	41
2.5.2. Биоаугментация загрязненных экосистем консорциумами бактерий-нефтедеструкторов.....	43
2.5.3. Биопрепараты, которые могут быть применены для очистки нефтезагрязненных участков при повышенных температурах .....	46
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	51
2.1. Бактериальные штаммы, среды и условия культивирования .....	51
2.1.1. <i>Среды, субстраты, условия культивирования.....</i>	51
2.1.2. <i>Выделение нефтеокисляющих бактерий из природных образцов .....</i>	51
2.2. Анализ зависимости ростовых параметров (удельной скорости роста и численности) термотолерантных микроорганизмов от температуры .....	52
2.3. Операции с ДНК и молекулярные методики .....	53
2.3.1. <i>Выделение ДНК и ПЦР-амплификация фрагментов .....</i>	53
2.4. Определение физиологических характеристик термотолерантных бактерий .....	55
2.4.1. <i>Определение спектра утилизируемых субстратов изучаемых штаммов.....</i>	55
2.4.2. <i>Изучение способности штаммов к росту и деградации дизельного топлива в присутствии различных концентраций хлорида натрия .....</i>	55
2.4.3. <i>Изучение способности штаммов-нефтедеструкторов к росту и деградации углеводов нефти при различных значениях pH среды.....</i>	55
2.4.4. <i>Определение способности термотолерантных бактерий утилизировать нефть при различных ее концентрациях в среде.....</i>	55
2.4.5. <i>Определение нефтеокисляющей активности микроорганизмов жидкой среде .....</i>	55
2.5. Составление консорциума термотолерантных штаммов и изучение процесса деструкции нефти консорциумом в модельных системах .....	56
2.5.1. <i>Изучение совместимости термотолерантных штаммов .....</i>	56
2.5.2. <i>Составление консорциума термотолерантных штаммов и оценка эффективности консорциума.....</i>	56
2.5.3. <i>Моделирование процесса деструкции нефти консорциумом в грунте .....</i>	56
2.5.4. <i>Анализ фракционного состава остаточной нефти в модельных системах относительно ее исходного состава в результате культивирования</i>	

термотолерантных бактерий и консорциума в жидкой среде с нефтью при 24°C и 45°C .....	57
2.6. Изучение способности бактерий продуцировать поверхностно-активные вещества	58
2.6.1. Измерение индекса эмульгирования .....	58
2.6.2. Измерение поверхностного натяжения .....	59
2.6.3. Экстракция гликолипидных ПАВ.....	59
2.6.4. Тонкослойная хроматография смесей гликолипидных ПАВ .....	59
2.6.5. Очистка биоПАВ методом колоночной хроматографии .....	60
3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ .....	61
3.1. Отбор термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов и определение их основных ростовых параметров .....	61
3.2. Идентификация и филогенетическая характеристика термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов .....	63
3.3. Анализ способности термотолерантных культур утилизировать углеводороды и продуцировать биоПАВ.....	68
3.3.1. Субстратная специфичность бактерий.....	68
3.3.2. Детекция, секвенирование и анализ генов алкан монооксигеназ у <i>Gordonia</i> и <i>Rhodococcus</i> .....	71
3.4. Изучение способности штаммов продуцировать поверхностно-активные вещества ...	79
3.5. Отбор наиболее эффективных нефтеокисляющих термотолерантных штаммов и составление бактериального консорциума для ремедиации грунтов в жарком климате.....	83
3.5.1. Физиологическая характеристика штаммов .....	83
3.5.2. Анализ способности бактерий утилизировать нефть при различных температурах в модельных системах и составление консорциумов термотолерантных бактерий .....	85
3.6. Генетические особенности термотолерантных актиномицетов .....	94
3.6.1. Определение локализации генов деструкции алканов у штаммов <i>Gordonia</i> sp. 1D и <i>Rhodococcus erythropolis</i> Paг7 и генов деструкции ПАУ у штамма <i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU .....	94
3.7. Депонирование штаммов, подготовка заявки на патент РФ .....	97
3.7.1. Депонирование культур термотолерантных актиномицетов.....	97
3.7.2. Патентование консорциума термотолерантных актиномицетов для очистки грунтов и вод от нефти в условиях жаркого климата.....	97
ОБСУЖДЕНИЕ.....	98

4.1. Фенотипические и генетические особенности термотолерантных нефтеокисляющих бактерий.....	100
4.1.1. Особенности деструкции алканов термотолерантными гордониями.....	101
4.1.2. Термотолерантные штаммы <i>Rhodococcus</i> как эффективные деструкторы углеводов различной химической природы.....	103
4.2. Биодеструкция нефти наиболее активными термотолерантными нефтеокисляющими штаммами и составление эффективного консорциума для деградации нефти в условиях жаркого климата .....	109
4.2.1. Составление консорциумов термотолерантных актиномицетов и сравнение эффективности деструкции ими нефти.....	111
4.2.2. Оценка деградирующей активности консорциума термотолерантных бактерий в грунте и анализ деградации штаммами консорциума основных фракций нефти .....	115
ВЫВОДЫ .....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	120

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

БТЭК	бензол, толуол, этилбензол, ксилолы
ПАУ	полиароматические углеводороды
ПАВ	поверхностно-активные вещества
E <sub>24</sub>	индекс эмульгирования через 24 часа
КЖ	культуральная жидкость
КОЕ	колониеобразующая единица
ЛБ	среда Лурия-Бертани
ПЦР	полимеразная цепная реакция
рРНК	рибосомальная рибонуклеиновая кислота
ТЕ	трис-ЭДТА буфер
ДТ	дизельное топливо

## **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время нефть остается одним из основных загрязнителей окружающей среды. Особенно интенсивному загрязнению нефтью и продуктами её переработки подвержены территории, где ведется активная добыча нефти и осуществляется её транспортировка. Самоочищение внутри экосистем возможно, однако скорость этого процесса слишком мала и несопоставима с темпами антропогенного загрязнения. В связи с этим для восстановления окружающей среды, нарушенной в результате добычи нефти или аварийных разливов, применяют методы различной природы: механические, химические, физико-химические, биологические.

Большинство известных к настоящему времени методов очистки грунтов и вод от нефти имеют определенные недостатки. Обычно это или высокая стоимость ремедиационной технологии, или негативное влияние на состояние экосистемы и, как следствие, нарушение деятельности аборигенных живых сообществ. Так, например, сжигание нефти загрязняет атмосферу продуктами сгорания углеводородов, внесение детергентов на территорию нефтеразлива приводит к массовой гибели водных организмов, а использование технологии термальной десорбции, несмотря на высокие показатели очистки, разрушает органическое вещество почвы, делая её непригодной для дальнейшего развития микроорганизмов и растений.

Среди известных методов очистки нефтезагрязненных грунтов и вод наиболее безопасным для окружающей среды является биоремедиация – применение нефтеокисляющих микроорганизмов для удаления углеводородов из экосистемы. Одной из разновидностей биоремедиации является стимуляция аборигенных микроорганизмов путем внесения органических или неорганических добавок. Также для очистки нефтезагрязненных территорий используют специально разработанные микробные препараты, включающие эффективные штаммы нефтедеструкторов. Биопрепараты могут быть представлены как монокультурами, так и ассоциациями бактерий.

Несмотря на присутствие на рынке России и стран СНГ препаратов-монокультур, не существует универсальных микробных штаммов, способных одинаково эффективно утилизировать углеводороды всех фракций нефти. В природе в деградацию этого сложного многокомпонентного загрязнителя обычно вовлечена последовательность микроорганизмов, взаимодействующих между собой или обособленно деградирующих различные субстраты, благодаря чему достигается максимально полное удаление нефти из окружающей среды. Таким образом, применение микробных консорциумов позволит повысить эффективность очистки грунтов и вод от нефти.

На рынке России и стран СНГ представлен ряд препаратов для деструкции нефти в условиях умеренного и холодного климата (Белонин с соавт., 1994, RU 2053206; Яненко с соавт., 1993, RU 2039714; Алексеев с соавт, 2007, RU 2337069). Однако для решения проблемы нефтяного загрязнения в жарком климате до сих пор не предложено эффективного подхода. При разработке микробных препаратов и технологии очистки от нефти грунтов и вод в жарком аридном климате следует учитывать, что климат таких регионов характеризуется большими суточными перепадами температур, высокими темпами испарения воды и, как следствие, засоленностью и низкой влажностью грунта. Большинство известных микроорганизмов-нефтедеструкторов не приспособлены к таким условиям, что приводит к снижению эффективности деструкции нефти. Для деструкции нефти в жарком климате целесообразным является применение термотолерантных микроорганизмов, для которых жаркий аридный климат не является стрессовым. Такие бактерии обладают смещенным по сравнению с мезофильными оптимумом роста, а явное подавление роста термотолерантных культур, свидетельствующее о температурном стрессе, отмечается обычно при повышении температуры до 48-50°C. Разработка биопрепаратов на основе консорциумов термотолерантных бактерий и применение их для очистки грунтов и вод может являться перспективным решением проблемы нефтяного загрязнения в жарком климате.

В настоящее время не сформулировано четких критериев отбора микроорганизмов в состав потенциального консорциума. Основными параметрами, которым уделяется внимание при разработке микробных ассоциаций, являются совместимость культур и процент суммарной деструкции нефти. При составлении консорциума, который планируется применять для очистки территорий от нефти в жарком климате, необходимы также данные о способности бактерий утилизировать углеводороды в присутствии соли в среде, максимально возможной концентрации загрязнителя и минимально допустимой влажности грунта. Эта информация позволит оценить затраты на орошение обрабатываемого препаратом участка, а также на снижение концентрации нефти и соли доступными методами.

Целью данной работы являлось исследование особенностей деструкции углеводородов нефти термотолерантными бактериями, физиологических и метаболических свойств этих бактерий, а также разработка консорциума штаммов, способного эффективно деградировать нефть при температурах до 50°C в засоленных водных системах и грунтах с низкой влажностью (10%). Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить термотолерантные бактерии из природных образцов, исследовать их способность к росту на углеводородах, определить физиологические пределы выживаемости. Идентифицировать штаммы.
2. Отобрать эффективные термотолерантные штаммы, утилизирующие нефть как при умеренной (24°C), так и при повышенной (45-50°C) температурах, при различных концентрациях нефти и соли в среде. Исследовать способность бактерий продуцировать поверхностно-активные вещества.
3. Определить локализацию ключевых генов деструкции углеводородов в эффективных штаммах-деструкторах.
4. Составить консорциум термотолерантных штаммов как основу биопрепарата для очистки грунтовых и водных экосистем от нефти в условиях жаркого аридного климата.
5. Определить эффективность деструкции нефти консорциумом в грунтовых и водных системах, моделирующих жаркий аридный климат.

#### НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые выделены термотолерантные нефтеокисляющие штаммы из воды подледного озера в Антарктиде. Эти штаммы были идентифицированы как представители рода *Rhodococcus*.

Был выделен штамм *Gordonia amicalis* 1B, способный расти как на нефти, так и на отдельных углеводородах при температурах до 50°C (оптимум роста 35-37°C).

Впервые наблюдали деструкцию углеводородов штаммами *R. erythropolis* при повышенной (45°C) температуре.

Выявлено, что у представителей вида *R. pyridinivorans* может наблюдаться способность утилизировать как полиароматические углеводороды (ПАУ), так и алканы (линейные и разветвленные), - это показано на примере штамма L5A-BSU. Показано, что гены деструкции нафталина у штамма L5A-BSU располагаются в составе мобильного генетического элемента (МГЭ), предположительно, в составе хромосомы. Эти гены могут перемещаться в родственные штаммы (были получены  $\text{Nah}^+$  рекомбинанты штамма *R. erythropolis* Pa7).

#### НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В ходе выполненного в работе скрининга бактерий-нефтедеструкторов из коллекций Лаборатории биологии плазмид (ИБФМ РАН) и кафедры микробиологии БГУ (г. Минск, Беларусь) нами отобрано 18 термотолерантных штаммов. Штаммы

утилизовали нефть и отдельные углеводороды (алканы, ПАУ) при температурах до 50°C. Штаммы были идентифицированы как представители родов *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Deinococcus*.

Разработан консорциум термотолерантных нефтеокисляющих актиномицетов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, который может быть использован как основа биопрепарата для деструкции нефти и нефтепродуктов в регионах с жарким аридным климатом. Полученная микробная ассоциация утилизирует нефть и нефтепродукты при уровне загрязнения до 10% и температурах 20-50°C, в засоленных (до 7% соли) водных и грунтовых системах, в том числе с низкой (около 10%) влажностью грунта.

Выявлено, что штаммы консорциума утилизируют основные фракции нефти (гексановую, бензольную, спирто-бензольную), при росте смешанной культуры не наблюдается взаимного ингибирования и конкуренции штаммов. Показана эффективность этой бактериальной ассоциации для очистки нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях, моделирующих жаркий аридный климат. Консорциум утилизировал нефть более эффективно, чем монокультуры входящих в него штаммов по отдельности.

Подана заявка на патент РФ №2015143402 «Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата». Приоритет 13.10.2015. Поиск по базам данных патентов РФ, Казахстана и Азербайджана показал, что подобные разработки на рынке отсутствуют.

#### АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертации были доложены на конференциях: 8th International Conference, Oberurgl – Tyrol, Innsbruck, Austria, 22-26 April 2012; Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2012», Тула, 15 октября 2012; VIII Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 29-31 октября 2012; XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013», Москва, 8-13 апреля 2013; 17 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 22-26 апреля 2013; Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2013», Тула, 1-2 октября 2013; IX Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 21-23 октября 2013; Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни», Москва, 18-20 марта 2014; XXI Международная конференция студентов,

аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», Москва, 7-11 апреля 2014; 18 международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 21-25 апреля 2014; Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014», Тула, 2-3 октября 2014; 6<sup>th</sup> FEMS Congress, Maastricht, 7-11 June 2015; IX Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», Минск, 7-11 сентября 2015.

### **ПУБЛИКАЦИИ**

По материалам диссертации опубликована 21 работа, в том числе 6 статей, заявка на получение патента РФ на изобретение и 14 тезисов.

### **СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ**

Диссертация включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы». Работа изложена на 153 страницах, включает 19 таблиц и 18 рисунков. Список литературы состоит из 384 источников, из них 34 отечественных и 350 зарубежных работ.

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

2.1. Проблемы и актуальность ремедиации территорий, загрязненных нефтью, в регионах с жарким климатом

Нефть добывают во всем мире. Суточный мировой расход нефти с 63 млн баррелей в 1980 году увеличился до 85 млн баррелей в 2006 году (Abugas, 2010). Согласно прогнозам, мировой спрос на нефть к 2030 году возрастет на 37% относительно 2006 года и достигнет 118 млн баррелей в сутки. При таких объемах потребления экологические проблемы, вызываемые попаданием нефти в окружающую среду, достигнут критического уровня. Основному риску загрязнения нефтью и нефтепродуктами подвержены регионы, где располагаются месторождения и ведется добыча нефти. Около 60% мировых запасов нефти находится на территориях стран с жарким климатом, где специфика природных, в частности, температурных условий вынуждает более тщательно подходить к выбору метода ремедиации загрязненных земель (Piyadasa, 2014; Veerasingam et al., 2015).

Больше половины добываемой в мире нефти приходится на Персидский залив, побережье которого принадлежит территориям Катара, Бахрейна, Омана, Объединённых Арабских Эмиратов, Саудовской Аравии, Кувейта, Ирака и Ирана. Объем нефти, потребляемой в странах Среднего Востока, в 2013 году составлял 8 млн баррелей в сутки (Ссылка 5).

Резкое ухудшение экологической ситуации в Персидском заливе в 1990-х гг. связано с войной на территории Кувейта. Крупномасштабные пожары на более чем 800 нефтяных скважинах привели к загрязнению продуктами сгорания площади около 1722 км<sup>2</sup>. Нефтяные разливы и пожары во время войны в заливе затронули территорию не только Кувейта, но также Ирака, Саудовской Аравии и Бахрейна (de Moga et al., 2010). Разлившаяся нефть из поврежденных скважин собиралась в озера, занявшие площадь около 49 км<sup>2</sup>. В общей сложности во время войны в заливе на территориях и акваториях Кувейта разлилось 1.6 млн тонн нефти (Named, 2004; Michel, 2011; Farrington, 2014; Freije, 2015).

Состояние вод и прибрежного грунта в Персидском заливе, ухудшившееся после войны (1990-1991), привлекло внимание к проблеме восстановления окружающей среды в регионе. Принимая во внимание особенности климата (высокие среднесуточные температуры, засоленность грунтов и вод, а также низкую влажность грунта), были предприняты попытки разработки усовершенствованных методов восстановления экосистем. На побережье залива до настоящего времени ведется мониторинг состояния

микроорганизмов и морских животных (моллюсков, устриц) (Kenworthy et al., 1993; Al-Sayed et al., 1994; Tolosa et al., 2005; de Mora et al., 2010; Naser, 2010).

Специфические климатические условия ограничивают эффективность применения большинства известных ремедиационных методов в регионах с жарким климатом. В связи с этим проблема разработки и применения технологий, адаптированных к высоким среднесуточным температурам, высокому содержанию соли и низкой влажности грунта, остается по-прежнему актуальной для многих стран, в том числе для России и ряда республик СНГ. При разработке технологий очистки грунтов и вод в жарком климате необходимо учитывать не только климатические особенности региона, но также свойства нефти как загрязнителя.

2.1.1. Особенности состава нефти, добываемой на территориях с жарким климатом

Выбор метода восстановления загрязненного грунта и воды в значительной степени зависит от состава нефти, который в зависимости от места добычи может существенно различаться. Так, в настоящее время Венесуэла, Кувейт и Иран добывают тяжелую нефть с высоким содержанием серы, в то время как Нигерия, ОАЭ, Ангола и Ливия являются поставщиками высококачественной светлой нефти, почти не содержащей серу. Добыча тяжелой нефти связана с риском коррозии и поломок техники по причине высоких концентраций серы, солей и органических хлоридов в нефти (Bagdasarian et al., 1996; Veazey, 2002). В свою очередь, светлая легкая нефть также представляет опасность, поскольку она обогащена летучими токсичными компонентами (Tsaprailis, 2014).

Нефть Саудовской Аравии по составу находится между легкой и средней и имеет относительно высокую плотность (Stratiev et al., 2010). Крупнейшим месторождением Саудовской Аравии является Гавар, где добывают нефть с плотностью  $0,85 \text{ г/см}^3$  и содержанием серы 1,66%. Также эксплуатируются фонтанирующие скважины региона Зулуф (плотность нефти  $0,87 \text{ г/см}^3$ , 2,5% серы), колодцы Манифа ( $0,88 \text{ г/см}^3$ , 3,0% серы) и Сафания-Хафджи ( $0,87\text{-}0,89 \text{ г/см}^3$ , 2-3% серы). Высококачественная нефть с месторождения Шайба (плотность  $0,82 \text{ г/см}^3$ ) практически не содержит серы и характеризуется высоким содержанием бензиновых фракций. Легкая персидская нефть имеет следующий состав (%): 46,5 – насыщенных соединений, 32,23 – ароматических и 21,27 – полярных компонентов. К полярным компонентам относят смолы и асфальтены, которые часто считают трудноразлагаемыми для биодegradации (Milne et al., 1998).

Нефть, добываемая на территории Кувейта, имеет плотность  $0,87\text{-}0,88 \text{ г/см}^3$  и содержание серы 1-2%. На территории месторождения Раудхатайн на севере Кувейта

добывают нефть с плотностью 0,88-0,90 г/см<sup>3</sup>, в Румайла (на границе Кувейта и Ирака) – нефть с плотностью 0,85-0,87 г/см<sup>3</sup>. Экспортная нефть Кувейта (0,86 г/см<sup>3</sup> и 2,7% серы) представляет собой смесь компонентов с различных месторождений (Shalaby, 2005).

Среди стран СНГ, территории которых расположены в регионах с жарким климатом, лидером по объемам добычи нефти является Казахстан. Крупнейшими нефтяными месторождениями на территории этого государства являются Тенгиз, Карашыганак, Узень, Жанажол и Кумколь. Плотность добываемой нефти в основном колеблется от 0.79 до 0.82 г/см<sup>3</sup>, содержание смол – от 1.14% (Тенгиз) до 8.2% (Кумколь), серы – 0.5-1.1%. Нефть месторождения Узень отличается по характеристикам: она имеет бóльшую плотность (0.84-0.87 г/см<sup>3</sup>), содержание смол до 20% и серы до 2%.

Месторождения юга России в основном сосредоточены в районе Астрахани (Сарматское, им. Юрия Корчагина, Великое), Краснодарском крае (Анастасиевско-Троицкое) и в Чечне (Гудермесское, Малгобек-Горское, Старогрозненское). Нефть Анастасиевско-Троицкого месторождения имеет плотность 0.83-0.91 г/см<sup>3</sup> и содержание серы до 0.3%, нефть Гудермесского месторождения – плотность 0.85 г/см<sup>3</sup>, содержание серы 0.3-0.4%.

2.1.2. Методы очистки от нефтяных загрязнений, применяемые на территориях с жарким климатом

Существуют различные механические, термические, физические, химические и биологические методы очистки территорий от разливов нефти. Исторически первым является сжигание, которое до недавнего времени часто использовалось для быстрого удаления нефти с поверхности воды (Farahani, 2013; Adamopoulou et al., 2015). Сжигание нефти действительно устраняет разлив быстро и эффективно, но следствием использования этого метода является дополнительное загрязнение окружающей среды. При горении высвобождаются сера и азот, которые могут вызывать кислотные дожди. В настоящее время существуют более безопасные альтернативы сжиганию, например, *скиммеры* – суда, собирающие нефть с поверхности воды. Преимущество использования скиммеров в том, что нефть не меняет химических и физических свойств, как это происходит, например, при *диспергировании*. Смесь нефти и воды впоследствии может быть разделена в баках отстойников. Районы вблизи берега, загрязненные большими концентрациями нефти, очищают вручную, с помощью насосов выкачивая нефть на сушу, после чего грунт транспортируют в специально отведенные места для переработки и восстановления.

Так как нефть быстро распространяется по водной поверхности, важным этапом является ограничение и удержание разлива на определенной территории. Для этого используют *стрелы* – пластиковые цилиндры, снабженные утяжеленной подводной частью. Тонкие легкие пятна наиболее эффективно удерживаются *стрелами* с сорбентом, способным поглощать нефть. Огнеупорные *стрелы*, выполненные из металла, применяют для сдерживания границ разлива во время сжигания нефти, что снижает вероятность пожара за пределами огражденной территории.

Также применяют *диспергирующие агенты* для повышения растворимости нефти в воде, что позволяет снизить концентрацию нефти. Диспергирование не используют при очистке прибрежных зон во избежание нарушения экосистем (Allen et al., 1995), поскольку применяемые реагенты токсичны. Тем не менее, даже применение диспергирующих смесей в открытом море наносит серьезный вред окружающей среде. Так, Алмеда с соавт. (Almeda et al., 2014) показали, что детергент «Corexit», распыленный в Мексиканском заливе (2010 г.), был крайне токсичен для микрозоопланктона, влияя на состав и структуру морских микробных сообществ.

Среди методов обработки *in situ* распространены *барботирование воздухом* и *экстракция через всасывание почвенного воздуха*, а также, в зависимости от спектра загрязняющих веществ, комбинация этих двух процессов. Такие методы особенно эффективны на песчаных почвах. *Барботирование воздухом* ускоряет развитие аэробных бактерий, способных к утилизации нефти.

Достаточно известным методом ремедиации загрязненных грунтов в жарком климате является термальная десорбция (TTD) (Varuntanya et al., 1989; Kosteckí et al., 1999; Krishna Vangala et al., 2013). Метод основан на физическом разделении и не направлен на разрушение углеводородов. При термальной десорбции загрязненный грунт нагревается в установке для удаления воды и органических загрязнителей, после чего вакуумная система перемещает газообразные загрязнители в системы обработки газов. В зависимости от температуры нагревания грунта в термальной десорбции выделяют две разновидности: высокотемпературную (HTTD) и низкотемпературную (LTTD).

Высокотемпературная термальная десорбция подразумевает нагревание почвы от 320 до 560°C (Ссылка 1) и позволяет снизить конечную концентрацию загрязнителя до 5 мг/кг почвы. При низкотемпературной термальной десорбции обрабатываемая почва нагревается от 90 до 320°C. Степень разрушения загрязнителей в камерах досжигания в ходе этого процесса может достигать 95%. В отличие от HTTD, в ходе

низкотемпературной термальной десорбции почва сохраняет органические компоненты и в дальнейшем может восстановить биологическую активность.

Несмотря на высокие показатели очистки почвы, метод ТТД имеет ряд недостатков, и отношение к нему до настоящего момента неоднозначное. Так, в связи с разрушительным воздействием на почву метод НТТД был ограничен к применению в Ираке (Ссылка 3), так как ранее было показано, что термальная десорбция непригодна для удаления углеводородов из пустынных почв и прибрежных экосистем, так как полностью уничтожает аборигенные живые организмы. Получаемый на выходе из реактора продукт стерилен и нуждается в дополнительном смешивании с органическим материалом, питательными веществами, спорами и семенами для восстановления микробиоты (Raune & Sand, 2011). Тем не менее, по данным на 2011 год, метод термальной десорбции был широко использован в ряде ремедиационных проектов таких стран, как Кувейт, Саудовская Аравия, ОАЭ (Ссылка 4).

Согласно данным, полученным международной организацией по технологической оценке, механические и большинство физических методов снижают содержание нефти в грунтах и водах до 10-12%. Однако такая остаточная концентрация нефти слишком велика и требует дальнейшей очистки. Как следствие, одним из перспективных методов вторичной очистки нефтезагрязненных экосистем стала *биоремедиация* – процесс деградации или трансформации загрязнителей в нетоксичные соединения, осуществляемый микроорганизмами (Chorom et al., 2010; Chekroun et al., 2014; Chibiuke & Obiora, 2014; Ekpereusi & Aigbodion, 2015).

Стратегии, используемые микроорганизмами для деградации углеводородов, включают действие конститутивных и индуцируемых ферментов, кометаболизм, перенос мобильных элементов, кодирующих определенные метаболические пути, и продукцию биосурфактантов для повышения доступности гидрофобных компонентов (Balba, 2003).

В целом, не существует совершенного метода для борьбы с разливами нефти. Многие из них, такие как сжигание, внесение диспергентов или термальная десорбция, негативно влияют на окружающую среду, другие (например, барботирование грунта воздухом) не обеспечивают необходимой степени и скорости очистки. Таким образом, технологию восстановления нефтезагрязненных участков необходимо подбирать и разрабатывать в зависимости от условий и степени загрязнения территории, по возможности используя сочетание различных методов. В настоящее время развивается применение комплексных технологий на одном загрязненном участке. В ряде случаев это позволяет существенно повысить суммарную эффективность деградации загрязнителей.

## 2.2. Методы биоремедиации

Поскольку более половины мировой добычи нефти приходится на регион Персидского залива, факторы, влияющие на биоремедиацию, будут рассмотрены на примере этой территории. Наиболее распространенными биоремедиационными подходами, в том числе в условиях жаркого климата, являются *in situ* биостимуляция (внесение органических и неорганических удобрений для активации аборигенной микрофлоры) и биоаугментация – обработка загрязненного участка биопрепаратом на основе нефтеокисляющих микроорганизмов для повышения степени деструкции нефти.

### 2.2.1. Факторы, влияющие на биоремедиацию в условиях жаркого климата

Территория Персидского залива находится в климатической зоне полупустынь. Уровень испарения достигает 200 см/год, в теплое время года, когда значение температуры превышает 50°C, соленость морской воды увеличивается до 16% (Khan & Al-Ajmi, 1998). При средней глубине 35 метров, отдельные участки вблизи иранского побережья достигают глубины в 100 метров. Температура поверхности воды варьирует в пределах от 12 до 35°C, однако в прибрежных зонах приближается к 40°C. Соленость колеблется от 4 до 5%, однако из-за высоких скоростей испарения в заливе соленость часто превышает 7% в приливных лагунах на Персидской территории залива. Такие условия являются стрессовыми для многих морских организмов, и любой дополнительный эффект от внешних загрязнителей следует тщательно оценивать (Khan & Al-Ajmi, 1998).

Температура – ключевой фактор, определяющий необходимость и способ применяемого ремедиационного подхода. В зависимости от температуры бактериальная активность и скорости биодegradации могут сезонно изменяться (Ward & Brock, 1976; Iqbal, 2003; Pandey et al., 2008; Fiedler & Gilbert, 2015). Биоремедиация может быть успешна только при определенных условиях. В жарком климате летучие углеводородные фракции быстро испаряются, а оставшиеся длинноцепочечные ароматические и алифатические компоненты сложнее подвергаются деградации и могут оставаться в окружающей среде долгое время. В Персидском заливе это привело к формированию слоя смолы, занимающего большие площади побережья. Этот слой не поддается биодegradации, и биоремедиация в этом случае не имеет смысла. Для удаления смолы применяют другие методы, например, механический сбор.

Соленость и температура влияют на структуру и физиологию микробных сообществ, изменяют физические и химические свойства поллютантов (растворимость, вязкость). Разнообразие и метаболический потенциал бактерий-деструкторов, как

известно, снижаются с переходом условий среды в стрессовую область (Foght et al., 1999; Margesin & Schinner, 2001). Однако микроорганизмы, адаптированные к климатическим условиям своих регионов обитания, способны осуществлять эффективную деструкцию нефти даже в условиях сезонных перепадов температур, низкой влажности грунта и гиперсолености морской воды (Abed et al., 2006). Тем не менее, в ряде случаев деструкция нефти была неполной по причине снижения биодоступности отдельных ее компонентов: углеводороды сорбировались в глинистые прослойки, становясь, таким образом, недоступными для бактерий (Abed et al., 2002).

Качественный состав нефти влияет на способность к разложению микроорганизмами отдельных ее компонентов. Уолкер с соавт. (Walker et al., 1976) изучали чувствительность микроорганизмов-нефтедеструкторов в отношении нефти и мазута, и заключили, что тяжелая кувейтская нефть в меньшей степени подвергается деструкции, чем легкая нефть Луизианы. Степень деградации идентичных соединений в составе различных смесей углеводородов неодинакова. Малкинс-Филлипс и Стюарт (Mulkins-Phillips & Stewart, 1974) показали, что ряд *n*-алканов в составе венесуэльской нефти утилизируется в меньшей степени, чем в составе нефти из Персидского залива. Вестлэйк с соавт. (Westlake et al., 1978) продемонстрировали, что биodeградация нефти смешанными микробными культурами зависит не только от доли ненасыщенных соединений, но и от состава асфальтеновой фракции.

Физическое состояние загрязнителей также влияет на утилизирующую способность бактерий. Атлас с соавт. (Atlas et al., 1980a) показали, что биodeградация углеводородов в Мексиканском заливе была частично ограничена аккумуляирующими свойствами эмульсии. Колвелл с соавт. (Colwell et al., 1978) сделали вывод, что деструкция нефти в разливе Метула (Metula) ограничивалась образованием смоляных гранул и агрегатов, что снижало биодоступность углеводородов.

Не только температура окружающей среды, но и концентрации доступных питательных веществ, в частности азота и фосфора, существенно влияют на развитие популяций нефтеутилизирующих бактерий. В отличие от избытка доступного углерода, концентрации азота и фосфора несоизмеримо малы и часто определяются только диффузией по поверхности нефтяного пятна. Рассматривая лимитирование по основным компонентам, Флудгейт (Floodgate, 1979) в своей работе предложил термин «потребность в азоте», по аналогии с биохимической потребностью в кислороде. Так, для кувейтской нефти при 14°C потребность в азоте составляет 4 нмоль на 1 нг нефти. Брайди и Бос

(Bridie & Bos, 1971) показали, что добавление 3,2 мг аммонийного азота и 0,6 мг фосфата обеспечивают максимальную скорость деградации кувейтской нефти в морской воде.

Существуют противоречивые версии о роли кислорода в процессе деструкции углеводов: кислород абсолютно необходим для биодegradации углеводов, или, напротив, углеводороды подвергаются анаэробному разложению. Действительно, существует ряд работ по выделению микроорганизмов, способных к дегидрированию алканов и ПАУ в анаэробных условиях (Chouteau et al., 1962; Iizuka et al., 1969; Coates et al., 1996a; Coates et al., 1996b; Bregnard et al., 1996; Lagenhoff et al., 1996; Karthikeyan & Bhandari, 2001; Okoh, 2006; Jaekel et al., 2013; Lyles et al., 2014), однако процесс анаэробного роста слишком сложен и требует организации специальных условий, чтобы использовать такие бактерии в ремедиационных технологиях.

О важности кислорода в процессе деструкции свидетельствует тот факт, что основные биохимические пути трансформации насыщенных и ароматических углеводов требуют участия кислорода и молекулярного кислорода. ЗоБелл (ZoBell, 1969) вычислил, что для биодegradации 1 л нефти потребуется кислород, растворенный в  $3,2 \times 10^5$  л морской воды. В бескислородных бассейнах, гипolimнионе стратифицированных озер и донных отложений низкие концентрации кислорода могут серьезно ограничить биодegradацию.

Экстремальные условия окружающей среды представляют естественный барьер для микробной дегradации углеводов, ограничивая, таким образом, возможности применения метода биоремедиации. Для преодоления этого барьера и восстановления земель с высокой соленостью возможно два пути: снизить соленость (Rhykerd et al., 1995) или использовать способность бактерий дегradировать углеводороды в присутствии высоких концентраций соли (Oren et al., 1992). Первый подход предполагает орошение загрязненных земель пресной или разбавленной морской водой, тогда как второй опирается на использование галофильных микроорганизмов-нефтедеструкторов (Karley et al., 1999; Wang et al., 2007; Al-Mailem et al., 2010; Li et al., 2011; Zhao et al., 2012). Эти микроорганизмы могут быть внесены в составе препаратов или присутствовать в составе аборигенных микробных сообществ. Было показано, орошение территорий облегчает биодegradацию (Radwan et al., 1995; Al-Daher et al., 1998; Balba et al., 1998), однако индуцирует изменения в составе микробного сообщества. Введение на загрязненные участки генетически модифицированных микроорганизмов или ассоциаций, выделенных при других условиях, было в большинстве случаев безуспешным (Radwan et al., 1995; Vogel, 1996; Lee & Merlin, 1999).

2.2.2. Особенности микроорганизмов, обнаруженных и применяемых при биоремедиации в условиях повышенных температур, их разнообразие и таксономическая принадлежность

Разливы, которые повлекла за собой война в Персидском заливе, пробудили научный интерес к бактериям-деструкторам нефти (Abed et al., 2006; Benyahia et al., 2006; Hashem, 2007; Ismail et al., 2013). Условия обитания таких микроорганизмов свидетельствовали о толерантности к экстремальным климатическим условиям и концентрациям загрязнителей. Механизмы утилизации бактериями углеводов до сих пор не вполне ясны, однако установлено, что углеводороды могут проникать в клетку в качестве интактных молекул (Radwan & Al-Hasan, 2000), а также образовывать высокоплотные включения в клетке (Diestra et al., 2007a).

Исследования микробной деградации нефти показали, что процесс ускоряется в условиях повышенных температур, возможно, из-за стимуляции отдельных участвующих ферментов (Kohring et al., 1989; Wu et al., 1996). Метаболиты, образующиеся при деградации полициклических ароматических углеводородов в термофильных и мезофильных условиях различны вследствие влияния температуры на ферментную активность (Muller et al., 1998; Annweiler et al., 2000).

Прибрежные территории Персидского залива населены сообществами микроорганизмов, которые адаптированы не только к значительным сезонным изменениям температуры и солености, но и к ежедневным циклам увлажнения/обезвоживания. В связи с приливным режимом условия обитания микробных сообществ варьируют от умеренных (3-4% солености, 25°C) до экстремальных (до 16% соли, 50°C). Абед с соавт. (Abed et al., 2006) установили, что береговую линию Персидского залива населяют преимущественно сульфатредукторы групп *Gamma*- и *Deltaproteobacteria*, что, соответственно, указывает на активный цикл серы. Известно, что нефтяное загрязнение стимулирует цикл серы (Lovely, 1997; Kleikemper et al., 2002), а сульфатредукторы часто являются деструкторами углеводов нефти (Widdel & Rabus, 2001). Обнаружение таких бактерий указывает на анаэробную деградацию нефти, что подтвердили отобранные пробы микробного мата. В то же время известных аэробных деструкторов таких родов, как *Pseudomonas* и *Alcanivorax*, Абед с соавт. (Abed et al., 2006) не обнаружили.

Галофильные бактерии, деградирующие углеводороды, описаны многими исследователями (Oren et al., 1992; Margesin & Schinner, 2001; Плотникова с соавт., 2001). Так, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* способен расти в условиях солености до 20% и

утилизировать различные алифатические и ароматические углеводороды (Gauthier et al., 1992). Мниф с соавт. (Mnif et al., 2009) выделили из нефтяного месторождения в Тунисе штамм C2SS100, который был идентифицирован как принадлежащий к роду *Halomonas*. Штамм рос при температуре 37°C и солености 10 г/л и был способен окислять углеводороды, в частности, гексадекан. Ранее Бен Али Гам с соавт. (Ben Ali Gam et al., 2007) из нефтяной скважины в Тунисе выделили штамм Lit2, принадлежащий к роду *Modicisalibacter* и способный к росту в температурном диапазоне 15-45°C с оптимумом 37°C. Штамм выдерживал до 25% соли в среде, однако оптимальной для него концентрацией было 10% NaCl в среде. Чамха с соавт. (Chamkha et al., 2008) также в Тунисе, в высокотемпературном месторождении, обнаружили термофильный штамм *Geobacillus* sp. C5, который утилизировал тирозол, дизельное топливо, широкий спектр ароматических соединений и нефть при оптимальной температуре 55°C и концентрации соли 3%.

Ванг с соавт. (Wang et al., 2010) выделили из месторождения в Китае штамм DQS3-9A1 и на его основе описали новый род *Amicoliticoccus* и новый вид *A. subflavus*. Штамм рос в диапазоне температур 15-42°C с оптимумом 37°C, pH 6-11 (оптимум 8) и в присутствии соли в среде 1-12% (оптимум 8%). Позднее Ни с соавт. (Nie et al., 2013) показали, что штамм DQS3-9A1 утилизует коротко- и длинноцепочечные алканы: пропан и C<sub>10</sub>-C<sub>36</sub> в качестве источника углерода.

Численность популяций углеводородоокисляющих микроорганизмов резко повышается после разлива нефти, что было показано для Амоко Кадис в Бретани (Atlas & Bronner, 1980a), для аварии на буровом колодце IXТОС-I в Мексиканском заливе (Atlas et al., 1980b) и ряда других крупных разливов. В случае Амоко Кадис количество микроорганизмов-нефтедеструкторов положительно коррелирует со степенью загрязнения и после удаления нефти так же резко снижается. Численность бактерий в эмульсии вода-масло на IXТОС-I была на 3-5 порядков выше, чем на поверхности воды, не загрязненной нефтью.

Таксономическое разнообразие термотолерантных нефтедеструкторов охватывает многие рода бактерий. Раза с соавт. (Raza et al., 2010) при исследовании аборигенных нефтеокисляющих микроорганизмов из почв в Пакистане выявили, что основными деструкторами нефти в почве месторождения Раджан являются псевдомонады и бациллы, а также представители родов *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Erwinia* и *Streptococcus*. В то же время из образцов почвы с месторождения Мисса Касвал авторы выделили штаммы родов *Acinetobacter*, *Amphibacillus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*,

*Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Moraxella*, *Providencia* и *Pseudomonas*. Эксперимент по деструкции нефти бактериальными монокультурами показал, что при 37°C и исходной концентрации нефти 1% наиболее эффективными деструкторами нефти оказались представители *Pseudomonas* и *Bacillus*: за 15 суток культивирования они окисляли до 20% и до 16% нефти соответственно.

Мниф с соавт. (Mnif et al., 2011) из различных месторождений Туниса выделили ряд нефтеокисляющих бактерий, отнесенных авторами к родам *Geobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Achromobacter* и *Halomonas*. Штаммы росли на нефти в присутствии различных концентраций соли (1-10%) и в диапазоне температур 37-55°C. Штамм С450R, идентифицированный авторами как *P. aeruginosa*, в ходе роста на нефти (2%) продуцировал гликолипидные биосурфактанты, снижавшие поверхностное натяжение культуральной среды с 68 до 35 мН/м.

Раджай с соавт. (Rajaei et al., 2013) анализировали нефтеокисляющие бактериальные штаммы, выделенные из ризосферы овса в Хузестане (Иран). Авторы выявили, что среди штаммов присутствуют представители родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Curtobacterium* и *Sphingobacterium*. У этих бактерий были выявлены катаболические гены, ответственные за деструкцию алканов и ароматических соединений. В работе было показано, что ризосферные бактерии овса способны утилизировать нефть в почве на 40,5% в течение 10 дней культивирования при исходной концентрации нефти 2,5%.

Помимо бактерий, есть также ряд сообщений о выделении из природных образцов грибов, обладающих нефтеокисляющей способностью. Так, Обекве с соавт. (Obuekwe et al., 2005) сообщали о выделении *Fusarium lateritium*, *Drechslera* sp. и *Papulaspora* sp. из солончака пустыни в Кувейте. Штаммы этих грибов были способны утилизировать нефть в качестве источника углерода. Авторы выявили, что два штамма (*Fusarium lateritium*, *Drechslera* sp.) росли в присутствии 10% соли, *Papulaspora* sp. – в присутствии 5% соли. Соль в качестве стрессового фактора не оказывала значительного влияния на деструкцию нефти грибами, однако степень деструкции зависела от присутствия питательных компонентов в среде.

Специфические климатические условия рассматриваемых регионов в течение длительного времени являлись селективирующим фактором, способствующим выживанию аборигенных микроорганизмов с определенными свойствами: способностью выдерживать высокие (в среднем до 50°C) температуры, соленость до 7% и недостаток влаги в грунте.

Именно бактерии с такими свойствами способны эффективно утилизировать нефть на территориях с жарким аридным климатом. Многолетние исследования, проведенные в различных географических регионах, показывают, что осуществлять деструкцию углеводородных загрязнителей способны микроорганизмы, принадлежащие к разным таксономическим группам и существенно отличающиеся по физиологическим и метаболическим признакам. Многообразие термотолерантных бактерий, их метаболические пути деградации и трансформации углеводородов изучены слабо. Ферменты, используемые термотолерантными бактериями для деструкции углеводородов, работают при более высоких температурах, чем ферменты распространенных мезофильных деструкторов, что делает термотолерантные штаммы перспективными агентами ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях высоких температур окружающей среды.

### 2.3. Организация метаболических путей деструкции углеводородов термотолерантными штаммами

Биологические процессы, происходящие в природе, приводят к модификации компонентов нефти в месте разлива или при транспортировке. Такая трансформация часто вызывает значительные изменения в структуре и токсических свойствах загрязнителей. Известно, что основными агентами биологических превращений в почве, осадочных породах, поверхностных и подземных водах являются аборигенные микроорганизмы этих природных объектов. Таким образом, биodeградацию можно определить как катализируемый микроорганизмами процесс упрощения структуры органических соединений. В случае органических веществ биodeградация часто, хотя и не всегда, приводит к превращению большей части углерода, азота, фосфора, серы и других элементов в неорганические конечные продукты (Suthersan, 1999).

Являясь смесью органических соединений, нефть достаточно сложно подвергается деградации и может накапливаться в природных объектах. На накопление компонентов нефти в окружающей среде влияют различные процессы, такие как сорбция, испарение, абиотические преобразования (химические или фотохимические), биотрансформация (Korda et al., 1997). Сорбция и испарение не уничтожают загрязнитель, наоборот, переводят в другое место локализации с последующим накоплением. Абиотические химические превращения, затрагивающие органические загрязнители, обычно имеют низкую скорость, а доля фотохимических реакций в большинстве природных объектов мала (Korda et al., 1997; Santos et al., 2011; Crapez et al., 2002). Роль биологического фактора в процессе трансформации и деградации углеводородов значительно больше:

микроорганизмы напрямую участвуют в биогеохимических циклах, осуществляя деградацию различных источников углерода, в том числе нефтяных углеводородов, вследствие чего понимание и применение биологической деградации нефти представляет большой интерес.

Наличие высокоактивных ферментов позволяет микробным сообществам разлагать сложные углеводороды (Alexander, 1994). Эта способность модифицировать или разрушать определенные загрязнители показывает важность ферментов в ремедиационных процессах. Генетическое разнообразие способствует метаболической гибкости микроорганизмов при трансформации загрязнителей в менее токсичные конечные продукты, которые затем включаются в природные биогеохимические циклы (Alexander, 1994). Многие биотические и абиотические факторы могут влиять на эффективность биodeградации нефти, в том числе присутствие и деятельность микроорганизмов-нефтедеструкторов, их конкурентоспособность, доступность и концентрация нефти и питательных веществ, соленость и температура (Santos et al., 2011).

### 2.3.1. Микробная деградация алифатических углеводородов при повышенных температурах

Способность утилизировать алканы широко распространена среди микробных популяций (Reunamo, 2015; Jaekel et al., 2015; Bargiela et al., 2015; Guibert et al., 2016). Так как алканы являются основными (около 70%) составляющими большинства добываемой нефти, эти микроорганизмы играют важную роль в биоремедиации загрязненных нефтью территорий.

Алканразлагающие бактерии обычно выделяют из загрязненных участков, и большинство из них являются мезофильными представителями таких родов, как *Acinetobacter* (Sakai et al., 1994; Zhao et al., 2016; Acer et al., 2016), *Rhodococcus* (van Hamme & Ward, 2001; Lincoln et al., 2015; Sambles & White, 2015; Bayat et al., 2015), *Nocardia* (Hamamura & Arp, 2000) и *Pseudomonas* (van Beilen et al., 1994; Patowary & Deka, 2015). Эти микроорганизмы деградируют алканы с длиной цепи от C<sub>2</sub> до C<sub>44</sub>.

Несмотря на то, что в основном оптимальная температура бактериальной деградации алканов лежит в мезофильном диапазоне, биodeградация этих соединений изучена в широком интервале температур (от 0 до 70°C) (Kato et al., 2001; Feitkenhauer et al., 2003; Sorkhoh et al., 1993; Ojeda, 2013; Head et al., 2014). Среди термофильных алкандеструкторов наиболее подробно изучен род *Geobacillus* (Banat et al., 2011; Nazina et al., 2005; Marchant et al., 2006; Sood & Lal, 2008).

Абед с соавт. (Abed et al., 2014) отмечали деструкцию алканов у целого ряда термотолерантных и термофильных штаммов, выделенных в прибрежном регионе в Омане. Все штаммы при 2-7% соли в среде культивирования были способны утилизировать линейные алканы в диапазоне температур 20-60°C с оптимумом 30-40°C. Авторы идентифицировали выделенные штаммы как представителей родов *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Nahella* и *Alcanivorax*.

Одним из главных факторов, лимитирующих деградацию углеводов, является их низкая доступность для клеток. Для повышения доступности субстрата микроорганизмы используют ряд стратегий – от создания биопленок до продуцирования биосурфактантов (Bognolo, 1999; Christofi & Ivshina, 2002; Johnsen et al., 2005). С другой стороны, биодоступность также может быть повышена посредством повышения температуры, что способствует росту термофильных микроорганизмов (Margesin & Schinner, 2001). С повышением температуры увеличивается растворимость гидрофобных загрязнителей, снижается их вязкость, увеличивается скорость перевода длинноцепочечных алканов из твердой фазы в жидкую, что способствует более эффективному их удалению из загрязненных биотопов (Feitkenhauer et al., 2003).

#### 2.3.1.1. Разнообразие алкангидроксилазных систем углеводородокисляющих бактерий

Алкангидроксилазы – обширный класс ферментов деградации алканов, представленный в различных видах бактерий, грибов, дрожжей и водорослей (van Beilen & Funhoff, 2007; Viggor et al., 2015). Ван Бейлен и Фанхофф рассматривают три основных категории алкан-деградирующих ферментных систем: разлагающие C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> соединения (от метана до бутана, окисляются ферментами метанмонооксигеназного типа), C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> соединения (от пентана до гексадекана, окисляются межмембранными ферментами с негемовым железом (семейство AlkB) или цитохромом P<sub>450</sub> (семейство CYP153)) и C<sub>17</sub>+ (длинноцепочечные алканы, окисляются малоизученными ферментными системами). Авторы также отметили, что микроорганизмы, способные разрушать алканы, могут содержать несколько алкангидроксилаз и, таким образом, потреблять различные субстраты.

Во многих случаях бактерии обладают генами только одной из вышеперечисленных систем, хотя и в нескольких копиях, что приводит к специфическому спектру утилизируемых алканов. Например, четыре гомолога гена *alkB* были обнаружены в *Rhodococcus* sp. Q15 (Whyte et al., 2002), два гомолога *alkB* – у *Gordonia* sp. SoCg (Lo Piccolo et al., 2011). Хотя большинство генов, кодирующих CYP153, были найдены в

штаммах, где *alkB* отсутствовали (van Beilen et al., 2006), недавние исследования показали одновременное существование двух этих систем у ряда алкандеградирующих штаммов, таких как грамотрицательные *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Schneiker et al., 2006) и *Alcanivorax dieselolei* B-5 (Liu et al., 2011), что указывает на возможную кооперацию AlkB и CYP153 при деградации широкого спектра алканов. Это явление наблюдали также у многих алкандеградирующих актиномицетов, включая *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* и других (Ishikawa et al., 2004; Lo Piccolo et al., 2011; Rainey et al., 1995; Whyte et al., 2002; Bihari et al., 2010). Однако взаимодействуют эти системы или действуют независимо и какова их регуляция – пока непонятно.

Прокопио с соавт. (Procópio et al., 2013) исследовали алкандеградирующий штамм *Dietzia cinnamomea* P4, выделенный из почвы в Бразилии, и показали, что штамм способен утилизировать *n*-алканы как при 35°C, так и при 45°C. Ранее (von der Weid et al., 2007) отмечено, что, помимо алканов C<sub>11</sub>-C<sub>36</sub> штамм P4 способен также окислять ароматические углеводороды. Выполненный геномный анализ штамма P4 (Procópio et al., 2012) показал, что штамм обладает генным кластером, кодирующим ферменты, вовлеченные в деструкцию алканов. Авторы обнаружили, что алкан-1-монооксигеназа объединена в штамме P4 с рубредоксином в единый белок. Подобное кластерирование наблюдали и у других алкандеградирующих штаммов *Dietzia* (Bihari et al., 2011; Kim et al., 2011). Было выявлено, что этот слитый белок, называемый AlkW, участвует в деградации алканов с длиной цепи больше C<sub>14</sub> (Nie et al., 2011).

Маршант с соавт. (Marchant et al., 2006) показали, что гены *alkB* являются достаточно консервативными. Авторы исследовали деструкцию гексадекана термофильным штаммом *Geobacillus thermoleovorans* T70 и выявили, что ампликон гена *alkB* штамма T70 имел 96% сходства с последовательностью *alkB Rhodococcus erythropolis* и 95% сходства с *alkB Rhodococcus* sp. Q15. Таким образом, можно предположить, что нет существенных различий между алкан монооксигеназами *alkB* штаммов разных видов и даже семейств.

Однако разнообразие алкангидроксилазных систем не ограничивается *alkB*- и CYP153-подобными алкан монооксигеназами. Ван с соавт. (Wang et al., 2006) при работе с термофильным штаммом *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 отмечали у него отсутствие системы *alkB*. Позднее (Feng et al., 2007) было выявлено, что для деструкции алканов при температурах 45-73°C штамм использовал алкан монооксигеназу, отличную от *alkB* и CYP153 и кодируемую геном *ladA*. Впоследствии было показано, что использование для деструкции алканов фермента LadA является распространенным для

термофильных геобацилл (Boonmak et al., 2014; Boonmak, 2014), однако вне экстремальных ниш обитания этот фермент не встречается. LadA является двухкомпонентной флаavin-зависимой оксигеназой семейства люцифераз (Li et al., 2008). Гидроксилазы такого типа, участвующие в процессе деструкции длинноцепочечных алканов, эволюционировали обособленно, что отличает их от алкан монооксигеназ типа AlkB или P450.

### 2.3.1.2. Пути бактериального метаболизма алканов

Один из наиболее изученных путей деградации алканов описан для *Pseudomonas putida* Gp01, содержащих OCT-плазмиду (плазмиду деградации октана) (van Beilen et al., 1994; van Beilen et al., 2001; Rojo, 2009). На этом пути конверсия алкана в спирт осуществляется системой *alkB*, а именно мембранной монооксигеназой, растворимым рубредоксином и рубредоксинредуктазой (van Hamme et al., 2003). За первой окислительной реакцией следует окисление до альдегида (алкогольдегидрогеназой) и жирных кислот (альдегиддегидрогеназой) (Berthe-Corti & Fetzner, 2002). Жирные кислоты превращаются в производные ацилКоА, которые затем преобразуются по пути  $\beta$ -окисления. Дальнейшие реакции в пути  $\beta$ -окисления обеспечивают клетку углеродом и энергией (Рис. 1) (Rodgers-Vieira, 2012).

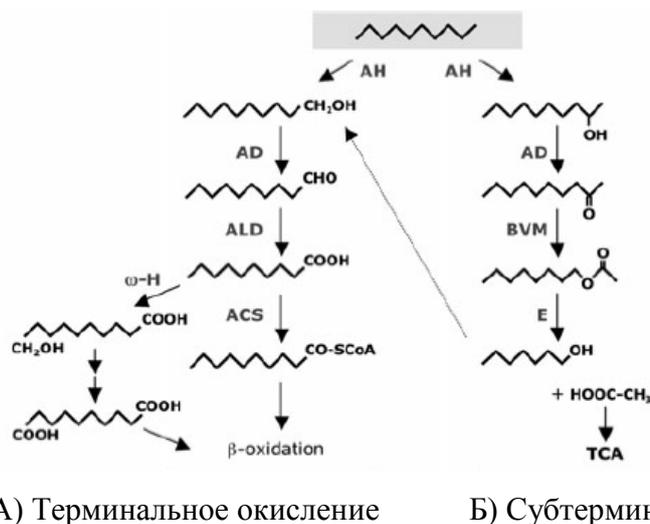


Рис. 1. Пути бактериального метаболизма алканов (Rojo, 2009). AH – алкан гидроксилаза; AD – алкоголь дегидрогеназа; ALD – альдегид дегидрогеназа; ACS – ацил-КоА синтетаза;  $\omega$ -H –  $\omega$ -гидроксилаза; BVM – монооксигеназа Байера-Виллигера; E – эстераза; TCA – цикл трикарбонных кислот.

Метаболический путь, изученный у псевдомонад, характерен также для ряда родококков. Однако иногда представители *Rhodococcus* используют альтернативный,

субтерминальный путь (Рис. 1-б): алканы окисляются монооксигеназой до вторичного спирта, затем до кетона и, наконец, до жирной кислоты (Whyte et al., 1998).

Като (Kato, 2001) исследовал метаболизм термофильных деструкторов алканов *Bacillus thermoleovorans*, выделенных из глубоко залегающего нефтяного месторождения. Чтобы получить информацию о пути деградации алканов штаммами *B. thermoleovorans*, автор идентифицировал метаболиты алканов и выявил накопление в клетках производных жирных кислот с той же длиной цепи, что и исходный субстрат, и короче, чем субстрат, на два углеродных атома. Так, при росте штаммов на гептадекане в клетках накапливались гептадеканоат и пентадеканоат. Эти наблюдения подтвердили, что, как и *P. oleovorans* (van Beilen et al., 1994), *B. thermoleovorans* используют для окисления алканов путь терминального окисления, за которым следует  $\beta$ -окисление.

### 2.3.2. Микробная деградация ароматических углеводородов при повышенных температурах

Ароматические углеводороды наряду с алифатическими являются одними из основных компонентов нефти. Они включают моноциклические (бензол, толуол) и полициклические ароматические углеводороды (от нафталина до пиренов), многочисленные алкилзамещенные изомеры.

В природе многие соединения трансформируются до общих интермедиатов, которые впоследствии подвергаются дальнейшей деградации. Этот процесс позволяет организмам развивать общие пути для деструкции родственных субстратов. Так, многие ароматические соединения окисляются путем включения кислорода в ароматическое кольцо. Данный процесс осуществляется моно- и диоксигеназами. Для организмов наиболее эффективен процесс встраивания в кольцо молекулы кислорода с использованием диоксигеназ (Bouwer & Zehnder, 1993). Диоксигеназы, в большинстве случаев катализирующие начальные этапы деструкции ПАУ, изучены и охарактеризованы у различных бактерий (Ensley & Gibson, 1983; Resnick et al., 1996; Larkin et al., 1999; Chopard et al., 2012; Joanneau et al., 2016). Так, например, показано, что первые реакции деструкции нафталина у родококков катализируются нафталин-1,2-диоксигеназой, большую и малую субъединицы которой кодируют соответственно гены *narAa* и *narAb*, и нафталин-дигидродиол-дегидрогеназой, кодируемой геном *narB*.

Однако также возможно последовательное монооксигенирование кольца до получения диолов, за которым следует дегидрогенирование двух соседних гидроксильных атомов углерода, как показано на Рис. 2. Следующий шаг –

расщепление гидроксированного кольца, происходящее либо рядом с двумя гидроксированными атомами углерода (мета-расщепление), либо между ними (орто).

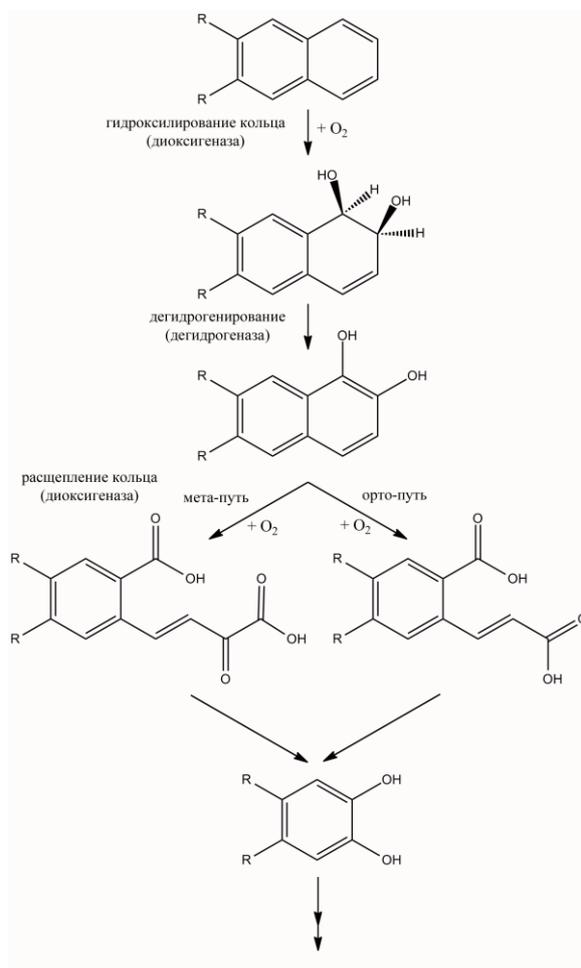


Рис. 2. Общая схема начальных этапов типичной аэробной деградации ПАУ (Schuler & Agathos, 2012)

Метаболизм ПАУ мезофильными бактериями подробно изучен (Cerniglia & Neitkamp, 1989; Kelley et al., 1990). Известно также, что метаболические пути деградации ПАУ термофильными бактериями могут отличаться от путей мезофильных штаммов (Annweiler et al., 2000). В работе Аннвейлер с соавт. (Annweiler et al., 2000) показана гипотетическая схема взаимосвязи метаболических путей деструкции нафталина мезофильными и термофильными штаммами (Рис. 3). Однако о метаболизме ПАУ термотолерантными бактериями известно мало.

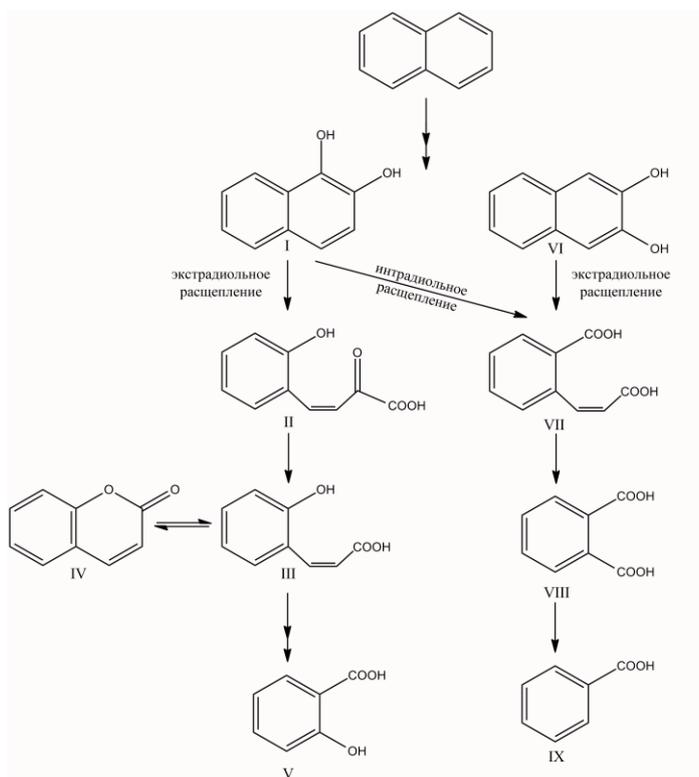


Рис. 3. Метаболиты, образующиеся в результате окисления нафталина мезофильными и термофильными микроорганизмами (гипотетическая схема взаимосвязи продуктов-предшественников) (Annweiler et al., 2000). Указанные соединения: I – 1,2-дигидрокси-нафталин, II – 4-(2-гидрокси-фенил)-2-оксо-бут-3-еновая кислота, III – 2-гидроксикоричная кислота, IV – кумарин (хромен-2-он), V – салициловая кислота, VI – 2,3-дигидрокси-нафталин, VII – 2-карбоксикоричная кислота, VIII – фталевая кислота, IX – бензойная кислота

Кумар с соавт. (Kumar et al., 2007) наблюдали способность окислять ПАУ у термотолерантного и галотолерантного штамма *Bacillus* sp. ДНТ, выделенного из почвы в Венесуэле. Штамм утилизировал нафталин, фенантрен, пирен, в меньшей степени антрацен, а также салицилат и катехол при температурах как 35°C, так и 45°C, в присутствии до 10% соли в среде культивирования. Похожую картину наблюдали Раджай с соавт. (Rajaei et al., 2013) в своем исследовании потенциала деградации углеводородов термотолерантными штаммами, выделенными из почвы в Иране: проведенный авторами газохроматографический анализ показал, что бактериальный консорциум, составленный из штаммов *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas*, помимо алканов C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>, утилизировал нафталин, хризен и бензоантрацен.

Деструкцию фенантрена и антрацена наблюдали Зейнали с соавт. (Zeinali et al., 2007) у штамма *Nocardia*, оптимальная ростовая температура которого составляла 50°C.

Метаболический путь деструкции фенантрена ранее был предложен Барнсли с соавт. (Barnsley et al., 1983) для грамположительных и грамотрицательных бактерий (Рис. 4).

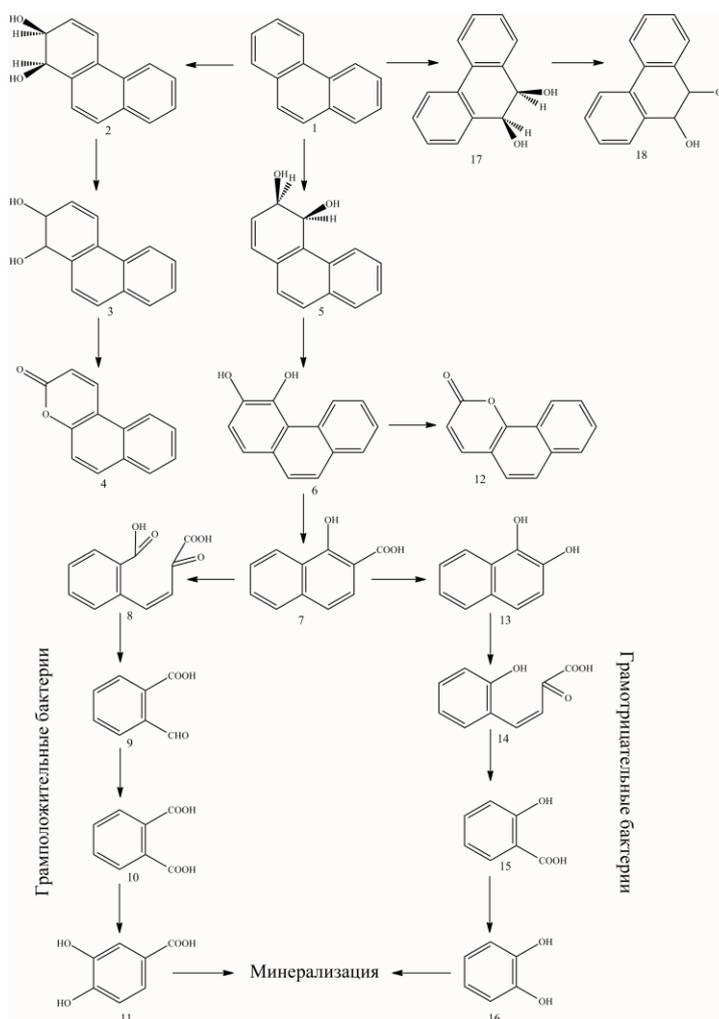


Рис. 4. Пути деградации фенантрена грам-положительными и грам-отрицательными бактериями (Barnsley et al., 1983). Указанные соединения: 1 – фенантрен, 2 – цис-1,2-дигидрокси-1,2-дигидрофенантрен, 3 – 1,2-дигидрофенантрен, 4 – 7-окси-8-фенантренкетон, 5 – цис-3,4-гидрокси-3,4-дигидрофенантрен, 6 – 3,4-дигидроксифенантрен, 7 – 1-гидрокси-2-нафтойная кислота, 8 – цис-о-карбоксивензальпироват, 9 – 2-карбоксивензальдегид, 10 – о-фталевая кислота, 11 – протокатеховая кислота, 12 – 5-окси-6-фенантренкетон, 13 – 1,2-дигидросинафталин, 14 – цис-о-гидроксивензальпироват, 15 – салициловая кислота, 16 – катехол, 17 – транс-9,10-дигидро-9,10-дигидроксифенантрен, 18 – 9.10-дигидроксифенантрен

Что касается деструкции моноароматических соединений, то в связи с их летучестью при высоких температурах эти компоненты практически сразу испаряются. В связи с этим можно предположить, что у термотолерантных и термофильных бактерий могут отсутствовать соответствующие ферментные системы для их деструкции, как

отсутствуют системы деструкции короткоцепочечных алканов у термофильных бактерий (Wang et al., 2006). Тем не менее, интересно отметить, что Ли с соавт. (Lee et al., 2001) наблюдали деструкцию компонентов БТЭК (бензол, толуол, этилбензол, ксилолы) термотолерантным штаммом *Ralstonia* sp. PHS1. Штамм был выделен в горячем источнике в Корее и был способен расти в интервале температур 15-52°C с оптимумом 42°C. Авторы сравнивали деградирующую активность штамма PHS1 со способностью наиболее генетически близкого к нему штамма *Ralstonia eutropha* DSM531 утилизировать компоненты БТЭК и выявили, что, в отличие от DSM531, рост которого среди проанализированных углеводов отмечали только на бензоле, PHS1 утилизировал бензол и этилбензол, а также толуол и *o*-ксилол. Методом масс-спектрометрии авторы показали, что первым метаболитом при деструкции *o*-ксилола являлся 2,3-диметилфенол, следовательно, первым этапом деградации *o*-ксилола являлось прямое монооксигенирование ароматического кольца, как ранее было показано Барбери с соавт. (Barbieri et al., 1993).

В отличие от термотолерантных микроорганизмов, у которых способность к деградации моноароматических соединений распространена мало, деградация БТЭК мезофильными бактериями описана для родов *Moraxella* sp. (Högn & Jaenicke, 1972), *Nocardia* sp., *Alcaligenes denitrificans*, *Micrococcus* sp. (Ridgeway et al., 1990), *Arthrobacter* sp. (Weber & Corseuil, 1994), *Rhodococcus rhodochrous* (Deeb & Alvarez-Cohen, 1999). Максимальной активностью в деградации БТЭК отличаются псевдомонады (Reardon et al., 2000, Zamanian & Mason, 1987; Ridgeway et al., 1990; Qu et al., 2015).

По результатам многолетних исследований можно заключить, что для микроорганизмов-нефтедеструкторов характерно широкое разнообразие биохимических путей утилизации источников углерода. Изучение этих путей необходимо для понимания и оптимизации ремедиационных процессов, происходящих на загрязненных нефтепродуктами территориях. Информация об особенностях метаболизма углеводов термотолерантными бактериями весьма ограничена, однако из имеющихся данных можно сделать вывод, что для метаболизма алканов такие бактерии используют ферменты, широко распространенные среди мезофильных нефтедеструкторов. Способность к деструкции полиароматических соединений у термотолерантных штаммов отмечали неоднократно (Kumar et al., 2007; Zeinali et al., 2007; Rajaei et al., 2013). Однако в литературе представлены данные лишь об утилизации ПАУ термофильными микроорганизмами, использующими в основном иные ферменты. Таким образом, можно заключить, что принципиальной разницы между путями катаболизма углеводов

мезофильных и термотолерантных бактерий, по-видимому, нет, в процессе деструкции участвуют универсальные ферменты, однако клетки термотолерантных бактерий не испытывают стресса от повышения температуры до 50°C, и деструкция ими углеводов в таких условиях протекает эффективно.

2.4. Поверхностно-активные соединения, продуцируемые термотолерантными нефтеокисляющими бактериями

Ключевым фактором, лимитирующим биodeградацию, является ограниченная доступность субстратов для микроорганизмов. Одной из стратегий повышения биодоступности таких субстратов является продукция микроорганизмами-деструкторами углеводов поверхностно-активных соединений (ПАВ).

Продукция биоПАВ (биосурфактантов) характерна для многих прокариотических и эукариотических организмов (Liu et al., 2015; Ehrhardt et al., 2015; Velioglu & Urek, 2015; Belgacem et al., 2015). Эти вещества характеризуются наличием как гидрофильных, так и гидрофобных участков, что обеспечивает их адсорбцию на границе раздела фаз и изменяет межфазные условия. Существует несколько классификаций биоПАВ (Saharan et al., 2011). Розенберг и Рон (Rosenberg & Ron, 1999) разделяют их на две категории: высоко- и низкомолекулярные соединения. В структуре низкомолекулярных ПАВ выделяют гидрофобную и гидрофильную части, в высокомолекулярных соединениях гидрофильные и гидрофобные группы чередуются.

По химическому строению биосурфактанты обычно делят на шесть классов: гидроксильированные и поперечносвязанные жирные кислоты (миколовые кислоты), гликолипиды, липополисахариды, липопротеины-липopeптиды, фосфолипиды и поверхность клетки в целом (Saharan et al., 2011).

Микроорганизмы, использующие в качестве источников углерода и энергии малорастворимые в воде соединения, например, алканы или полициклические углеводороды, часто являются эффективными продуцентами биоПАВ (Hommel, 1990; Neu, 1996), которые напрямую вовлечены в процесс удаления углеводов из окружающей среды путем повышения биодоступности и последующей биodeградации углеводов посредством прямого контакта с клеткой. Продукция поверхностно-активных соединений микроорганизмами при умеренных (20-30°C) температурах является предметом интенсивного многолетнего изучения (Vyas & Dave, 2011; Tuleva et al., 2008; Siegmund & Wagner, 1991). Не меньший интерес, однако, представляет способность термотолерантных бактерий продуцировать биоПАВ при повышенных (>40°C) температурах.

#### 2.4.1. Продукция биосурфактантов грамотрицательными термотолерантными бактериями

Способность осуществлять эффективный метаболизм при повышенных температурах в целом менее характерна для грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительными. Несмотря на это, среди грамотрицательных бактерий известны эффективные термотолерантные продуценты биоПАВ.

Наиболее изученными бактериями, способными окислять углеводороды и продуцировать биосурфактанты, являются псевдомонады (Beal & Betts, 2000; Noordman & Janssen, 2002; Rahman et al., 2002). Большинство псевдомонад, продуцирующих биоПАВ, являются мезофильными, есть только несколько сообщений о продукции биосурфактантов термотолерантными или термофильными представителями *Pseudomonas*. Так, Перфумо с соавт. (Perfumo et al., 2006) отмечали продукцию рамнолипидов термофильным углеводородоокисляющим штаммом *P. aeruginosa* APO2-1. Штамм APO2-1 утилизировал различные углеводороды и продуцировал биосурфактанты при росте на растворимых и не растворимых в воде субстратах при температуре 45°C. Дас и Махерджи (Das & Mukherjee, 2005) отмечали продукцию биосурфактантов мукоидным и немучоидным штаммами *P. aeruginosa* при культивировании этих штаммов на минеральной среде с гексадеканом при температуре 45°C. Штаммы были способны расти и эффективно продуцировать биосурфактанты в температурном диапазоне 30-50°C, при дальнейшем повышении температуры авторы наблюдали существенное снижение количеств продуцируемых бактериями ПАВ.

Кумар с соавт. (Kumar et al., 2008) охарактеризовали термотолерантный и галотолерантный штамм *P. aeruginosa*, выделенный из почвенного образца с территории Венесуэлы. Штамм DHT2 был способен утилизировать как линейные алканы, так и ПАУ в качестве источника углерода и продуцировал биосурфактанты при росте на углеводородах, а также на водорастворимых субстратах (глюкозе, глицерине). Рост штамма и продукцию биосурфактантов штаммом DHT2 авторы отмечали в температурном диапазоне 30-45°C и присутствии соли в среде до 6%. Ингибирование развития культуры начиналось при температурах выше 45°C и солености больше 6%. Кумар с соавт. (Kumar et al., 2008) выявили, что штамм DHT2 продуцировал рамнолипиды, в результате чего поверхностное натяжение культуральной жидкости снижалось до 30,2 мН/м относительно контроля (54,9 мН/м – среда YPG).

Среди термотолерантных псевдомонад, не принадлежащих к *P. aeruginosa*, продукцию биосурфактантов отмечали Кази с соавт. (Qazi et al., 2013) у штамма SOL-10,

идентифицированного как *P. putida*. Штамм был выделен из нефтяного месторождения в Пакистане и был способен к эффективной продукции биосурфактантов в температурном диапазоне 30-40°C. Максимальную концентрацию биосурфактанта авторы наблюдали в среде с дрожжевым экстрактом (1,5-2,5% масс/об) – в таких условиях поверхностное натяжение культуральной жидкости снижалось до 29,95 мН/м. Исследование влияния различных субстратов, в том числе углеводов, на продукцию биосурфактантов штаммом SOL-10 показало, что глицерин, керосин, ксилолы и гексадекан в качестве источника углерода не оказывают значительного влияния на продукцию биосурфактантов. В работе был получен ампликон гена *rhlB* пути синтеза рамнолипидов, что позволило авторам предположить, что *P. putida* SOL-10 является продуцентом рамнолипидов.

Окоро с соавт. (Okoro et al., 2012) выделяли термотолерантные и галотолерантные нефтеокисляющие бактерии из почвы на территории нефтедобывающей станции в Нигерии. Авторы идентифицировали изоляты как принадлежащие к родам *Pseudomonas* и *Serratia*. Штаммы *Pseudomonas* sp. VS-71, *Serratia marcescens* A4, *P. aeruginosa* SG-1 и *P. stutzeri* одинаково интенсивно росли при 32°C и 48°C, однако при 55°C авторы наблюдали ингибирование роста. В то же время штаммы *P. aeruginosa* S2QPS8 и *Pseudomonas* sp. MM15 лучше росли при 48°C, чем при 32°C. Все исследуемые авторами изоляты являлись продуцентами биосурфактантов: псевдомонады – гликолипидной природы, *Serratia* – липопептидной.

Помимо псевдомонад, известными термотолерантными продуцентами биоПАВ среди грамотрицательных бактерий являются представители рода *Acinetobacter*. Вонг с соавт. (Wong et al., 2010) исследовали продукцию биосурфактантов штаммом *A. calcoaceticus* BU03 при культивировании его на среде с глюкозой и пептоном при 55°C. Добавление продуцируемого бактериями сурфактанта в модельные почвенные системы с ПАУ (фенантrenom и бенз[а]пиреном) способствовало солюбилизации и более эффективному удалению углеводов из систем.

Среди анаэробных грамотрицательных продуцентов биоПАВ интересно отметить вид *Anaerophaga thermohalophila*, описанный Денгер с соавт. (Denger et al., 2002). Представители *Anaerophaga thermohalophila* являются умеренно термогалофильными, строго анаэробными культурами и способны продуцировать соединения, эффективно стабилизирующие эмульсии гексадекан/вода. Продукция ПАВ усиливалась в присутствии гексадекана. Эмульгирующая активность незначительно повышалась при pH 2 по сравнению с нейтральными или щелочными pH, что указывало на анионную природу

ПАВ. Сурфактанты были частично ассоциированы с клеточными поверхностями, однако после фильтрации высвобождались в культуральную среду (Denger & Schink, 1995).

2.4.2. Продукция биосурфактантов грамположительными термотолерантными бактериями

Роль грамположительных бактерий во многом неизвестна (Kaplan & Kitts, 2004). Тем не менее, грамположительные микроорганизмы обладают большим потенциалом в биотрансформации и биodeградации органических соединений (Larkin et al., 2005). В связи с особенностями клеточной стенки грамположительные бактерии часто занимают экологические ниши со специфическими, а порой экстремальными условиями обитания.

Наиболее интенсивно изученными продуцентами биоПАВ последние несколько десятилетий являются бациллы, в том числе нефтеокисляющие (Shimura et al., 1999; Zhuang et al., 2002; Calvo et al., 2004). Род *Bacillus* включает углеводородразлагающие микроорганизмы, обнаруженные в различных биотопах, среди бацилл часто встречаются термотолерантные представители.

В работе Таваси с соавт. (Thavasi et al., 2008) отмечали продукцию гликолипидных сурфактантов штаммом *Bacillus megaterium*. Авторы культивировали штамм в диапазоне температур (28-46°C), концентраций субстрата (нефти) 0,1-4,5% об/об и величин pH (5,0-9,5). Влияние солености на продукцию биосурфактантов оценивали, используя различные концентрации NaCl (0-40‰ масс/об). Таваси с соавт. выявили, что оптимальными условиями для роста и продукции биосурфактантов штамма *Bacillus megaterium* являются температура 38°C, 2% концентрация субстрата, pH 8.0 и соленость 3%. Эксперименты были проведены в ферментере с дешевыми источниками углерода, такими как неочищенное моторное и арахисовое масла.

Продукцию гликолипидных биосурфактантов бациллами наблюдали также Ву с соавт. (Wu et al., 2014). Авторы выделили термотолерантный штамм *Bacillus subtilis* BS2 из нефтяного месторождения в Китае. Штамм был способен продуцировать биосурфактанты как при росте при 37°C, так и при 55°C, причем продуцируемый штаммом BS2 сурфактант понижал поверхностное натяжение среды до 28,97 мН/м и до 36,15 мН/м соответственно относительно контроля (70,87 мН/м – поверхностное натяжение культуральной жидкости).

В целом, термотолерантные бациллы являются достаточно распространенными микроорганизмами. Они находят применение как в биоремедиации, так и в технологиях повышения нефтеотдачи (Almeida et al., 2004; Gudiña et al., 2012). Маккар (Makkar, 1997) изучал продукцию биоПАВ штаммом *B. subtilis* MTCC2423 при температуре 45°C и

выявил, что при росте на сахарах (глюкозе, сахарозе) и пирувате натрия штамм продуцировал ПАВ. Эксперименты, проведенные с углеводородами (пристаном и гексадеканом) показали, что продукции сурфактанта ни на пристане, ни на гексадекане не происходило. Соединение, продуцируемое МТСС2423, в высокой степени было аналогично липопептидному биосурфактанту сурфактину, продукция которого широко распространена среди бацилл.

Гудинья с соавт. (Gudiña et al., 2012) проводили скрининг термотолерантных нефтеокисляющих бактерий, выделенных из бразильской нефтяной скважины, где температура составляла около 40°C. Изоляты, идентифицированные как *Bacillus subtilis*, были способны расти и продуцировать ПАВ в температурном диапазоне 40-55°C и выдерживать концентрацию соли в среде 100 г/л. Похожие результаты при работе с бациллами были также получены рядом других авторов (Jenneman et al., 1983; Javaheri et al., 1985). Перспективными продуцентами ПАВ, исследуемыми с точки зрения их потенциального применения в технологиях повышения нефтеотдачи, являлись *B. licheniformis* BAS50 (Yakimov et al., 1995, 1997), *B. licheniformis* ACO1 (Dastgheib et al., 2008) и *B. subtilis* PTCC1696 (Ghojavand et al., 2008).

Штамм *Bacillus* sp. ACO1, выделенный из иранского нефтяного месторождения, являлся факультативным анаэробом и мог расти при температуре до 60°C и солености 180 г/л. Оптимум солености, pH и температуры для продукции биоэмульгаторов этим штаммом – 4% (масс/об), 8.0 и 45°C соответственно. Продукция биоэмульгаторов штаммом ACO1, как выявили Дастгейб с соавт. (Dastgheib et al., 2008), была оптимальна при росте на дрожжевом экстракте как единственном источнике углерода и с NaNO<sub>3</sub> в качестве источника азота. В культуральной жидкости штамма ACO1 эмульгирование не сопровождалось значительным понижением поверхностного натяжения, как бывает при синтезе полимерных биосурфактантов. Подобного типа эмульгаторы продуцируют многие бактерии, археи, дрожжи и плесневые грибы (Luna-Velasco et al., 2007; Bodour & Maier, 2002). Первичная оценка неочищенного экстракта биополимера показала, что основной составляющей эмульгатора являются сахара. Это совпадало со сведениями о структуре хорошо изученных биоэмульгаторов с полисахаридным кором.

Штамм *B. licheniformis* BAS50, исследуемый в работе Якимова с соавт. (Yakimov et al., 1995), был выделен из нефтяного месторождения на глубине 1500 м. Штамм рос и продуцировал липопептидные сурфактанты при культивировании на различных субстратах при содержании соли до 13%. Продукция биосурфактанта осуществлялась как

аэробно, так и анаэробно, с оптимумом солености 5% и при температурах 35-45°C. Биосурфактант, продуцируемый этим штаммом, был определен как лихенизин А.

Несмотря на то, что мезофильные родококки являются перспективными и интенсивно изучаемыми продуцентами ПАВ (Zaragoza et al., 2013; White et al., 2013; Ivshina et al., 2013), о термотолерантности родококков известно мало. Абу-Рувайда с соавт. (Abu-Ruwaida et al., 1991) выделили из почвы Кувейта штамм ST5, который был идентифицирован как *Rhodococcus* sp. При росте на углеводородах (керосине, парафинах) штамм ST5 продуцировал биосурфактант гликолипидной природы, способный понижать поверхностное натяжение культуральной жидкости до 27 мН/м и стабильный в присутствии до 10% соли в среде.

О выделении термотолерантных нефтеокисляющих штаммов *Rhodococcus*, способных к продукции биосурфактантов, сообщали также Сорхо с соавт. (Sorkhoh et al., 1990a, 1990b). Штаммы KUCC 8801 и KUCC 8802 были выделены из почвы с территории Кувейта. Температурный оптимум роста обоих штаммов составлял около 40°C, однако и KUCC 8801, и KUCC 8802 были способны выдерживать до 50°C, а также до 5% (масс/об) соли в среде культивирования. Оба штамма были идентифицированы авторами как *Rhodococcus rhodochrous*.

Среди гордоний, тоже входящих в семейство нокардиоподобных бактерий, способность к продукции ПАВ при повышенных температурах отмечена у двух видов. Хао с соавт. (Hao et al., 2008) исследовали влияние температуры на рост и продукцию рамнолипидных сурфактантов штаммом *Gordonia amicalis* LH3, выделенным из загрязненного нефтью образца воды в Китае. Изучение влияния температуры на штамм при культивировании его на минеральной среде с парафином показало, что LH3 рос в диапазоне 15-40°C, при дальнейшем повышении температуры до 45°C рост культуры резко ингибировался и деструкция парафина практически не осуществлялась.

Йонг с соавт. (Young et al., 2005) выделили штамм *G. alkanivorans* CC-JG39 из осушителя для ила на газовой станции в Тайване. Продукцию биосурфактантов штаммом при росте на среде Бушнелл-Хаас, содержащей дизельное топливо, авторы анализировали при температурах 15, 30 и 45°C. Было выявлено, что штамм CC-JG39 продуцирует соединения, понижающие поверхностное натяжение культуральной жидкости до 51,2, 47,4 и 33,5 мН/м соответственно относительно контроля 58,6 мН/м (поверхностное натяжение бесклеточной среды). Так как внеклеточная поверхностная активность штамма CC-JG39 при росте температуры повышалась, авторы предположили, что продукция биосурфактанта зависит от температуры. Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) при этом также

повышался с 5 до 16% при повышении температуры с 15 до 45°C. Умеренную внеклеточную активность продуцируемых соединений авторы связали с низкой концентрацией сурфактанта в среде культивирования.

Позднее Лин с соавт. (Lin et al., 2008) показали, что сурфактанты, продуцируемые *G. alkanivorans* СС-JG39, являются экзополисахаридами. Соединения, продуцируемые этим штаммом, не только повышали биодоступность гидрофобных загрязнителей, но также способствовали флотации клеток (Lin et al., 2005; Young et al., 2005).

Несмотря на недостаток информации о продукции ПАВ гордониями при повышенных температурах, поверхностная активность продуцируемых этими бактериями соединений достаточно хорошо изучена при умеренных температурах. В частности, продукция ПАВ показана у *Gordonia amarae* при росте на углеводородах (Pagilla et al., 2002), *G. polyisoprenivorans* при росте на углеводах и дрожжевом экстракте (Fusconi & Godinho, 2002). Францетти с соавт. (Franzetti et al., 2009) наблюдали у *Gordonia* sp. BS29 при росте на гексадекане продукцию двух типов ПАВ: экзоклеточных биоэмульгаторов (липополисахаридов) и клеточносвязанных биосурфактантов рамнолипидной природы. Авторы выявили, что рамнолипиды штамма BS29 не оказывали существенного влияния на биodeградацию большинства индивидуальных загрязнителей. Эмульгаторы BS29 оказывали положительное влияние на деградацию пристана, выбранного авторами в качестве модели разветвленных и трудноутилизуемых углеводородов. С другой стороны, на скорость и степень биodeградации других проверяемых углеводородов эмульгаторы BS29 также не влияли, однако способствовали лучшей отмывке загрязненной углеводородами почвы (Franzetti et al., 2009).

Таким образом, продукция ПАВ термотолерантными бактериями изучена гораздо менее подробно по сравнению с этим процессом у мезофильных штаммов. Известно, что в качестве термотолерантных продуцентов биоПАВ среди грамтрицательных микроорганизмов наиболее распространены псевдомонады (*P. aeruginosa*), а среди грамположительных – бациллы. Однако продуцентами поверхностно-активных соединений являются и многие другие виды термотолерантных углеводородокисляющих микроорганизмов. Изучение механизмов продукции и повышение выхода биоПАВ при повышенных температурах является перспективным направлением в ликвидации углеводородных загрязнений водных и почвенных экосистем.

Способность термотолерантных бактерий утилизировать нефть в условиях повышенных температур и содержания соли в среде делает их перспективными агентами ремедиации территорий, которые не могут быть очищены путем применения

мезофильных нефтеструктуров. Физиологические свойства термотолерантных бактерий и их метаболизм адаптированы к повышенным температурам, однако изучение особенностей таких штаммов требует дальнейших исследований. Таксономическое разнообразие термотолерантных бактерий позволяет использовать их в ремедиационных технологиях не только как монокультуры, но и составлять микробные ассоциации с целью ускорения и повышения суммарной эффективности деградационного процесса.

#### 2.5. Применение термотолерантных бактерий для ремедиации нефтезагрязненных грунтов в регионах с жарким климатом

Микробная ремедиация загрязненных углеводородами территорий является доступным и экологически безопасным методом очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. Однако не существует универсальных микробных штаммов, способных в монокультуре утилизировать все компоненты столь сложной смеси, как нефть (Malik & Ahmed, 2012). В природе в биодegradацию нефти обычно вовлечена совокупность видов консорциума, сформированного в данном биотопе. Для активной деградации нефти необходима комбинация бактериальных штаммов с широкими ферментативными возможностями – в этом случае процесс удаления загрязнителя из экосистемы наиболее эффективен (Foght et al., 1999b; Komukai-Nakamura et al., 1996; Malik & Ahmed, 2012). Так, например, Комукаи-Накамура с соавт. (Komukai-Nakamura et al., 1996) описали последовательную деградацию арабской легкой нефти бактериями двух различных родов. *Acinetobacter* sp. T4 разлагал алканы и другие углеводороды, выделяя в среду метаболиты, после чего штамм *Pseudomonas putida* PB4 утилизировал эти метаболиты, а также полиароматическую составляющую нефти.

Аль-Васифи и Хамед (Al-Wasify & Named, 2014) также показали бóльшую эффективность применения консорциума по сравнению с монокультурами. В их работе показано, что консорциум, составленный из штаммов *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Acinetobacter lwoffii*, разлагал египетскую нефть на 88,5% за 28 дней, в то время как в монокультурах каждого штамма степень деструкции достигала 77,8%, 76,7% и 74,3% соответственно. Эксперимент проводили в минеральной среде MSM (pH 7.2) с концентрацией нефти 1% (об/об).

Тем не менее, если задачей является утилизация индивидуального соединения, допускается использование монокультуры в целях биоремедиации. Так, Гали с соавт. (Ghaly et al., 2013) показали эффективность применения штамма *Mycobacterium* для утилизации пирена в загрязненной почве в Канаде. Наибольшую степень деструкции пирена (84,29% при исходной концентрации пирена 700 мг/кг почвы) наблюдали в

образце после совмещенных процессов биостимуляции и биоаугментации, в то время как 57,86% деструкции пирена было получено после только биоаугментации штаммом *Micrococcus*, 50% пирена окисляли аборигенные микроорганизмы после биостимуляции, а в контроле (почвенными бактериями без дополнительной обработки) было отмечено 37% деструкции пирена. Однако подход с использованием монокультур не может быть достаточно эффективен при деструкции многокомпонентных смесей, таких как нефть.

Рамбелорисоа с соавт. (Rambelorisoa et al., 1984) исследовали нефтеокисляющий консорциум из 8 штаммов, принадлежащих к 6 различным родам. Пять из этих штаммов были способны расти в монокультурах, используя различные углеводороды, однако, когда оставшиеся три штамма удаляли из консорциума, эффективность смешанной культуры значительно снижалась. Полученные авторами результаты являлись ещё одним подтверждением того, что каждый член консорциума выполняет особую роль и, в свою очередь, его способность выживать в условиях лимитирования по субстрату может зависеть от присутствия других видов или штаммов.

В отношении стратегий ремедиации нефтезагрязненных экосистем нет единой точки зрения. Согласно Ван Хамме (van Hamme, 2003), введение в загрязненную почву коммерческих микробных препаратов (биоаугментация) и добавление удобрений для активации аборигенной микрофлоры (биостимуляция) могут быть одинаково эффективны. В настоящее время оба подхода находят применение в технологиях очистки нефтезагрязненных экосистем в регионах с жарким климатом (Ghazali et al., 2004; Al-Wasify & Named, 2014; El-Tarrs et al., 2012). Смешанные культуры могут быть созданы путем сочетания штаммов с известными деградационными способностями (Fought et al., 1999; Komukai-Nakamura et al., 1996). Для выделения нефтеокисляющих бактерий из загрязненных участков и создания консорциумов обычно используется метод накопительного культивирования (Sugiura et al., 1997).

2.5.1. Биостимуляция органическими и неорганическими удобрениями как инструмент ремедиации нефтезагрязненных экосистем в жарком климате

Питательные вещества (в основном азот, фосфор и в ряде случаев железо) являются важной составляющей процесса эффективной биодегradации углеводородных поллютантов (Cooney, 1984). Так, Атлас (Atlas, 1985) отметил, что при нефтеразливах в морских и пресноводных экосистемах количество углерода значительно возрастает, в то время как доступность азота и фосфора, концентрации которых остаются неизменными, становится лимитирующим фактором микробной дегradации загрязнителя. В морских экосистемах это явление более выражено в связи с низкими концентрациями азота и

фосфора в морской воде, тогда как дефицит азота и фосфора в пресноводных участках рассматривался в основном как следствие интенсивного потребления питательных веществ растениями (Mitsch & Gosselink, 1993). Таким образом, внесение питательных веществ является необходимым для эффективной биodeградации нефтяных компонентов (Kim et al., 2005).

Питательные элементы, вносимые в загрязненную экосистему для активации аборигенной микрофлоры, могут быть представлены смесью солей или индивидуальными соединениями, как, например, в работе Миллса и Франкенбергера (Mills & Frankenberger, 1994), исследовавших влияние источника фосфора на биodeградацию дизельного топлива. В качестве источников фосфора авторы проверяли фосфат калия, метилфосфоновую кислоту и диэтилосфат. В работе показано, что наибольший эффект оказывало внесение в образцы диэтилфосфата, в то время как добавление метилфосфоновой кислоты ингибировало рост микроорганизмов.

Внесение неорганических удобрений, однако, не всегда оказывает безусловный положительный эффект на процесс биоремедиации загрязнителя. Шайно с соавт. (Chaîneau et al., 2005) при изучении деструкции нефти почвенными микробными сообществами наблюдали снижение количества углеводов на протяжении всего эксперимента (150 дней). Максимальный уровень биodeградации нефти составлял 62% (исходная концентрация нефти была 7300 мкг на 1 г почвы, абиотические потери составили 18%). Авторы отмечали, что высокий уровень питательных веществ (соотношение C/N/P/K 100/48.3/32.2/96.6) ингибировал микробную ассимиляцию ароматической фракции. Последующее прекращение ингибирования могло быть связано с уменьшением количества удобрений в почве в ходе утилизации других углеводов.

Похожий эффект наблюдали ранее Хатчинс с соавт. (Hutchins et al., 1991): в их работе показан ингибирующий эффект нитрата на процесс биodeградации углеводов. Об отсутствии эффекта внесенных удобрений на биodeградацию ПАУ сообщали Федорак и Вестлейк (Fedorak & Westlake, 1981). Тем не менее, в большинстве случаев при добавлении удобрений наблюдается положительный эффект, оказываемый на биodeградацию насыщенных и ароматических углеводов (Bossert & Bartha, 1984; Meuller et al., 1989; Morgan & Watkinson, 1989; Atlas & Bartha, 1992; Chaîneau et al., 2000).

Несмотря на то, что доступные для микроорганизмов источники углерода (углеводороды) находятся в избытке на нефтезагрязненной территории, добавление внешнего источника углерода для повышения эффективности деградации всё же возможно. Так, Ли с соавт. (Lee et al., 2003) предположили, что добавление углерода в

форме пирувата стимулирует микробный рост и повышает скорость биодegradации ПАУ. Это не приводило к диауксии, но ускорило адаптацию *P. putida* к нафталину и скорость *in situ* биоремедиации.

Неорганические удобрения как агенты биостимуляции достаточно распространены. Однако их стоимость не позволяет применять их для очистки больших объемов нефтезагрязненного грунта (Agarry et al., 2010; Danjuma et al., 2012). Стоимость удобрений является одним из основных параметров, оцениваемых при определении перспектив применения ремедиационной технологии. Перспективным решением проблемы является применение отходов растениеводства и животноводства. Так, например, в ряде исследований показан потенциал использования растительных органических отходов, таких как подсолнечная лузга и рисовая шелуха (Li et al., 2002), банановая кожура и шелуха от стручков какао (Agbor et al., 2012), опилки (Tanee & Albert, 2011; Agarry & Jimoda, 2013), а также органических отходов животноводства: коровьего и козьего навоза, птичьего помета (Nwadinigwe & Onyeidu, 2012; Yakubu, 2007; Adesodun & Mbagwu, 2008; Okolo et al., 2005; Agarry & Jimoda, 2013).

Прабхакаран с соавт. (Prabhakaran et al., 2014) исследовали деградацию нефти в загрязненной почве в Индии с применением микробного консорциума и кокосовых сердцевин в качестве одновременно адсорбента и источника органических веществ. В работе было показано, что консорциум, состоящий из штаммов *Bacillus subtilis*, *B. jeotagali* и *B. foraminis*, в присутствии кокосовых сердцевин в почвенном образце утилизировал нефть (исходная концентрация 1% об/об) на 95%, в то время как без них – только на 54%. Это свидетельствует, что наличие адсорбента повышает эффект микробной ремедиации.

#### 2.5.2. Биоаугментация загрязненных экосистем консорциумами бактерий-нефтедеструкторов

Преимущества интродуцированных консорциумов перед монокультурами при биоремедиации нефтезагрязненных экосистем могут быть связаны с синергетическими взаимодействиями членов ассоциации. Так, возможно, что один из видов удаляет токсичные для других метаболиты. Возможно также, что бактерии разлагают соединения, являющиеся труднодоступными для прочих членов консорциума (Alexander, 1999). Изучение взаимодействий внутри смешанных культур является важным для понимания процесса деструкции нефти бактериальными консорциумами, однако это требует разработки адекватных методов мониторинга численности штаммов.

Внесение микробных консорциумов в загрязненную экосистему для повышения эффективности биodeградации нефти также является достаточно распространенным подходом. Применение адаптированного и активированного микробного препарата на участке нефтеразлива, совмещенное с внесением необходимых питательных веществ, может существенно сократить период ремедиации. Так, например, Альхатиб с соавт. (Alkhatib et al., 2011) использовали бактериальный консорциум, представленный штаммами *Klebsiella* и *Enterobacteriaceae*, для изучения процесса биоремедиации нефтешлама на очистных сооружениях в Малайзии. Авторы сравнивали скорость и степень деградации углеводов в стерильной почве, куда был внесен микробный консорциум, с теми же параметрами, но в нестерильной почве, куда для стимуляции аборигенной микрофлоры добавляли ил. В обоих экспериментах были получены похожие результаты (>90% деструкции), однако авторы отмечали, что при ремедиации посредством внесенного консорциума процесс протекал быстрее.

Ранее Газали с соавт. (Ghazali et al., 2004) получили похожую картину в отношении микробной деструкции дизельного топлива. Для деструкции углеводов в почве авторы составили два консорциума: Консорциум 1 включал штаммы *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus*, Консорциум 2 – *P. aeruginosa*, *Bacillus* и *Micrococcus*. Добавление микробных консорциумов в нестерильную почву повышало процент деградации средне- и длинноцепочечных алканов по сравнению с образцами без внесенных бактерий. Наибольшую степень микробной деструкции дизельного топлива (52,6%) авторы отмечали в почве с Консорциумом 2 после 60 дней инкубации. В контроле (образцах без внесенных бактерий) максимальный уровень деструкции составил ~20%. Таким образом, Газали с соавт. (Ghazali et al., 2004) заключили, что сочетание *Pseudomonas-Bacillus-Micrococcus* в составе микробного консорциума для ремедиации почв, загрязненных дизельным топливом, может быть более перспективным.

Гуижоу с соавт. (Guizhou et al., 2013) составляли микробный консорциум из термофильных бактерий, выделенных из нефтезагрязненной почвы в Китае, и показали, что консорциум может быть эффективен в диапазоне температур 45-65°C с оптимумом 55°C. Бактерии были идентифицированы авторами как представители *Bacillus*, *Geobacillus* и *Clostridium*. Консорциум КО8-2 был способен утилизировать 64,33% насыщенных углеводов, 27,06% - ароматических, 13,24% смол при 55°C. Таким образом, эффективность удаления нефти за 60 дней эксперимента составила 58,73% при концентрации нефти 10 г/л.

При моделировании полевых условий с целью проверки эффективности деструкции нефти консорциумом необходимо учитывать особенности грунта. Так, Вильямс (Williams, 2014) при моделировании процесса биоремедиации почвы в дельте реки Нигер консорциумом штаммов *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и *Pseudomonas* анализировал параметры почвы в этом регионе: влажность и pH, общее содержание органических и неорганических веществ, микроэлементов. В качестве подкормки был использован цеолит. Автор показал, что углеводородная фракция (C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>) в глинистой и песчаной почвах с цеолитом разлагается на 92,1% -57,7% и 74,0% -43,7% соответственно, тогда как без цеолита – на 80,4% - 44,8% (глинистая) и 69,4%-42,8% (песчаная). Более длинные (C<sub>20</sub>+) углеводороды в почвах бактериями практически не окислялись. По мнению автора, совместное применение микробного консорциума и цеолитной подкормки будет вести к ускорению биодеградации в глинистой почве, но не в песчаной.

Одним из способов повышения эффективности деструкции загрязнителя консорциумом микроорганизмов является добавление биосурфактантов вместе с ним в загрязненный участок. Однако влияние биосурфактантов не всегда однозначно, а также иногда может не оказывать положительного влияния на процесс деструкции, в связи с чем их эффект необходимо тщательно изучать (Carmichael & Pfaender, 1997; Cerniglia, 1997). Так, Кацорек с соавт. (Kaczorek et al., 2014) при исследовании влияния коммерческой смеси рамнолипидов на деструкцию нефти микробно-дрожжевыми консорциумами отмечали как положительное влияние рамнолипидов на процесс деструкции (для консорциумов *Aeromonas hydrophila* как с дрожжами *Candida*, так и с дрожжами *Yarrowia*), так и отрицательное: во всех консорциумах *Stenotrophomonas maltophilia* с дрожжами *Candida* и *Yarrowia* при добавлении рамнолипидов наблюдали снижение уровня биодеградации алифатических углеводородов.

Совместное применение биостимуляции и биоаугментации повышает скорость и степень деструкции углеводородов (Liebeg & Cutright, 1999; Nwadinigwe & Onyeidu, 2012). В технологиях, направленных на очистку экосистем, используют сочетание этих методов. Нормы внесения удобрений, количество используемой для орошения воды, а также расход интродуцируемых микроорганизмов на единицу площади грунта следует подбирать в зависимости от условий территории. Комплексный подход к разработке технологии очистки нефтезагрязненного грунта позволяет повысить скорость и степень биодеградации и в короткие сроки восстановить плодородие обрабатываемого участка.

При составлении консорциума как основы микробного препарата для очистки нефтезагрязненных грунтов и вод следует учитывать возможное взаимодействие

микроорганизмов консорциума. Микробная конкуренция возможна в различных природных условиях, ее причинами могут быть прямой конфликт (несовместимость) штаммов, а также различные скорости роста и конкуренция за питательные вещества (Bell, 2013; Cornforth & Foster, 2013; Foster & Bell, 2012; Hibbing et al., 2009; Thompson et al., 2005a). В связи с этим при составлении консорциума необходимы первичные тесты на несовместимость и взаимное подавление роста микроорганизмов. Также во избежание возможной конкуренции за доступные субстраты не следует включать в состав консорциума таксономически близкие микроорганизмы.

2.5.3. Биопрепараты, которые могут быть применены для очистки нефтезагрязненных участков при повышенных температурах

Значительная часть нефтезагрязненных участков расположена в регионах с жарким климатом. Поэтому в странах таких регионов проводятся масштабные исследования микроорганизмов-деструкторов нефти с целью дальнейшего их применения для ремедиации нефтезагрязненных территорий (Ghazali et al., 2004; Al-Wasify & Hamed, 2014; Malik & Ahmed, 2012). Тем не менее, при патентном поиске нами не было обнаружено коммерческих биопрепаратов, применяемых в странах с жарким климатом для рекультивации нефтезагрязненных территорий.

В России к регионам с жарким климатом могут быть отнесены Краснодарский и Ставропольский край, Ростовская область, регион Астрахани. Высокими температурами в летние сезоны отличаются также территории Казахстана и республик Кавказа. Поиск актуальной информации о запатентованных биологических методах ремедиации нефтезагрязненных земель в России выявил ряд микробных препаратов, верхняя граница рабочего температурного диапазона которых находится в районе 40-50°C (Таблица 1).

Биопрепараты, представленные на российском рынке, составлены как из монокультур («Дестройл», «Валентис»), так и из микробных ассоциаций. Большинство препаратов, помимо лиофильно высушенных микроорганизмов, включает необходимые минеральные удобрения. В ряде случаев также могут быть использованы сорбенты и добавки, как в «Микрозим Петротрит».

Среди препаратов, разработанных за пределами России и направленных на удаление нефти из окружающей среды, можно отметить препарат с условным названием «Микотрих» и его более позднюю модификацию (Шигаева с соавт., 2010, KZ 19425; Шигаева с соавт., 2012, KZ 26078), созданные для очистки почвогрунтов и нефтешламов в Казахстане. В состав препарата «Микотрих» входят *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51КС и дрожжи *Trichosporon cutaneum* P20CO2 в соотношении

1:1:1. Особенностью препарата является способность микроорганизмов в его составе утилизировать высокие (около 70%) концентрации нефти. Тем не менее, испытания «Микотриха» были проведены при температурах не выше 35°C, а о минимально допустимой влажности и допустимой солености среды нет данных.

Разрабатываемые биопрепараты для деструкции нефтяных загрязнений должны удовлетворять ряду требований, а именно: «быть безвредными для экосистемы, иметь ТУ с указанием микробиологического состава и основных технологических характеристик, быть пожаро- и взрывобезопасными и нетоксичными для персонала, работающего при их доставке и использовании, транспортироваться любыми доступными видами транспорта на любые расстояния в прочной упаковке, не подвергающейся порче и не нарушающей их свойств» (ВРД 39-1.13-056-2002). Разработка технологии применения должна учитывать особенности участка, на котором планируется проведение ремедиационных работ.

Для активации аборигенной микрофлоры могут быть использованы органические и неорганические удобрения. Тем не менее, в регионах с жарким климатом, где численность аборигенных бактерий постоянно подвержена стрессовым воздействиям окружающей среды, ремедиационный процесс, основанный только на биостимуляции, займет не один год. Таким образом, для ускорения процесса восстановления территории целесообразно сочетать биостимуляцию с внесением микробного препарата. Использование в составе биопрепарата монокультур бактерий-деструкторов углеводов будет эффективно только в случае загрязнителя, представленного индивидуальным соединением. В случае же комплексных поллютантов (таких как нефть) для повышения эффективности процесса очистки, очевидно, следует вносить консорциум специально подобранных бактерий-нефтедеструкторов.

Несмотря на присутствие на российском рынке биопрепаратов (Таблица 1), которые могли бы быть применены для жаркого климата, ремедиационные технологии нуждаются в адаптации к высокотемпературным условиям. Доступная для изучения информация о биопрепаратах в большинстве случаев носит рекламный характер, а данные о применении этих препаратов в условиях повышенных (40-50°C) температур отсутствуют. Для эффективного удаления нефти в таких регионах в летний период требуется создание микробных препаратов, включающих термотолерантные штаммы, для которых 45-50°C не является стрессовым фактором. Использование термотолерантных культур, способных утилизировать нефть в присутствии соли в среде и при низкой влажности грунта повысит эффективность деструкции нефти препаратом в аридном жарком климате.

Таблица 1. Микробные препараты российского рынка, которые могут быть применены для очистки нефтезагрязненных земель в жарком климате

Препарат и разработчики	Действующие микроорганизмы, добавки	Условия применения	Форма использования	Ссылка
биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти. Карасева Э.В. с соавт., 2009; Кубанский государственный университет	<i>Arthrobacter</i> sp. ВКМ Ас-2272 Д и <i>Rhodococcus</i> sp. ВКМ Ас-2045 Д; а также (мас.%): глицерин - 8-10, KNO <sub>3</sub> - 0.360-0.367, KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 0.054-0.055, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O - 0.126-0.128, микроорганизмы - не менее 3·10 <sup>10</sup> кл/мл препарата, вода	Способен работать при 35-40°C, о полном диапазоне нет информации	культуральная жидкость с бактериями и добавкой глицерина	<a href="http://bd.patent.su/2365000-2365999/pat/servlet/servlet61d3.html">http://bd.patent.su/2365000-2365999/pat/servlet/servlet61d3.html</a>
Дестройл, ООО ПО «Сиббиофарм», Бердск, Новосибирская обл.	<i>Acinetobacter</i> sp., 1×10 <sup>8</sup> КОЕ/мл	pH - 4,5-8,5 и температур - от +5 до +38°C, жизнеспособен до +42°C	порошок или паста	<a href="http://ekovse.ru/wp-content/uploads/2014/05/Instruksiya-Destroyl.pdf">http://ekovse.ru/wp-content/uploads/2014/05/Instruksiya-Destroyl.pdf</a> <a href="http://bd.patent.su/2391000-2391999/pat/servlet/servlet607d.html">http://bd.patent.su/2391000-2391999/pat/servlet/servlet607d.html</a>
Биоойл-Югра, Алексеев А.Ю. с соавт, 2007; ЗАО	<i>Saccharomyces</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № Y-1036, <i>Bacillus</i> sp.	от +1С до +41°C (оптимум 7-27 С); pH 4,5-9,0, соленость до	лиофильно высушенный препарат	Алексеев А.Ю. с соавт., 2007, RU

Биоойл, Новосибирск	ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1040, <i>Bacillus</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1039, <i>Enterobacter</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1038, не менее $10^{12}$ КОЕ/г; сахара, агара и желатин	7%		2337069 <a href="http://www.freepatent.ru/images/patents/128/2337069/patent-2337069.pdf">http://www.freepatent.ru/images/patents/128/2337069/patent-2337069.pdf</a>
Микрозим Петротрит, РСЭ-трейдинг, Москва	<i>Bacillus</i> sp., <i>Atherobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., соли, носитель (подробности не указаны); $10^{12}$ КОЕ/г, может использоваться вместе с подкормкой «Нутризим»	от +5°C до +50°C (оптимум от +10°C до +40°C), pH 4-10	лиофильно высушенный препарат	<a href="http://www.microzym.ru/oilspills.htm">http://www.microzym.ru/oilspills.htm</a>
Сойлекс, «Полиинформ», Санкт-Петербург	состав не указан, $1 \times 10^{10}$ КОЕ/мл; соли, носитель	в разных вариантах: от +10 до +40, от +3 до +10, от +35 до +45; pH 4,5-8,2	лиофильно высушенный препарат	<a href="http://www.polyinform.ru/sites/default/files/uploads/1_poliinform_portfolio-2013.pdf">http://www.polyinform.ru/sites/default/files/uploads/1_poliinform_portfolio-2013.pdf</a>
Деворойл, ИНМИ РАН, г. Москва	<i>Rhodococcus</i> spp. — 3 штамма, <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Jarrowia lipolytica</i> ; соли. При внесении в грунт добавляются торф или опилки	от +5°C до +40°C, pH 5,5-9,5; соленость до 15%	лиофильно высушенный препарат	1994, RU 2023686, C02F 3/34 <a href="http://www.devoroil.ru/whatsnew.html">http://www.devoroil.ru/whatsnew.html</a>
Валентис, ГосНИИ-Синтезбелок. г. Москва	монокультура <i>Acinetobacter valentis</i>	от +10°C до +50°C, pH 6-8		<a href="http://vitusltd.ru/blog/rekultivacija/4299">http://vitusltd.ru/blog/rekultivacija/4299</a>

Олеоворин и Биоприн, ГосНИИ-Синтезбелок. г. Москва	<i>Acinetobacter oleovorum</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Micrococcus</i> sp. и <i>Xanthomonas</i> species	от +3°C до +45°C, pH 3-10		<a href="http://vitusltd.ru/blog/rekultivacija/4299">http://vitusltd.ru/blog/rekultivacija/4299</a>
--	---	------------------------------	--	---

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Бактериальные штаммы, среды и условия культивирования

#### 2.1.1. Среда, субстраты, условия культивирования

В качестве минеральных сред для культивирования термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов использовали среду Эванса (Evans et al., 1970) и среду М9 (Miller et al., 1972), в качестве полноценной – среду Лурия-Бертани (ЛБ) (Bertani, 1951). Бактерии культивировали на минеральных средах в течение 3-4 суток, на полноценных средах в течение 40-48 часов при температурах 24 и 45°C.

Углеводороды (фенантрен, антрацен, флуорен, октан, нонан, декан, гексадекан, гептаметилнонан) были не менее 98% чистоты (Sigma-Aldrich, Merck, Fluka). Плотность нефти, используемой в качестве источника углерода, - 0.868 г/см<sup>3</sup>, содержание воды – 0.06%, солей – 45 мг/мл, механических примесей – 0.008% и серы – 1.42%.

#### 2.1.2. Выделение нефтеокисляющих бактерий из природных образцов

Нефтеокисляющие штаммы выделяли из образцов воды, почвы, грунта, нефтешламов, бурового раствора, отобранных в Подмосковье, на берегах озера Байкал и в самом озере Байкал, в Казахстане и в Антарктиде.

Микроорганизмы выделяли из образцов методом накопительного культивирования, используя жидкую минеральную среду Эванса с добавлением 2% сырой нефти. Культивирование проводили в течение 24 суток при температуре 24°C. После завершения накопительного культивирования проводили высевы при температуре 24°C на агаризованную среду Эванса, содержащую в качестве источника углерода и энергии нафталин или дизельное топливо.

Из образцов, отобранных в Казахстане, бактерии выделяли также при 45°C. После завершения накопительного культивирования бактерии высевали на агаризованную среду с нафталином или дизельным топливом при 24°C и 45°C.

Отдельные морфологически различные колонии, выросшие на среде Эванса, высевали на агаризованную среду Лурия Бертани (ЛБ) для подтверждения чистоты культур. Отбор термотолерантных штаммов вели путем культивирования выделенных микроорганизмов в жидкой среде Эванса с нефтью или дизельным топливом при температуре 45°C.

В результате было выделено 86 штаммов, способных утилизировать различные углеводороды нефти при 24°C, среди них 13 штаммов были способны к деструкции

углеводородов нефти при 45°C. Термотолерантные бактериальные штаммы, использованные в работе, перечислены в таблице 2.

Таблица 2. Термотолерантные штаммы, используемые в работе

	Штамм	Источник
Образцы отобраны с загрязненных нефтью участков	1B, 1D, 1G	почва из шламонакопителя, Москва
	Par5, Par7	почва с территории нефтеразлива, Казахстан
	Par6, Par18, 12B	нефтешлам с полигона, Казахстан
Образцы отобраны с не загрязненных нефтью участков	4D, Par14	почва с берега озера Байкал
	6E	вода из озера Байкал (Листвянка)
	Par2, Par10	озеро, Антарктида

Также в работе были использованы штаммы, выделенные из почвенных образцов, отобранных на территории Беларуси. Штаммы были любезно предоставлены д.б.н., проф. М.А. Титок из Белорусского государственного университета (Минск, Беларусь). Характеристика штаммов представлена в таблице 3.

Таблица 3. Термотолерантные штаммы, полученные из коллекции кафедры микробиологии Белорусского государственного университета

Штамм	Источник выделения
AL-18	Почва (Витебск, Беларусь)
L5A-BSU	Почва (Минск, Беларусь)
6-3	Почва (Минск, Беларусь)
8A3A	Почва (Минск, Беларусь)
A2-6	Почва (Минск, Беларусь)

2.2. Анализ зависимости ростовых параметров (удельной скорости роста и численности) термотолерантных микроорганизмов от температуры

Для изучения зависимости основных физиологических параметров растущих культур (численности жизнеспособных клеток и удельной скорости роста) от температуры термотолерантные штаммы выращивали в жидкой среде Эванса с добавлением глюкозы (2%) в качестве единственного источника углерода и энергии. Инокулят вносили до конечной концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Культивирование вели при температурах 20°C, 24°C, 28°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 53°C и 56°C в течение 4 суток. В ходе

эксперимента отбирали пробы культуральной жидкости каждые 5 часов, выполняли серию стандартных разведений и высевы на агаризованную среду LB для оценки численности жизнеспособных микроорганизмов.

Удельную скорость роста штаммов  $\mu$  рассчитывали согласно формуле (Перт С.Дж., 1978):

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t,$$

где  $x$  – концентрация микроорганизмов в момент времени  $t$ ;  $x_0$  – начальная концентрация микроорганизмов ( $t=0$ );  $\mu$  – удельная скорость роста.

Графики зависимости численности жизнеспособных клеток  $x$  от времени  $t$  строили в полулогарифмических координатах  $\ln x=f(t)$ . Удельную скорость роста на отрезке времени от  $t_1$  до  $t_2$  рассчитывали как тангенс угла наклона прямой на соответствующем участке  $t_1-t_2$  графика динамики роста микроорганизмов.

### 2.3. Операции с ДНК и молекулярные методики

#### 2.3.1. Выделение ДНК и ПЦР-амплификация фрагментов

Тотальная ДНК была выделена по методике Ausubel et al., 2003. За 3 часа до окончания культивирования в среду добавляли глицин до конечной концентрации 1% (масс./об.) из исходного 10% раствора в воде для ослабления клеточной стенки и облегчения последующего лизиса (Birnboim & Doly, 1979).

ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (“Perkin-Elmer”, США) по стандартным протоколам с использованием Taq и Pfu ДНК-полимераз. Для амплификации генов использовали праймеры, представленные в таблице 4.

Таблица 4. Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	T° отжига, C	Размер продукта, пн	Источник
16S rRNA	63f	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	55	1300	Marchesi et al., 1998
	1387r	GGG CGG WGT GTA CAA GGC			
gyrB	UP1	GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA	60	1100	Yamamoto, Narayama, 1995

	UP2-r	AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT			
<i>alkB</i>	alkBF	ATC AAY RCV GCV CAY GAR YTV GGB CAC AAG	66	558	Shen et al., 2010
	alkBR	SGG RTT CGC RTG RTG RTC RCT GTG NSG YTG			
<i>narAa</i>	for	TAC CTC GGC GAC CTG AAG TTC TA	55	625	Andreoni et al., 2000
	rev	AGT TCT CGG CGT CGT CCT GTT CGA A			
<i>narAb</i>	for	GCA CTC GTC ACC GAG GAT CTG	55	404	Andreoni et al., 2000
	rev	GAT TGT TGT CTG ATC TAG CAG CA			
<i>narB</i>	for	ACG TGC AAG AAG GCG CGA AA	55	653	Andreoni et al., 2000
	rev	ACG CTC CCG CGA GGC GAG AA			

Очистку ПЦР-продуктов выполняли по протоколу QIAquick PCR purification Kit Protocol (QIAquick Spin handbook, 2008).

Секвенирование проводили в лаборатории молекулярной генетики Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ на секвенаторе Applied Biosystems 3130×1 с использованием набора для секвенирования BigDye v.3.1.

Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей к анализируемым фрагментам генов выполняли с помощью программы BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>]. Филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев проводили с использованием пакета программ MEGA 6 Software. Для проверки стабильности филогенетических деревьев анализ проводили одновременно по методам Neighbor Joining (NJ) и Maximum Parsimony (MP).

Номера ГенБанка для нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК KR919788-KR919798, для гена *alkB* KT862535, KT894216, KT894217.

## 2.4. Определение физиологических характеристик термотолерантных бактерий

### 2.4.1. *Определение спектра утилизируемых субстратов изучаемых штаммов*

Микроорганизмы культивировали в пробирках в жидкой среде Эванса с добавлением ДТ; полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) нафталина, фенантрена, антрацена и флуорена; алифатических углеводородов (гексана, октана, нонана, декана, гексадекана и гептаметилнонана). Твердые углеводороды вносили после измельчения до пудры. Конечная концентрация субстратов составляла 2%. Рост культур определяли визуально по помутнению среды.

*2.4.2. Изучение способности штаммов к росту и деградации дизельного топлива в присутствии различных концентраций хлорида натрия*

Штаммы культивировали в пробирках в жидкой среде Эванса, содержащей 3, 5, 7 и 10% NaCl и 2% (об/об) ДТ. Культивирование проводили в течение 7 сут при 24 и 45°C. Рост микроорганизмов оценивали также визуально по степени помутнения культуральной жидкости.

*2.4.3. Изучение способности штаммов-нефтедеструкторов к росту и деградации углеводородов нефти при различных значениях рН среды*

Штаммы культивировали в пробирках в жидкой среде Эванса, рН которой доводили до значений 4, 6, 7, 8, 10, добавляя концентрированную соляную кислоту или ЭДТА-Na. В качестве источника углерода и энергии использовали ДТ (2% об/об). Культивирование проводили в течение 7 сут при 24 и 45°C. Рост микроорганизмов оценивали визуально по степени помутнения культуральной жидкости.

*2.4.4. Определение способности термотолерантных бактерий утилизировать нефть при различных ее концентрациях в среде*

Бактерии культивировали в пробирках в жидкой среде Эванса, содержавшей 5, 10, 15 и 20% нефти. Культивирование проводили в течение 14 сут при 24 и 45°C. Рост микроорганизмов оценивали визуально по степени помутнения культуральной жидкости.

*2.4.5. Определение нефтеокисляющей активности микроорганизмов жидкой среде*

Штаммы термотолерантных бактерий культивировали в колбах, содержащих 50 мл жидкой среды Эванса с 2% нефти, в течение 14 сут при 24 и 45°C.

Общее содержание углеводородов нефти определяли методом ИК-спектрометрии. После окончания культивирования оставшуюся нефть экстрагировали четыреххлористым углеродом (1:1). Содержание углеводородов в экстракте определяли с помощью анализатора нефтепродуктов АН-2 (Россия) в соответствии с протоколом (Страдомская с

соавт., 2007). В качестве контроля использовали стерильную жидкую среду Эванса, содержащую 2% нефти.

Концентрацию нефти (нефтепродуктов) в пробе водных растворов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C \times V_1 \times \eta}{V}, \text{ [мг/дм}^3\text{]}, \text{ где}$$

$C$  – концентрация нефти (нефтепродуктов) в элюате, найденная по показаниям прибора или градуировочной зависимости, мг/дм<sup>3</sup>;

$V_1$  – объем элюата, дм<sup>3</sup>;

$V$  – объем анализируемой водной пробы, дм<sup>3</sup>;

$\eta$  – степень разбавления элюата; если разбавление не проводилось, то  $\eta = 1$ .

2.5. Составление консорциума термотолерантных штаммов и изучение процесса деструкции нефти консорциумом в модельных системах

#### 2.5.1. Изучение совместимости термотолерантных штаммов

Для выявления антагонизма штаммы высевали на агаризованную среду 5/5 перпендикулярными друг к другу штрихами. Появление зон задержки роста и/или лизиса свидетельствовало бы о подавлении роста одного из штаммов веществами, продуцируемыми другим штаммом.

Для проверки стабильности смешанной культуры бактерии культивировали в жидкой минеральной среде с нефтью и в полноценной среде 5/5. Инокулят каждого штамма вносили в колбу в концентрации 10<sup>5</sup> КОЕ/мл. Культивирование вели 3 суток на богатой среде и 14 суток на минеральной среде с нефтью при температурах 24°C и 45°C. В ходе культивирования пробы отбирали каждые сутки, выполняли серию стандартных разведений и высевали на чашки для подсчета численности клеток.

#### 2.5.2. Составление консорциума термотолерантных штаммов и оценка эффективности консорциума

Консорциумы термотолерантных бактерий составляли на основании полученных в работе свойств. Консорциумы культивировали в жидкой среде Эванса с 2% нефти и 3% соли при 24°C и 45°C в течение двух недель. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию углеводородов методом ИК-спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-2.

#### 2.5.3. Моделирование процесса деструкции нефти консорциумом в грунте

В стерильный песок вносили соль до конечной концентрации 3%, нефть (2%), стерильную жидкую минеральную среду (10%) и бактерии до конечной концентрации

$1 \times 10^4$  КОЕ/г. Эксперимент проводили как с монокультурами, так и с консорциумом штаммов. Для получения консорциума монокультуры выращивали отдельно, затем готовили суспензии монокультур с концентрацией клеток  $1 \times 10^4$  КОЕ/г и смешивали их в равных соотношениях. Системы рыхлили каждые 3-4 дня. Эксперимент выполняли как при  $24^\circ\text{C}$ , так и при  $45^\circ\text{C}$ . По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию углеводов методом ИК-спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-2.

Концентрацию (нефти) нефтепродуктов в пробе грунта рассчитывали по формуле:

$$C_i = \frac{D \times (K \times C_{H_k} - C_{H_0}) \times V_0}{P}, \text{ [мг/кг почвы], где}$$

$D$  – коэффициент пропорциональности, полученный в результате обработки градуировочной зависимости действительной и измеренной концентрации нефти в почве, устанавливается для данного вида почвы;

$K$  – коэффициент разбавления элюата ЧХУ,  $\text{см}^3/\text{см}^3$ ;

$C_{H_k}$  – концентрация нефти в разбавленном элюате, определенная по градуировочной зависимости,  $\text{мг}/\text{дм}^3$ ;

$C_{H_0}$  – концентрация в элюате неспецифических составляющих почвенного гумуса, а также остаточных нефтепродуктов, которые могут быть в почве, взятой в качестве контрольной,  $\text{мг}/\text{дм}^3$ ;

$V_0$  – объем исходного четыреххлористого углерода, взятый для экстракции нефти из образца почвы,  $\text{дм}^3$ ;

$P$  – навеска почвы,  $\text{кг}$ .

*2.5.4. Анализ фракционного состава остаточной нефти в модельных системах относительно ее исходного состава в результате культивирования термотолерантных бактерий и консорциума в жидкой среде с нефтью при  $24^\circ\text{C}$  и  $45^\circ\text{C}$*

Химический анализ углеводов нефти в жидкой среде Эванса проводили после экстрагирования нефти из проб гравиметрическим методом колоночной хроматографии и фракционирования с использованием газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Определяли общую концентрацию веществ, экстрагируемых хлороформом, и проводили фракционный анализ углеводов после упаривания хлороформа и доведения проб до постоянного веса. Остаточную нефть из жидкой фазы каждой пробы извлекали хлороформом в делительных воронках, трижды промывая среду хлороформом после каждого отделения нефтяного слоя.

Каждую пробу нацело переносили в делительную воронку, исчерпывающе экстрагировали хлороформом, экстракт осушали безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли до постоянной массы остатка. Фракционный экспресс-анализ экстракта проводили с использованием патронов Диапак С (БиоХимМак). По результатам анализа рассчитывали процентное содержание фракций: нефтепродуктов (неполярные углеводороды); полиароматических углеводородов и нафтенных (слабополярные углеводороды); смолисто-асфальтеновых веществ; окисленных веществ (полярные продукты окисления и деструкции углеводородов).

Определение углеводородного состава для полученных фракций нефтепродуктов проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N (Agilent Technologies) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой DB5-ms 30мх0.25ммх0.25мкм и системой обработки данных ChemStation. В качестве стандарта использовали количественную смесь n-алканов Connecticut n-Hydrocarbon Mix (Supelco). По результатам анализа рассчитывали: процентное содержание в неполярной фракции неразветвленных алканов с длиной углеродной цепи от C<sub>14</sub> до C<sub>33</sub>; отношение содержания нормальных алканов к разветвленным алканам C<sub>17</sub>+C<sub>18</sub>/C<sub>19</sub>+C<sub>20</sub> («коэффициент биологической деградации»).

2.6. Изучение способности бактерий продуцировать поверхностно-активные вещества

#### 2.6.1. Измерение индекса эмульгирования

Индекс эмульгирования определяли по методике Купера и Голденберга (Cooper & Goldenberg, 1987).

Пробу объемом 4 мл помещали в мерную пробирку, добавляли 4 мл гексадекана. Пробирку плотно закрывали, интенсивно перемешивали в течение двух минут и оставляли на сутки при комнатной температуре. Индекс эмульгирования (E<sub>24</sub>, %) определяли через 24 часа и рассчитывали как процентное отношение объема слоя образовавшейся плотной эмульсии к общему объему жидкости.

Способность микроорганизмов продуцировать клеточносвязанные биоэмульгаторы определяли по методике Франси с соавт. (Francy et al., 1991). Изучаемые микроорганизмы культивировали на агаризованной среде ЛБ и на агаризованной минеральной среде Эванса с использованием гексадекана и глюкозы в качестве единственного источника углерода и энергии. Полученную биомассу смывали фосфатным буфером и дважды отмывали путем центрифугирования в течение 10 мин. при 10000 об./мин. на центрифуге Rotanta 460R («Hettich-Zentrifugen», ФРГ), t=4°C. После удаления супернатанта осадок клеток

ресуспендировали в фосфатном буфере. Полученную клеточную суспензию разводили в физиологическом растворе до концентрации  $10^8$  КОЕ/мл, определяемой по стандарту мутности, и использовали для определения индекса эмульгирования.

Для определения способности микроорганизмов продуцировать экзоклеточные биоэмульгаторы изучаемые штаммы культивировали в жидкой среде ЛБ и в жидкой минеральной среде Эванса с добавлением гексадекана или глюкозы в качестве единственного источника углерода и энергии. Полученную биомассу осаждали центрифугированием, бесклеточный супернатант использовали для определения индекса эмульгирования.

#### *2.6.2. Измерение поверхностного натяжения*

Поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта измеряли с помощью тензиометра Kruss K6 (Германия) при температуре 25°C. В качестве контроля использовали дистиллированную воду или среду Эванса (ПН 72 мН/м).

#### *2.6.3. Экстракция гликолипидных ПАВ*

Микроорганизмы культивировали в колбах с жидкой средой Эванса и 2% (об/об) гексадекана. Клетки осаждали центрифугированием (20 мин., 7000 об/мин) на центрифуге K26 («Janetzki», Польша) при температуре 4°C. рН бесклеточного супернатанта доводили до значения 2 концентрированной соляной кислотой, после чего раствор выдерживали 14 часов при температуре 4°C.

Биосурфактанты экстрагировали метил-третбутиловым эфиром (МТБЭ) из равного объема пробы. Органический слой отбирали, растворитель удаляли на роторном испарителе (35°C, 0.2 атм).

#### *2.6.4. Тонкослойная хроматография смесей гликолипидных ПАВ*

Разделение гликолипидов методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) выполняли на хроматографических пластинах Kieselgel 60 («Merck», ФРГ). Гликолипидные смеси элюировали смесью хлороформ:метанол:вода 65:15:2. Для качественного обнаружения гликолипидов пластины обрабатывали сначала нафтольным реагентом (0.5 г  $\alpha$ -нафтола в 100 мл смеси метанол:вода 1:1), затем 10% серной кислотой и нагревали до 100°C до проявления окраски (Кирхнер, 1981). Гликолипиды проявлялись в виде буро-фиолетовых пятен.

Для обнаружения соединений, содержащих аминокислоты, хроматографические пластины обрабатывали свежеприготовленным 0.25% раствором нингидрина в ацетоне, нагревали в течение 5 минут при 110°C (Кирхнер, 1981).

#### *2.6.5. Очистка биоПАВ методом колоночной хроматографии*

Биосурфактанты, содержащиеся в экстракте, очищали на стеклянной хроматографической колонке 20×1 см, заполненной сорбентом – силикагелем L 40/100 («Сметарол», Чехословакия). Образцы смывали с колонки путем последовательного добавления серии элюентов: хлороформ, хлороформ:метанол 10:1, хлороформ:метанол 10:2, хлороформ:метанол 5:1, хлороформ:метанол 5:2, метанол. Гликолипиды в очищенных образцах обнаруживали путем хроматографирования на пластинах, как описано в п. 2.6.4.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

3.1. Отбор термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов и определение их основных ростовых параметров

В работе был выполнен скрининг выделенных нами 86 штаммов-нефтедеструкторов на способность утилизировать углеводороды при повышенной (45°C) температуре. Было отобрано 13 термотолерантных штаммов, 5 – получены из коллекции кафедры микробиологии Белорусского государственного университета (Таблица 2, Таблица 3 в разделе «Материалы и методы»). Термотолерантные штаммы отбирали по способности утилизировать углеводороды при повышенной (45°C) температуре. Штаммы утилизировали нефть, а также отдельные её компоненты (линейные и разветвленные алканы, ПАУ) и дизельное топливо при температуре как 24°C, так и 45°C.

В качестве критерия для отнесения углеводородокисляющих бактерий к термотолерантным использовали данные зависимости численности жизнеспособных клеток и удельной скорости роста культур от температуры. Такой подход позволил дополнить и систематизировать сведения о группе термотолерантных нефтеокисляющих бактерий, которые, в отличие от мезофильных и термофильных организмов, ранее не выделялись как отдельный объект исследования. Поскольку термотолерантные бактерии не всегда выделяются в отдельные таксономические единицы, их представители могут принадлежать к видам, ранее описанным как мезофильные.

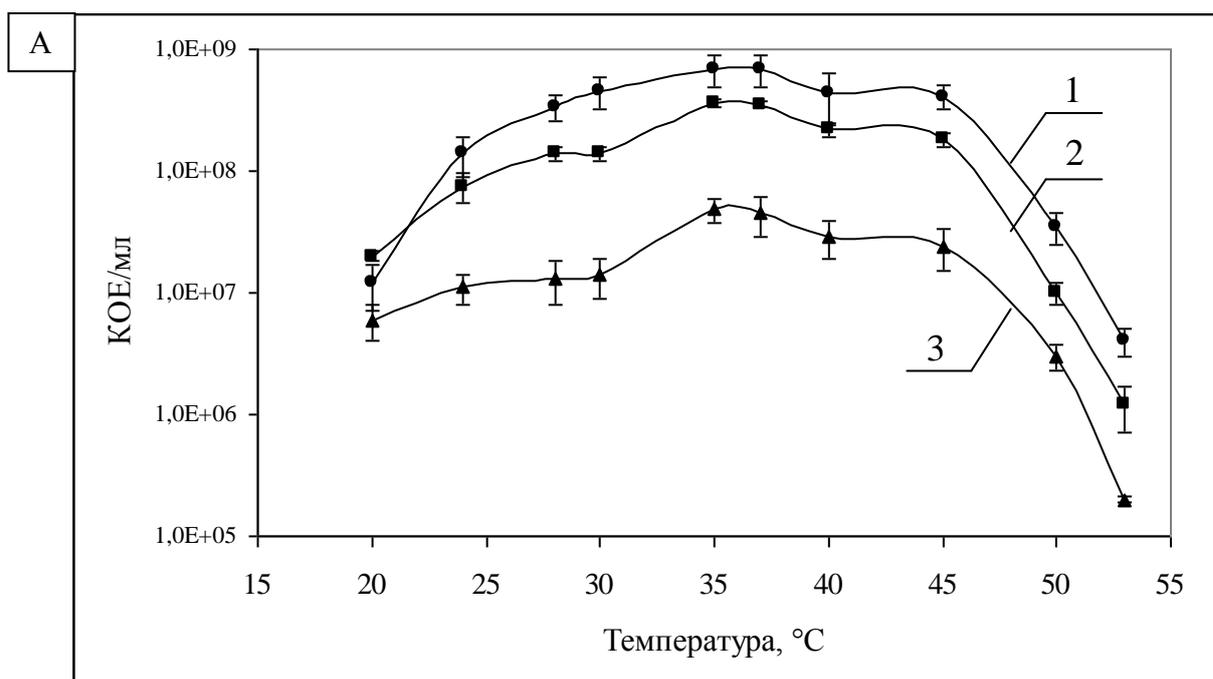
Ранее (Гусев, Минаева, 2003) указывалось, что у мезофильных и термотолерантных бактерий «оптимальные температуры роста ... находятся на одном уровне». Тем не менее, исследованные в данной работе бактерии имеют иные, чем у мезофильных, оптимум (35-37°C, в отличие от 25-30°C у мезофильных бактерий (Mohr & Krawiec, 1980)) и диапазон роста (20-53°C). В связи с этим выделенные термотолерантные бактерии могут быть отнесены к отдельной группе нефтеокисляющих микроорганизмов.

В нашей работе впервые выделены 2 термотолерантных штамма из пробы воды антарктического озера (Таблица 2). Все ранее описанные термоустойчивые, в том числе термофильные, микроорганизмы, выделенные в Антарктиде, были обнаружены в вулканах и термальных источниках (Imperio et al., 2008; Gousterova et al., 2014).

Для подтверждения термотолерантности отобранных в работе микроорганизмов был проведен анализ зависимости численности жизнеспособных клеток и удельной скорости роста штаммов от температуры. Рост бактерий анализировали в диапазоне 20-56°C. Наибольшей численности к началу стационарной фазы культуры достигали при 35-

37°C (Рис. 5А). Так, например, для штамма 1D при 35°C к моменту начала стационарной фазы роста была достигнута максимальная численность  $6.8 \times 10^8$  КОЕ/мл по сравнению с данными для других температур.

Удельные скорости роста культур в диапазоне температур 20-56°C достигали максимума также при 35°C. Таким образом, температура 35-37°C является оптимальной для роста штаммов. Некоторое снижение численности жизнеспособных клеток к началу стационарной фазы отмечали при повышении температуры до 40°C, в диапазоне 40-45°C отмечали стабилизацию численности, а при 50°C интенсивность роста культур снижалась. Тем не менее, при температуре 50°C численность клеток за время культивирования увеличивалась как минимум на порядок (до  $3 \times 10^6$  КОЕ/мл относительно начальной концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл для штамма 4D; до  $3.5 \times 10^7$  относительно начальной концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл для штамма 1D). Максимальные удельные скорости роста штаммов при 45°C составили: для 1D –  $0.33 \text{ ч}^{-1}$  (при 35°C –  $0.39 \text{ ч}^{-1}$ ), для Paг7 –  $0.27 \text{ ч}^{-1}$  (при 35°C –  $0.34 \text{ ч}^{-1}$ ), для 4D –  $0.22 \text{ ч}^{-1}$  (при 35°C –  $0.31 \text{ ч}^{-1}$ ) (Рис. 5Б).



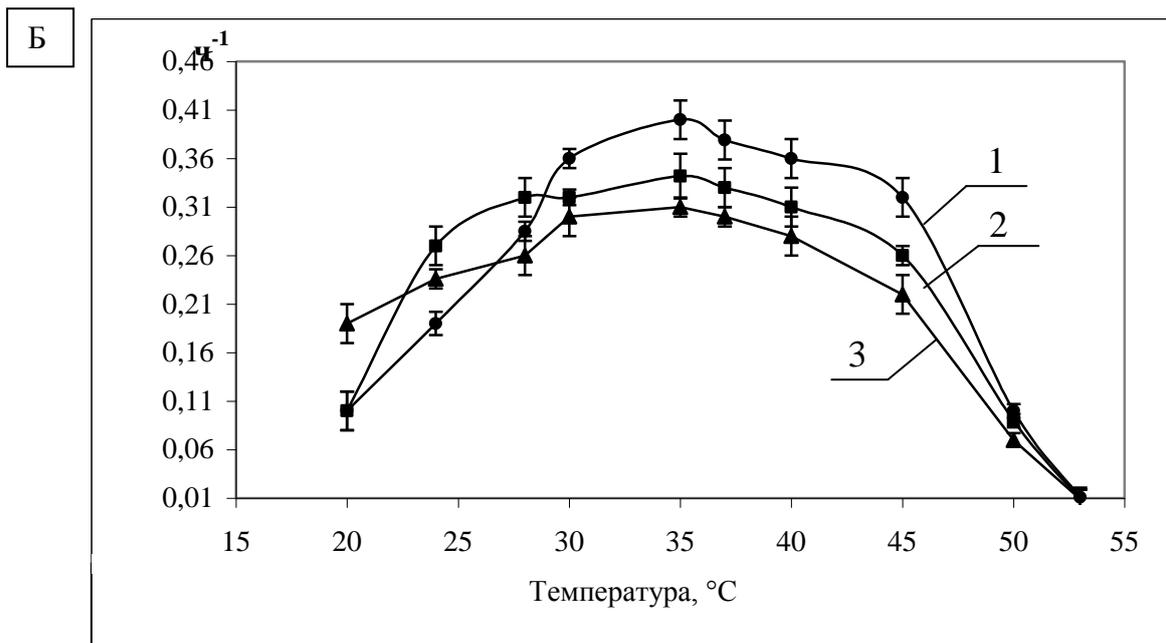


Рис. 5. Зависимости (А) численности жизнеспособных клеток, достигнутой к началу стационарной фазы роста (КОЕ/мл), и (Б) удельной скорости роста ( $\mu$ ,  $ч^{-1}$ ) термотолерантных штаммов 1D (1), Par7 (2) и 4D (3) от температуры ( $^{\circ}C$ ).

Таким образом, исследуемые штаммы могут быть определены как термотолерантные. Как видно из полученных данных, изучаемые бактерии имеют иной ( $35-37^{\circ}C$ ), чем у большинства мезофильных ( $25-30^{\circ}C$ ) (Mohr & Krawiec, 1980), оптимум и диапазон роста. При температурах  $40-45^{\circ}C$  параметры роста штаммов незначительно отличались от оптимальных.

Для продолжения исследования термотолерантных штаммов, составляющих рабочую коллекцию, было необходимо определить таксономическое положение бактерий. Идентификацию штаммов выполняли как молекулярно-генетическими методами, так и путем анализа роста бактерий на маркерных субстратах.

### 3.2. Идентификация и филогенетическая характеристика термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов

Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК и анализ полученных последовательностей показали, что среди выделенных в данной работе 13 термотолерантных штаммов присутствуют представители родов *Gordonia*, *Rhodococcus* и *Paenibacillus*.

В качестве филогенетического маркера для определения видового статуса термотолерантных бактерий использовали ген гиразы *gyrB*. При секвенировании гена гиразы с универсальными праймерами UP1/UP2r (Таблица 4 раздела «Материалы и

методы») были получены продукты длиной 900-1100 п.н. Полученные последовательности были сравнены с другими имеющимися в базе данных GenBank последовательностями гена *gyrB* родококков, было выполнено выравнивание и построены филогенетические деревья. Стабильность филогенетических деревьев была подтверждена с использованием алгоритмов Neighbor Joining (NJ) и Maximum Parsimony (MP).

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* термотолерантных родококков указывали на то, что последовательности этих генов гомологичны (от 94.0% до 99.7% идентичных п.н.) последовательности *gyrB* типового штамма *R. erythropolis* (Табл. 5). Ранее (Tancsics et al., 2014) было показано, что уровень сходства последовательностей генов *gyrB* между *R. erythropolis* и такими близкими к нему видами, как *R. jialingiae* и *R. qingshengii*, составляет 95%. Для однозначного определения штаммов как представителей видов *R. erythropolis*, *R. jialingiae* или *R. qingshengii* гомология генов *gyrB* с генами гиразы типовых штаммов этих видов должна быть больше 95%. Таким образом, штаммы Par2 (99.2%), Par7 (99.5%) и Par10 (99.7% идентичных п.н.) были отнесены к *R. erythropolis*, а остальные 7 штаммов могли быть представителями нового вида рода *Rhodococcus* (Табл. 5).

На основании анализа последовательностей генов 16S рРНК штаммы 1В, 1D и 1G были отнесены к роду *Gordonia*. При секвенировании последовательностей генов 16S рРНК штаммов 1В, 1D и 1G были получены последовательности длиной 990-1400 п.н.

Для определения видового статуса штаммов *Gordonia* в качестве филогенетического маркера использовали ген *alkB*, кодирующий алкан монооксигеназу (ЕС 1.14.15.3). Ранее (Shen et al., 2006; Shen et al., 2009) было показано, что белок-кодирующие гены, такие как *gyrB* и *catA*, эволюционируют быстрее, чем *rrn* опероны, а потому более информативны при таксономическом анализе гордоний. Также ранее уже было показано, что вариабельность нуклеотидных последовательностей гена *alkB* может быть использована для видовой дифференциации штаммов рода *Gordonia*, наряду с другими филогенетическими маркерами – 16S рРНК, *gyrB* и *catA* (Shen et al., 2009).

Таблица 5. Матрица сходства нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* термотолерантных штаммов и наиболее близких к ним типовых штаммов рода *Rhodococcus*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Rhodococcus</i> sp. 4D													
2	<i>Rhodococcus</i> sp. 6E	97.7												
3	<i>Rhodococcus</i> sp. 5A	98.5	98.2											
4	<i>Rhodococcus</i> sp. Par5	98.9	98.1	95.4										
5	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	99.0	97.9	95.3	97.2									
6	<i>Rhodococcus</i> sp. Par10	99.4	97.9	99.2	99.4	99.5								
7	<i>Rhodococcus</i> sp. Par14	97.6	99.6	95.6	94.0	94.8	97.9							
8	<i>Rhodococcus</i> sp. Par18	97.8	99.5	95.5	94.9	94.4	98.2	96.6						
9	<i>Rhodococcus</i> sp. Par2	99.1	97.7	98.7	99.6	99.5	99.3	97.9	98.1					
10	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	99.1	98.7	99.0	99.6	99.3	99.3	98.7	98.7	99.3				
11	<i>Rhodococcus_jialingiae</i> _KF374696	98.0	99.1	95.6	94.0	93.4	98.1	94.6	93.6	98.5	98.7			
12	<i>Rhodococcus_qingshengii</i> _KF374699	97.8	98.7	95.3	93.8	93.2	97.8	94.1	93.2	98.2	98.5	99.4		
13	<i>Rhodococcus_erythropolis</i> _AB355723	98.9	98.5	97.2	95.3	95.3	99.5	95.1	94.2	99.4	99.7	95.1	94.8	
14	<i>Rhodococcus_tukisamuensis</i> _AB262518	85.5	85.9	84.5	82.5	82.6	86.3	83.3	82.4	86.3	86.2	84.5	84.1	87.0

Штаммы 1В, 1D и 1G выделены из одного образца (почва из шламонакопителя, г. Москва), но анализ гена *alkB*, а также приведенные далее физиологические характеристики штаммов свидетельствуют, что они не являются субклонами. На основании сравнения последовательностей генов *alkB* штаммов 1В, 1D и 1G с последовательностями этих генов у типовых штаммов рода *Gordonia* было построено филогенетическое дерево по методу NJ. На филогенетическом дереве штамм 1В входил в один кластер с типовым штаммом *G. amicalis* (Рис. 6). Последовательности *alkB* штамма 1В и типового штамма *G. amicalis* (код ссылки в GenBank GU130260.1) обладали высокой степенью гомологии (99.6% идентичных п.н.), что позволило идентифицировать штамм 1В как *G. amicalis*.

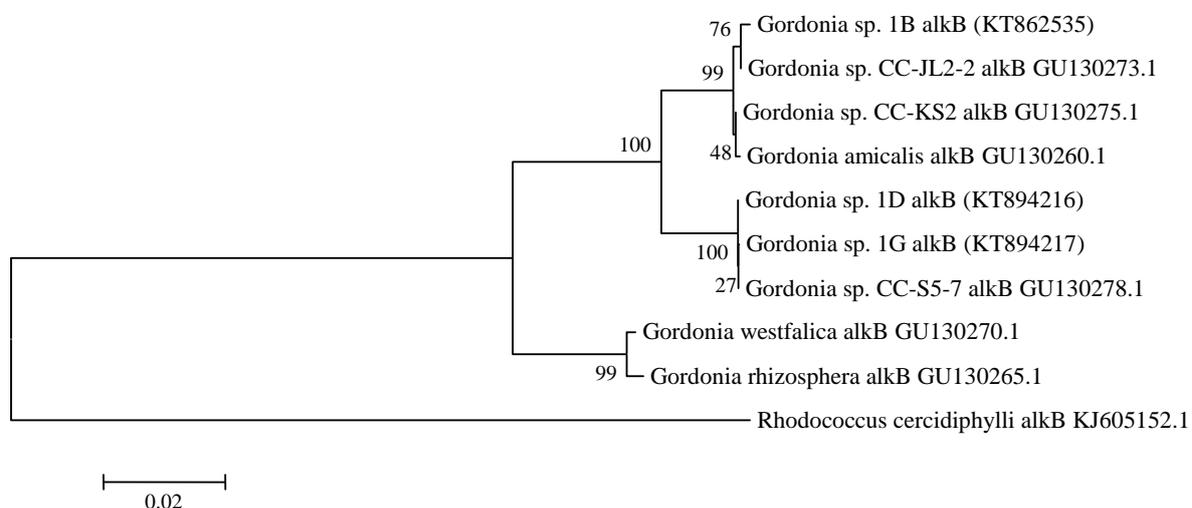


Рис. 6. Филогенетическое дерево штаммов рода *Gordonia*, построенное по методу NJ на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *alkB*.

Однако, штаммы *Gordonia* sp. 1D и 1G не образовывали на филогенетическом дереве (рис. 6) кластера с каким-либо типовым штаммом рода *Gordonia*. Можно предположить, что эти штаммы представляют новый вид в составе данного рода.

Отдельный видовой статус штамма *Gordonia* sp. 1D подтвердился при анализе последовательностей генов *gyrB* (рис. 7).

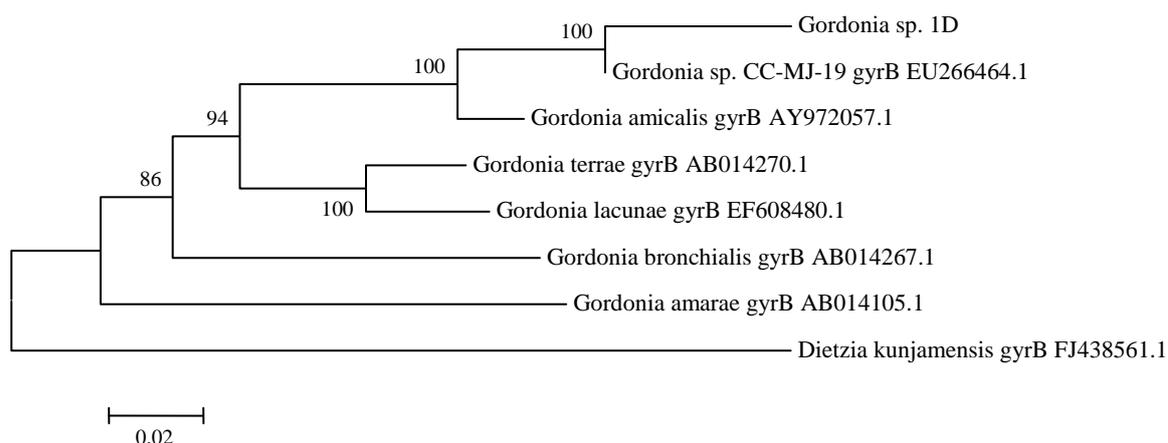


Рис. 7. Филогенетическое дерево, построенное по методу NJ на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* штамма *Gordonia* sp. 1D.

Так, последовательности генов *gyrB* штамма *Gordonia* sp. 1D и типового штамма *G. amicalis* (код ссылки в GenBank AY972057.1) содержали 92.2% идентичных п.н., что не позволило однозначно отнести штамм 1D к *G. amicalis*, несмотря на их близкое расположение на филогенетическом дереве (табл. 6). Наиболее близкой к последовательности гена *gyrB* штамма 1D является последовательность, полученная Шен с соавт. (Shen et al., 2008) для штамма CC-MJ-19, однако штамм не был идентифицирован авторами до вида.

Таблица 6. Матрица сходства штамма *Gordonia* sp. 1D с представителями других гордоний

	Штамм	1	2	3	4	5	6	7
1	<i>Gordonia</i> sp. 1D							
2	<i>Gordonia</i> _sp._CC-MJ-19_gyrB_EU266464.1	96.8						
3	<i>Gordonia</i> _amicalis_gyrB_AY972057.1	92.2	95.5					
4	<i>Gordonia</i> _amarae_gyrB_AB014105.1	75.8	79.9	81				
5	<i>Gordonia</i> _bronchialis_gyrB_AB014267.1	78.8	83.5	84.1	81.6			
6	<i>Gordonia</i> _terrae_gyrB_AB014270.1	84.2	88.4	88.8	81.6	86.4		
7	<i>Gordonia</i> _lacunae_gyrB_EF608480.1	82.9	87.8	88.8	81.4	86.1	95.3	

Штамм 12В по данным секвенирования гена 16S рРНК был идентифицирован как *Paenibacillus* sp. и наиболее близок к виду *P. naphthalenovorans*. Близость штамма к виду *P. naphthalenovorans* подтверждает его способность утилизировать маркерный субстрат –

нафталин (Таблица 8). Штаммы 8А-3А и А2-6 по результатам анализа последовательности гена 16S рРНК были определены соответственно как *Rhodococcus* sp. и *Deinococcus* sp. Последовательности генов 16S рРНК штаммов L5А-BSU и AL-18 были близки к последовательностям этого гена у типового штамма *R. pyridinivorans*. Кроме того, штаммы утилизировали пиридин в качестве единственного источника углерода и энергии, что позволило определить их как представителей *R. pyridinivorans* на основании способности к росту на маркерном субстрате (табл. 7).

Таблица 7. Таксономическое положение термотолерантных штаммов

Штаммы	Ближайший таксон
1В	<i>Gordonia amicalis</i>
1D, 1G	<i>Gordonia</i> sp.
Par2, Par6, Par10	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
4D, 5А, 6Е, Par5, Par7, Par14, Par18, 8А-3А	<i>Rhodococcus</i> sp.
12В	<i>Paenibacillus</i> sp.
AL-18, L5А-BSU	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
А2-6	<i>Deinococcus</i> sp.

Таким образом, по результатам секвенирования и филогенетического анализа было установлено таксономическое положение используемых в работе термотолерантных штаммов. Таксономическое разнообразие термотолерантных бактерий, выделенных из проб грунта и воды России, Казахстана и Беларуси, представлено грамположительными бактериями, в основном актиномицетами, однако найдены также представители родов *Paenibacillus* (филум *Firmicutes*) и *Deinococcus* (филум *Deinococcus Thermus*).

3.3. Анализ способности термотолерантных культур утилизировать углеводороды и продуцировать биоПАВ

У термотолерантных штаммов, используемых в работе, были получены профили субстратной специфичности и определена способность продуцировать соединения, обладающие поверхностно-активными свойствами.

#### 3.3.1. Субстратная специфичность бактерий

Штаммы, используемые в работе, были способны утилизировать нефть, дизельное топливо, а также различные индивидуальные углеводороды (табл. 8).

Таблица 8. Спектр субстратов, утилизируемых бактериями при температурах 24°C и 45°C

	Нафталин		Фенантрен		Антрацен		Флуорен		Октан		Нонан		Декан		Гексадекан		Гептаметил-нонан		Дизельное топливо	
	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C
<i>Gordonia amicalis</i> 1B									++*		+**	+	++	+	++	++			++	+
<i>Gordonia</i> sp. 1D									++		++	+	++	+	++	++			++	+
<i>Gordonia</i> sp. 1G									++		++	+	++	+	+	+			++	+
<i>Rhodococcus</i> sp. 4D													+	+	+	+			+	+
<i>Rhodococcus</i> sp. 5A													+		+	+			+	+
<i>Rhodococcus</i> sp. 6E			+	+									+	+	+	+	+		+	+
<i>Paenibacillus</i> sp. 12B	+	+	+	+	+	+							+	+	+	+			+	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par2					+	+							+	+	+	+			++	+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par5													+	+	+	+	+		++	+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par6			+	+									+	+	+	+	+		++	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7													+	+	+	+			+	+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par10													+	+	+	+			++	+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par14															+	+			+	+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par18													+	+	+	+			+	+

\* очень хороший рост, \*\* хороший рост, □ отсутствие роста

В данной работе исследование способности штаммов к деструкции углеводов различной химической структуры было проведено при температуре как 24°C, так и 45°C. Анализ результатов эксперимента показал, что наиболее легко утилизируемыми субстратами для бактерий являются дизельное топливо, декан и гексадекан. Дизельное топливо является сложным субстратом, состоящим из большого количества компонентов, однако в его состав входят достаточно легко утилизируемые углеводороды, в частности, алканы, в связи с чем микроорганизмы активно утилизировали его в качестве источника углерода.

Штамм *Paenibacillus* sp. 12В деградировал нафталин, фенантрен и антрацен, но не флуорен. В целом, данный штамм, выделенный из пробы бурового раствора в Казахстане, отличался способностью утилизировать полиароматические углеводороды (ПАУ), некоторые алканы и дизельное топливо. Способность штамма к росту на ПАУ и алканах согласуется с уже известной информацией о пенибациллах (Daane et al., 2002). Выделенные штаммы *Rhodococcus* отличались слабой способностью к деструкции ПАУ. Штаммы 6Е и Par6 утилизировали фенантрен, Par2 – антрацен.

Штаммы 5А и Par14 утилизировали только некоторые алканы: Par14 утилизировал только гексадекан, 5А – декан и гексадекан. Par2, Par6, Par7 и Par10 окисляли нонан, декан и гексадекан (Таблица 8).

К окислению алканов с разветвленным скелетом (гептаметилнонана) были способны только 6Е, Par5 и Par6, и с повышением температуры они теряли эту способность. Способность к деструкции разветвленных алканов ранее отмечали Такеи с соавт. (Takei et al., 2008) у штамма *Rhodococcus* sp. TMP2. Штамм *Rhodococcus* sp. TMP2 окислял пристан при 20°C, однако при 30°C деградации этого соединения не наблюдалось.

Штаммы *Gordonia* являются известными деструкторами алканов (Arenskotter et al., 2004; Xue et al., 2003; Hao et al., 2008). Анализ спектра утилизируемых субстратов выделенных в нашей работе штаммов *G. amicalis* 1В, *Gordonia* sp. 1D, *Gordonia* sp. 1G показал, что микроорганизмы активно утилизуют алканы нормального строения и дизельное топливо как при нормальной (24°C), так и при повышенной (45°C) температурах (Таблица 8). С повышением температуры отмечали потерю способности штаммов *Gordonia* утилизировать октан. При росте на алканах наблюдали образование агрегатов клеток штаммов *Gordonia amicalis* 1В, *Gordonia* sp. 1D, *Gordonia* sp. 1G. Таким образом, для представителей *Gordonia amicalis* впервые отмечена способность к росту и утилизации углеводородных субстратов при температурах выше 40°C.

Полученные данные по штаммам *Rhodococcus* дополняют уже имеющуюся информацию об их способности расти при повышенных температурах (Sorkhoh et al., 1990a; Sorkhoh et al., 1990b; Abu-Ruwaida et al., 1991). Интересно отметить, что, в отличие от известных термотолерантных родококков, выделенных из почв Кувейта, родококки, изучаемые нами, были выделены из проб, отобранных не только в высокотемпературных регионах (в Казахстане), но также на Байкале и в Антарктиде.

Таким образом, для термотолерантных культур, выделенных в ходе данной работы, были получены следующие характеристики (Табл. 9).

Таблица 9. Характеристики термотолерантных культур, использованных в работе

Штамм	Характеристика штамма
<i>Gordonia amicalis</i> 1B	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Gordonia</i> sp. 1D	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Gordonia</i> sp. 1G	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. 4D	Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. 5A	Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. 6E	Phn+, Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par2	Ant+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par5	Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	Phn+, Non+, Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+,
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par10	Phn+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par14	Hde+, Dsf+
<i>Rhodococcus</i> sp. Par18	Phn+, Dec+, Hde+, Dsf+

Используемые сокращения: Nah – нафталин, Phen – фенантрен, Anthr – антрацен, Flu – флуорен, Oct – октан, Non – нонан, Dec – декан, Hde – гексадекан, Dsf – дизельное топливо, Hmn – гептаметилнонан

### 3.3.2. Детекция, секвенирование и анализ генов алкан монооксигеназ у *Gordonia* и *Rhodococcus*

В результате анализа спектра окисляемых субстратов (Таблица 8) у штаммов *Gordonia* sp. 1D, 1G и *G. amicalis* 1B была отмечена способность к росту на алканах, в том числе при повышенной (45°C) температуре. Штаммы активно утилизировали линейные алканы с длиной цепи C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>. Способность штаммов окислять алканы с различной длиной цепи позволила предположить, что термотолерантные штаммы *Gordonia* обладают

генами, кодирующими две алкан гидроксилазы: *alkB* и CYP153. Подобное явление ранее отмечали у других представителей актиномицетов (Nie et al., 2013; Alonso-Gutierrez et al., 2011; van Beilen et al., 2006).

В работе был проведен поиск алкан монооксигеназных систем у штаммов *Gordonia*. В качестве матрицы для амплификации генов *alkB* у штаммов *Gordonia* использовали тотальную ДНК, выделенную из штаммов. Для амплификации фрагментов гена *alkB* использовали пару праймеров *alkBF* и *alkBR* (Таблица 4 раздела «Материалы и методы»). Фрагмент длиной ~550 п.н. был успешно амплифицирован во всех трех термотолерантных штаммах *Gordonia* (Рис. 8-А), выделенных из пробы грунта с территории Московского нефтеперерабатывающего завода (Капотня, г. Москва).

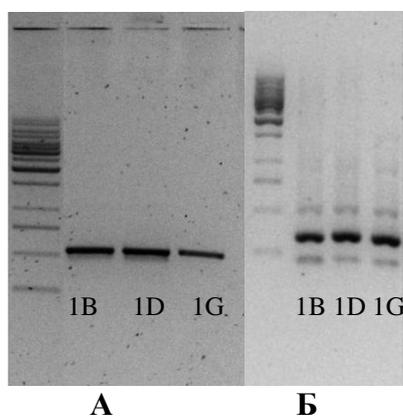


Рис. 8. Электрофореграмма ампликонов фрагментов алкан гидроксилаз *alkB* (А) и CYP153 (Б) штаммов *Gordonia* (масса продуктов 550 п.н. и 330 п.н. соответственно).

Последовательности генов *alkB* были определены путем секвенирования с праймерами *alkBF* и *alkBR*. Последовательности термотолерантных гордоний, четырех наиболее близких штаммов и 11 типовых штаммов, в том числе аут-группы (*Rhodococcus cercidiphylli*) были выровнены, матрица сходства этих штаммов представлена в Таблице 10. Сходство последовательностей генов *alkB*, принадлежащих штаммам разных видов, находилось в диапазоне от 78,6% (*G. amicalis* 1D и *G. soli*) до 99,6% (*G. rhizosphaera* и *G. westfalica*).

Для амплификации фрагментов генов цитохром-зависимой алкан монооксигеназы CYP153 использовали пару праймеров *p450fw1* и *p450rv3* (van Beilen et al., 2006). Продукт гена CYP153 массой ~330 п.н. был амплифицирован для всех трех термотолерантных штаммах *Gordonia* (Рис. 8-Б).

Полученные последовательности генов *alkB* были сравнены с уже известными последовательностями генов *alkB* гордоний, а также ближайших представителей других *Nocardia*. Был проведен анализ известных аминокислотных последовательностей гена

alkB для оценки вариаций этого гена на межвидовом уровне среди представителей нокардиоподобных бактерий: *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamuriella*, *Dietzia* и *Nocardia* (Рис. 9-А). Также мы проанализировали последовательности фрагментов генов 16S рРНК (Рис. 9-Б) и сравнили полученные результаты.

На филогенетическом дереве алкан гидроксилаз штаммы *Gordonia* образуют два кластера, меньший из них включает всего два штамма – *G. bronchialis* и *G. sputi*. В то же время, на филогенетическом дереве 16S рРНК штамм *G. bronchialis* входит в единый кластер *Gordonia*, а типовой штамм *G. sputi* входит в Кластер 1 родококков и близок к *Rhodococcus ruber*.

Таблица 10. Различия последовательностей генов *alkB* у *Gordonia*

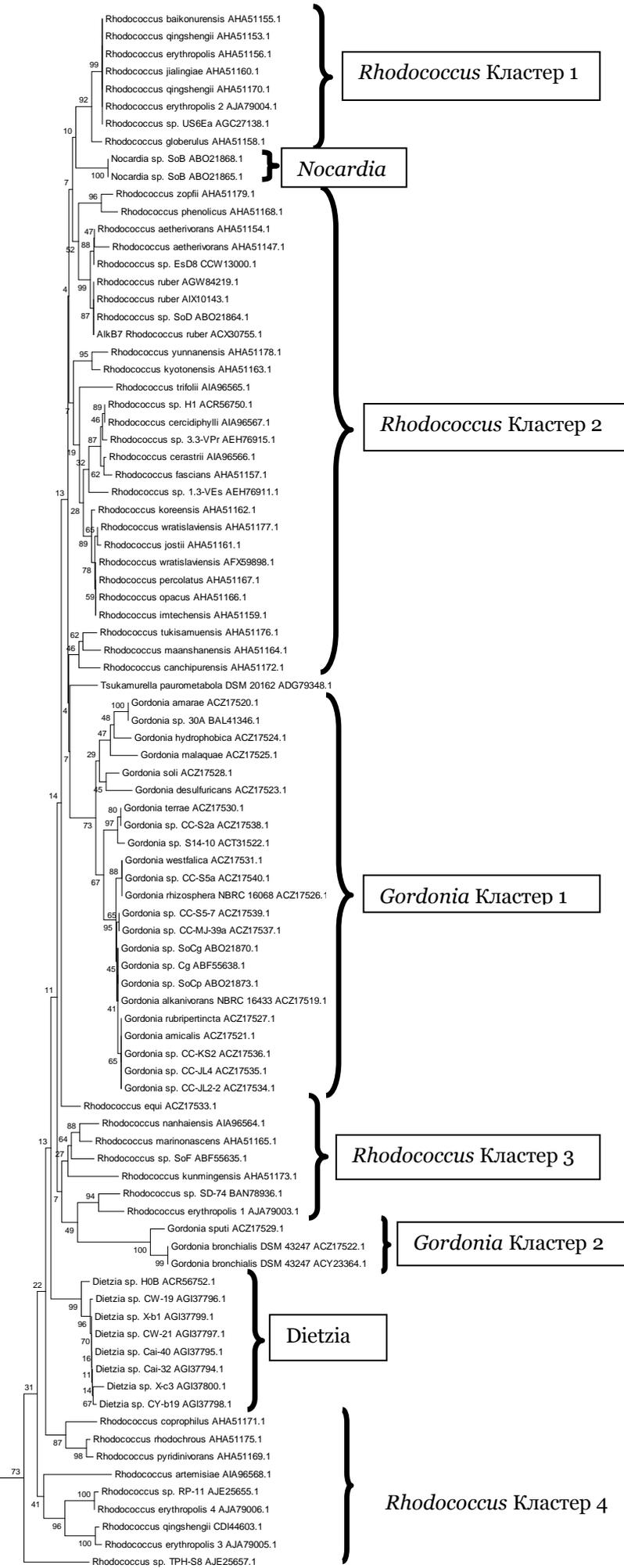
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>Gordonia_amicalis_1B</i>																
2	<i>Gordonia_sp_1G</i>	97,2															
3	<i>Gordonia_sp_CC-S5-7_alkB_GU130278.1</i>	97,4	100,0														
4	<i>Gordonia_sp_CC-MJ-39a_alkB_GU130276.1</i>	98,4	99,1	99,2													
5	<i>Gordonia_sp_CC-KS2_alkB_GU130275.1</i>	99,8	97,7	97,6	98,4												
6	<i>Gordonia_sp_CC-JL2-2_alkB_GU130273.1</i>	100,0	97,7	97,6	98,4	100,0											
7	<i>Gordonia_amicalis_alkB_GU130260.1</i>	99,6	97,4	97,3	98,2	100,0	100,0										
8	<i>Gordonia_rubripertincta_alkB_GU130266.1</i>	98,5	96,7	96,7	97,5	98,9	98,9	98,9									
9	<i>Gordonia_westfalica_alkB_GU130270.1</i>	94,3	94,5	94,3	94,3	94,3	94,3	94,0	95,1								
10	<i>Gordonia_alkanivorans_alkB_GU130258.1</i>	98,0	96,7	96,7	97,5	98,5	98,4	98,5	99,1	95,6							
11	<i>Gordonia_desulfuricans_alkB_GU130262.1</i>	81,6	81,5	81,8	81,3	81,6	81,6	80,2	81,0	81,3	80,5						
12	<i>Gordonia_rhizosphera_alkB_GU130265.1</i>	94,2	94,1	94,2	94,1	94,2	94,2	94,0	95,1	99,6	95,6	80,9					
13	<i>Gordonia_terrae_alkB_GU130269.1</i>	85,9	86,2	87,2	86,5	86,1	86,0	86,1	86,5	86,9	86,3	79,3	87,4				
14	<i>Gordonia_soli_alkB_GU130267.1</i>	79,4	78,5	78,7	79,0	79,8	79,7	80,4	80,0	80,1	79,8	83,4	80,2	79,3			
15	<i>Rhodococcus_cercidiphylli_alkB_KJ605152.1</i>	75,7	75,5	76,1	76,4	76,1	76,0	76,2	76,6	77,4	77,5	75,1	77,9	74,2	75,7		
16	<i>Gordonia_sp_1D</i>	97,2	100,0	100,0	99,1	97,7	97,7	97,4	96,7	94,4	96,7	81,8	94,0	86,8	78,6	76,1	

Сравнение генов 16S рРНК родококков показало, что на филогенетическом дереве штаммы *Rhodococcus* образуют два кластера (Рис. 9-Б). Однако алкан монооксигеназы родококков представляют собой четыре изолированных группы. Таким образом, наблюдая стабильность кластерирования *Gordonia* и *Dietzia* на уровне генов 16S рРНК и алкан монооксигеназ *alkB*, а также различия в группировании родококков на филогенетических деревьях, можно заключить, что алкан монооксигеназы родококков развивались иначе, чем алкан монооксигеназы других актиномицетов.

Анализ показал, что аминокислотные последовательности генов *alkB* штаммов *Dietzia* наиболее консервативны. Было проанализировано 8 помещенных в Genbank последовательностей генов *alkB*, принадлежащих штаммам *Dietzia*, и выявлено, что они имеют практически одинаковые, с некоторыми незначительными заменами, аминокислотные последовательности. Гены *alkB* рода *Gordonia* группируются в два кластера (Рис. 9-А). Так, представители первого, основного кластера обладают участками TLA QTF YGH FYI EHN RGH HVR VAT PE (позиции 11-36 в последовательностях штаммов *Gordonia* ACZ17539, ABO21870, ABF55638, ACZ17519, ACZ17527), DPA SSR FGE TFW RFL PRS VWG SLK S (позиции 42-66) и VLA AVF GWQ VLP FLV IQA VYG (позиции 115-135). В аминокислотных последовательностях *Gordonia bronchialis* и *Gordonia sputi*, представляющих второй кластер, наблюдается ряд замен. В частности, два консервативных региона, присутствующих в первом кластере, имеют вид DPA SSR **LGE SFY RFW FRT VSG SLR S** и **ALT IWL GVG ILP YLV LQA VVG**. Отдельное расположение *G. bronchialis* и *G. sputi* может быть связано с тем, что микроорганизмы этих видов обычно выделяют из мокроты, в отличие от прочих гордоний, являющихся в основном почвенными и водными штаммами. Процент сходства между Кластером 1 и Кластером 2 гордоний находится в диапазоне 49,9-68%.

Термотолерантные штаммы *Gordonia* sp. 1B, 1D и 1G находятся в Кластере 1 гордоний (Рис. 9-А, Рис. 6), последовательности их генов *alkB* близки к последовательностям этих генов у *G. amicalis*. В аминокислотных последовательностях *alkB* термотолерантных гордоний выявлены характерные для всех представителей суперсемейства FADS кластерные гистидиновые мотивы HXXXH, HXXXHH и HXXHH.

9-A



9-Б



Рис. 9. Филогенетический анализ нокардиоподобных штаммов с использованием А) аминокислотных последовательностей генов *alkB*, Б) фрагментов генов 16S рРНК

У термотолерантных представителей рода *Rhodococcus* также отмечали способность к утилизации линейных алканов с длиной цепи C<sub>9</sub>-C<sub>16</sub>. В отличие от штаммов *Gordonia*, родококки не были способны утилизировать алканы с более коротким скелетом, в частности, октан (Таблица 8). У штаммов *Rhodococcus* также был проведен поиск генов, ответственных за окисление алканов. Для амплификации использовали пару праймеров alkBF и alkBR (Таблица 4 раздела «Материалы и методы»). Фрагмент длиной ~550 п.н. был успешно амплифицирован во всех штаммах *Rhodococcus*, выделенных в данной работе (Рис. 10-А). При амплификации фрагментов генов цитохромовых гидроксилаз в штаммах термотолерантных родококков были получены фингерпринты неспецифических продуктов, однако генов гидроксилазы CYP153 обнаружено не было (Рис. 10-Б).

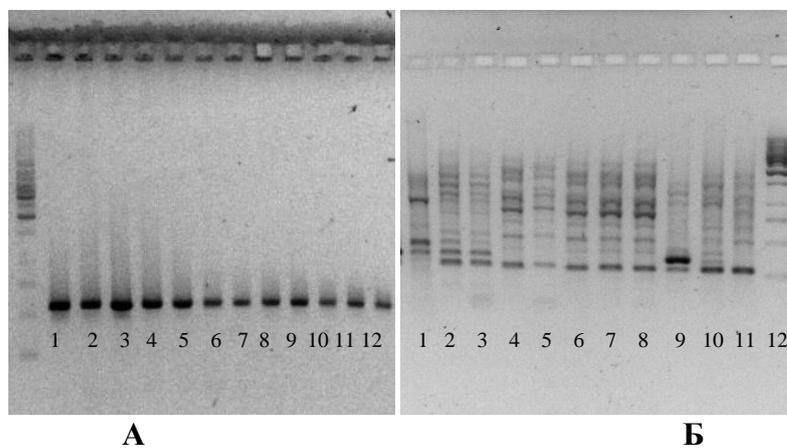


Рис. 10. Электрофореграмма ампликонов фрагментов алкан гидроксилаз *alkB* (А) и CYP153 (Б) штаммов *Rhodococcus* (масса продуктов 550 и 330 п.н. соответственно). Штаммы: 1 – 4D, 2 – 5А, 3 – 6Е, 4 – Par2, 5 – Par5, 6 – Par6, 7 – Par7, 8 – Par10, 9 – Par14, 10- Par18, 11 – AL-18, 12 – 8А-3А.

Отсутствие у штаммов *Rhodococcus* второй системы деструкции алканов подтверждается их неспособностью утилизировать алканы короче C<sub>10</sub>. Таким образом, в отличие от термотолерантных гордоний, родококки поддерживают единственную систему деградации алканов, позволяющую утилизировать соединения с длиной цепи от C<sub>10</sub>.

Полученные последовательности генов *alkB* термотолерантных родококков были сравнены с уже известными последовательностями генов *alkB* *Rhodococcus*, а также ближайших представителей других *Nocardia* (Рис. 9-А).

Из общего филогенетического дерева, построенного по аминокислотным последовательностям *alkB* нокардиоподобных бактерий видно, что алкан монооксигеназы родококков формируют на этом дереве 4 отдельных кластера. В работе были проанализированы аминокислотные последовательности *alkB* термотолерантных

родококков, выявлено, что штаммы расположены в Кластере 1 и являются близкими к *alkB Rhodococcus erythropolis*. Кластер 1 *alkB* родококков объединяет последовательности *R. erythropolis* и близкородственных видов *R. jialingiae*, *R. qinshengii*, *R. globerulus* и *R. baikonuriensis*, аминокислотные последовательности генов *alkB* кластера 1 содержат длинные консервативные участки. Так, позиции 1-198 в сиквенсах АНА51156, АНА51153, АНА51160, АНА51170, соответствующих *R. qinshengii*, *R. erythropolis*, *R. baikonuriensis*, *R. jialingiae*, присутствуют идентичные аминокислотные последовательности. Интересно отметить, что при выравнивании последовательностей этих штаммов с типовым штаммом *Tsukamurella paurometabola* DSM20162 после 17-аминокислотного участка LVL ACY LWS ATD LSW LG (позиции 1-17 в сиквенсах АНА51156, АНА51153, АНА51160, АНА51170) в аминокислотных последовательностях родококков наблюдается четырехпозиционный разрыв, соответствующий вставке GVYA в последовательности алкан гидроксилазы *Tsukamurella*, после чего консервативный участок продолжается. В связи с этим можно предположить, что вставка GVYA в аминокислотной последовательности *alkB Tsukamurella* является эволюционно более поздним приобретением.

### 3.4. Изучение способности штаммов продуцировать поверхностно-активные вещества

Используемые в работе термотолерантные штаммы были идентифицированы как актиномицеты родов *Gordonia* и *Rhodococcus*. Для этих родов бактерий характерны модификации клеточной стенки гидрофобными соединениями, способствующими эмульгированию углеводородных субстратов (Sokolovska et al., 2003; Sutcliffe et al., 2010). Эмульгирование гексадекана клеточными суспензиями бактерий наблюдали при культивировании термотолерантных штаммов в жидкой среде Эванса с добавлением глюкозы, гексадекана или дизельного топлива в качестве источника углерода и энергии, а также при культивировании штаммов на агаризованной среде Эванса с теми же субстратами. Клеточные суспензии всех термотолерантных штаммов были способны стабилизировать эмульсии (Таблица 11).

Для характеристики поверхностно-активных соединений экзо-типа (экзо-биоПАВ) измеряли поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта, полученного в результате удаления клеток. Ранее мы отмечали у штаммов *Rhodococcus* sp. S67, S26 и X5, родственных *R. erythropolis*, способность к продукции внеклеточных биосурфактантов при культивировании на углеводородных субстратах, в частности, гексадекане (Petrikov et al., 2013). Однако также мы выявили, что термотолерантные родококки не продуцируют в среду культивирования экзоклеточных биосурфактантов при росте как на гидрофобных

субстратах (гексадекан, дизельное топливо), так и на гидрофильном субстрате – глюкозе. Поверхностное натяжение культуральной жидкости этих штаммов незначительно отличалось от ПН контроля (среды Эванса), равного 72 мН/м. Таким образом, для исследуемых термотолерантных родококков не характерна продукция экзо-биоПАВ, их поверхностно-активные свойства ограничиваются модификациями клеточной стенки, позволяющими эмульгировать гексадекан.

Таблица 11. Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) клеточной суспензии с гексадеканом

Штамм	$E_{24}$ клеток, выращенных на среде E + гексадекан, %	$E_{24}$ клеток, выращенных на среде E + глюкоза, %	$E_{24}$ клеток, выращенных на среде ЛБ, %
par2	26±4	55±6	37±5
par5	42±4	5±1	50±6
par6	34±6	10±3	40±4
par10	25±3	8±2	37±4
par14	43±5	28±5	36±4
par18	44±5	22±5	47±5
1B	38±6	22±3	30±5
1D	13±2	10±2	25±4
1G	44±6	19±4	45±7
4D	13±4	25±5	50±7
5A	18±2	27±4	36±5
12B	10±2	36±5	10±2

У штаммов *G. amicalis* 1B, *Gordonia* sp. 1D и 1G отмечали продукцию внеклеточных биоПАВ. При культивировании этих штаммов на минеральной среде с добавлением гексадекана и дизельного топлива в качестве источника углерода отмечали снижение поверхностного натяжения культуральной жидкости относительно ПН контроля (среды Эванса). Минимальные значения поверхностного натяжения были получены при

культивировании штаммов при температуре 24°C и составляли 43-45 мН/м (Табл. 12). Поверхностное натяжение контроля (жидкой среды Эванса) составляло 72 мН/м.

Таблица 12. Поверхностно-активные свойства штаммов *Gordonia* при культивировании при различных температурах

Штаммы	Поверхностное натяжение, мН/м		Индекс эмульгирования, E <sub>24</sub> , %	
	24°C	45°C	24°C	45°C
1B	44±5	50±4	32±4	23±4
1D	46±6	51±6	28±5	26±4
1G	43±5	49±6	34±5	20±6

Таким образом, установлено, что, помимо клеточносвязанных соединений, способствующих эмульгированию гексадекана клеточной суспензией, штаммы *Gordonia* 1B, 1D и 1G продуцируют в культуральную жидкость внеклеточные ПАВ.

Внеклеточные биосурфактанты гордоний выделяли из бесклеточного супернатанта путем хлороформ-метанольной экстракции, после чего упаривали экстракт. Полученные продукты (оранжевые в случае штаммов 1B и 1D и черно-коричневый в случае 1G) использовали в дальнейшем исследовании.

Для идентификации биоПАВ с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали алюминиевые пластины с нанесенным на них сорбентом – силикагелем. Так как для штаммов *Gordonia* наиболее характерна продукция гликолипидных ПАВ, то проводили качественный анализ на присутствие гликолипидов в продукте. Для разделения гликолипидов использовали смеси, состоящие из следующих компонентов (по объему):

- 1) 65:25:4 хлороформ:метанол:вода
- 2) 65:15:2 хлороформ:метанол:вода
- 3) 65:25:4 хлороформ:метанол:уксусная кислота
- 4) 65:15:2 хлороформ:метанол:уксусная кислота

Наиболее четкое разделение компонентов смеси наблюдали в системе X:M:В 65:15:2 (Рис. 11). В неочищенных экстрактах биоПАВ, продуцируемых штаммами 1D и 1G, наблюдали серию пятен, примерно одинаковых по интенсивности. В смеси ПАВ, продуцируемых штаммом 1B, отмечали присутствие доминирующего компонента (большое пятно при окрашивании). Таким образом, система X:M:В 65:15:2 обладает оптимальным соотношением полярностей для разделения биоПАВ, продуцируемых термотолерантными штаммами *Gordonia*. Окрашивание с помощью α-нафтола и серной

кислоты выявляло на хроматографических пластинах серию фиолетовых пятен, что свидетельствует о присутствии углеводных фрагментов в молекулах соединений.

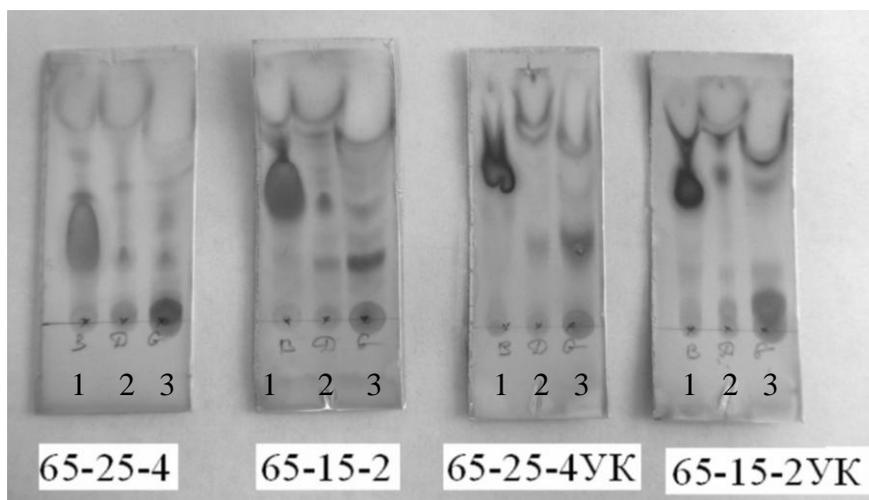


Рис. 11. Хроматограммы гликолипидных смесей, продуцируемых штаммами *Gordonia*, при разделении их различными системами элюентов. Штаммы: 1 – *G. amicalis* 1В, 2 – *Gordonia* sp. 1D, 3 – *Gordonia* sp. 1G.

При сравнении биосурфактантов, продуцируемых штаммами *Gordonia* при различных температурах выявили, что гликолипидные смеси, полученные после культивирования бактерий при 24°C и 45°C, отличаются по составу, следовательно, температура влияет на продукцию гликолипидов термотолерантными штаммами *Gordonia* (Рис. 12).

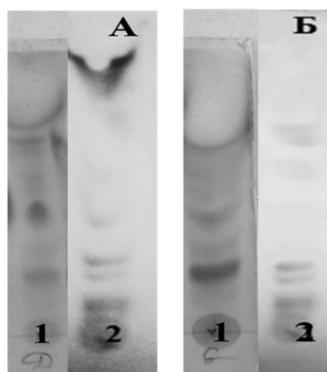


Рис. 12. Хроматограммы гликолипидных смесей, продуцируемых штаммами *Gordonia* sp. 1D (А) и 1G (Б) при культивировании при температурах 24°C (1) и 45°C (2). Система для элюирования – Х:М:В 65:15:2.

Тем не менее, поверхностное натяжение культуральной жидкости, измеренное при 24°C и 45°C, практически не отличается. Таким образом, можно заключить, что температура влияет на качественный состав гликолипидной смеси, однако, поверхностно-

активные свойства этих соединений в целом не изменяются: при 45°C ПАВ, продуцируемые гордониями, не менее эффективны, чем при 24°C.

3.5. Отбор наиболее эффективных нефтеокисляющих термотолерантных штаммов и составление бактериального консорциума для ремедиации грунтов в жарком климате

Основными параметрами для отбора перспективных термотолерантных бактерий-нефтедеструкторов были способность утилизировать углеводороды в присутствии соли (3-10%) в среде, способность продуцировать поверхностно-активные соединения и сохранять метаболическую активность в присутствии высоких концентраций нефти (5-20%). При составлении консорциума штаммов также учитывали данные о спектрах окисляемых субстратов и отсутствие негативного взаимодействия между штаммами.

#### 3.5.1. Физиологическая характеристика штаммов

Выявлено, что большинство термотолерантных бактерий, используемых в работе, способны к утилизации углеводородов (дизельного топлива) при содержании соли в среде 3% (Табл. 13). Повышение концентрации соли в среде резко снижало способность штаммов к росту, при содержании соли 10% рост на дизельном топливе наблюдали только у штаммов *Gordonia* sp. 1D и *G. amicalis* 1B.

Табл. 13. Способность термотолерантных штаммов утилизировать дизельное топливо в присутствии соли в среде (3-10%)

Штаммы	3%		5%		7%		10%	
	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C
1B	+	+	±	+	±	±	±	
1D	++	+	+	+	±	+	±	
1G	+	+	+	+	+	+		
4D	++	+	±		±			
5A	++	±	+		±			
6E	++	+	+	±				
12B	±	+	±	±				
Par2	+	+	±					
Par5	+	±	+					
Par6	+	+	±		±			
Par7	++	+	+	+	±			

Par10	+	±	+	±	±	±		
Par14	+		+					
Par18	+							

\* хороший рост, \*\* очень хороший рост, \*\*\* слабый рост, □ нет роста

Устойчивость к 3% соли в среде отмечали у всех штаммов при 24°C, однако при повышении температуры наблюдали частичное снижение резистентности к соли. Так, уже при 3% соли при температуре 45°C рост штаммов Par14 и Par18 ингибировался. При 7% соли отмечали слабый рост только у штамма Par10, штаммы *Gordonia* 1B и 1D выдерживали до 10% соли в среде как при 24°C, так и при 45°C.

Исследование рабочего диапазона pH термотолерантных штаммов показало, что для всех штаммов является оптимальным показатель pH среды 6-8 (Табл. 14).

Табл. 14. Способность термотолерантных штаммов утилизировать дизельное топливо при различных значениях pH среды

	4		6		7		8		10	
	24°C	45°C								
1B			+	++**	+	+	+	++	+	
1D			+		+	+	+			
1G			+	++	+	++	+	+		
4D			++		+	±***	+			
5A			++	±	++	+	+			
6E			+	+	+	+	+		+	
12B					+	+	±			
Par2			++		++	±	++			
Par5			++		++	±	++	±		
Par6			+	±		+	+			
Par7			++		++	+	+		+	
Par10			+		+		+	±		
Par14			+		+		++		+	
Par18			+		+	+	+		+	

\* хороший рост, \*\* очень хороший рост, \*\*\* слабый рост, □ отсутствие роста

При pH 4 отмечали ингибирование роста у всех штаммов, при pH 10 наблюдали рост штаммов *G. amicalis* 1B, *Rhodococcus* sp. 6E, *Rhodococcus erythropolis* Par7, Par14 и

Par18 при температуре 24°C. Таким образом, штаммы 1В, 6Е, Par7, Par14 и Par18 были способны к росту в диапазоне рН 6-10.

3.5.2. Анализ способности бактерий утилизировать нефть при различных температурах в модельных системах и составление консорциумов термотолерантных бактерий

При первичном скрининге термотолерантных штаммов с целью отбора наиболее эффективных бактерии культивировали в жидкой минеральной среде с нефтью 14 суток при температурах 24°C и 45°C. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию нефти в среде культивирования и оценивали степень бактериальной деструкции нефти. Наиболее активно процесс деструкции нефти осуществлялся штаммами *Gordonia* sp. 1D (55% и 25% нефти при 24°C и 45°C соответственно), *R. pyridinivorans* L5A-BSU (19% и 27% нефти при 24°C и 45°C) и *Rhodococcus erythropolis* Par7 (24% и 20% нефти при 24°C и 45°C) за вычетом абиотической убыли. Абиотические потери нефти при 24°C и 45°C составили 6% и 11%, соответственно (Рис. 13).

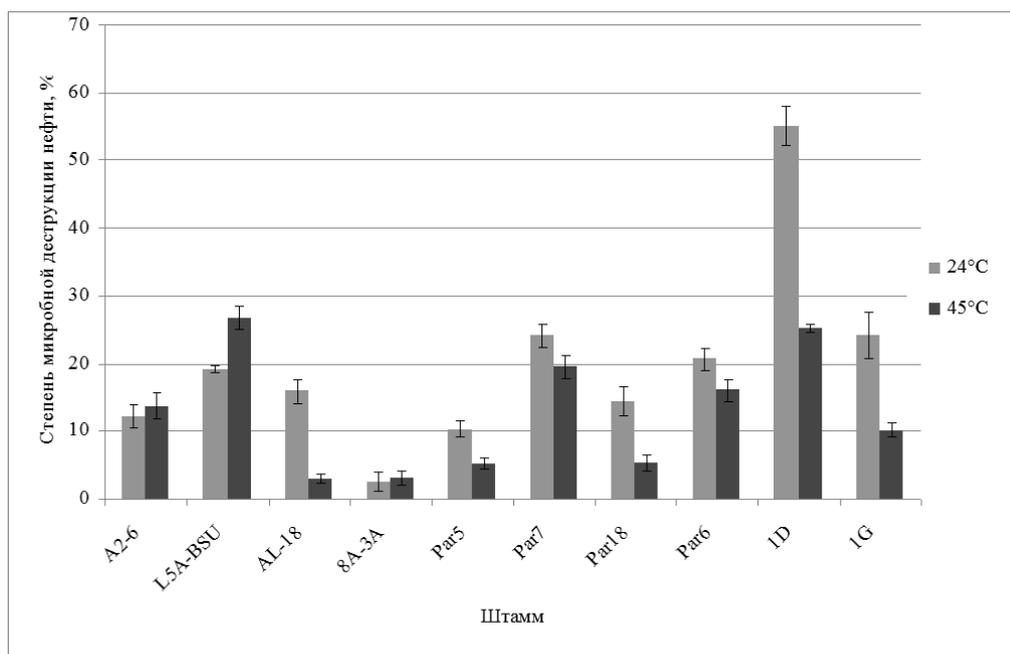


Рис. 13. Степень деструкции нефти термотолерантными бактериями в жидкой минеральной среде за 14 суток. Штаммы: Par2 – *Rhodococcus erythropolis*, Par5 – *Rhodococcus* sp., Par6 – *R. erythropolis*, Par7 – *Rhodococcus* sp., 1D – *Gordonia* sp., 1G – *Gordonia* sp., A2-6 – *Deinococcus* sp., L5A-BSU – *R. pyridinivorans*, AL-18 – *R. pyridinivorans*, 8A-3A – *Rhodococcus* sp. Абиотические потери нефти составили 6% и 11% при 24°C и 45°C, соответственно.

Таким образом, по результатам измерения степени микробной деструкции нефти были отобраны штаммы – эффективные термотолерантные деструкторы нефти: *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Deinococcus* sp. A2-6, *Gordonia* sp. 1G, *Rhodococcus* sp. Par6. Была проверена способность этих штаммов к росту и утилизации нефти при концентрациях нефти в среде культивирования до 20%. Для этого бактерии культивировали в жидкой среде Эванса с нефтью (5-20%) и по окончании культивирования визуально оценивали рост бактерий (Табл. 15).

Табл. 15. Способность бактерий к росту в присутствии различных концентраций нефти в среде культивирования (5-20%)

Штаммы	Концентрация нефти							
	5%		10%		15%		20%	
	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C
<i>Gordonia</i> sp. 1D	+*	+	+	+	+	± <sup>**</sup>	±	±
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	+	+	+	+	±			
<i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU	+	+	+	+	±			
<i>Deinococcus</i> sp. A2-6	+	+	+	+	+	±	±	±
<i>Gordonia</i> sp. 1G	+	+	+	+	+	±		
<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	+	+	+	+	±			

\* хороший рост, \*\* слабый рост, □ отсутствие роста

Показано, что большинство бактерий сохраняют способность к росту в среде с нефтью в концентрации до 15%. При 20% нефти слабый рост наблюдали у штаммов *Gordonia* sp. 1D и *Deinococcus* sp. A2-6. Тем не менее, существенное ингибирование роста бактерий высокими концентрациями нефти позволяет заключить, что разрабатываемый консорциум термотолерантных штаммов будет эффективен в присутствии нефти в среде до 10%, однако частичная жизнеспособность штаммов сохраняется при концентрации нефти 15%. Из отобранных 6 штаммов было составлено 4 различных бактериальных консорциума (Табл. 16).

Таблица 16. Варианты консорциумов на основе термотолерантных бактерий

Консорциум А	Консорциум Б	Консорциум В	Консорциум Г
<i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	<i>Rhodococcus</i> <i>erythropolis</i> Par7	<i>Deinococcus</i> sp. A2- 6

<i>Gordonia</i> sp. 1G	<i>Deinococcus</i> sp. A2-	<i>R. pyridinivorans</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Gordonia</i> sp.1D	6	L5A-BSU	<i>erythropolis</i> Par7
	<i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Gordonia</i> sp.1D

При составлении консорциумов учитывали физиологические особенности штаммов, в частности, спектры окисляемых бактериями субстратов. Консорциумы составляли таким образом, чтобы в их составе присутствовали деструкторы как алканов, так и ароматических соединений. Так, например, в состав консорциума В входят штаммы *Gordonia* sp. 1D и *Rhodococcus erythropolis* Par7, не способные окислять ПАУ, но утилизирующие широкий спектр линейных алканов (Таблица 8), а также штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU, деструктор полиароматических соединений. Подобранные таким образом консорциумы способны утилизировать максимально широкий спектр компонентов нефти, а составляющие их бактерии не конкурируют за доступные субстраты.

Для изучения процесса деструкции нефти составленными консорциумами и сравнения их эффективности консорциумы бактерий культивировали в жидкой минеральной среде с 2% нефти и 3% соли в течение 14 суток. Деградационную активность консорциумов нефтеокисляющих микроорганизмов оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому методом ИК-спектроскопии. Абиотические потери нефти в эксперименте составили 5% и 12% соответственно при 24°C и 45°C. Наибольшую степень деструкции нефти наблюдали в системе с консорциумом В (Рис. 14).

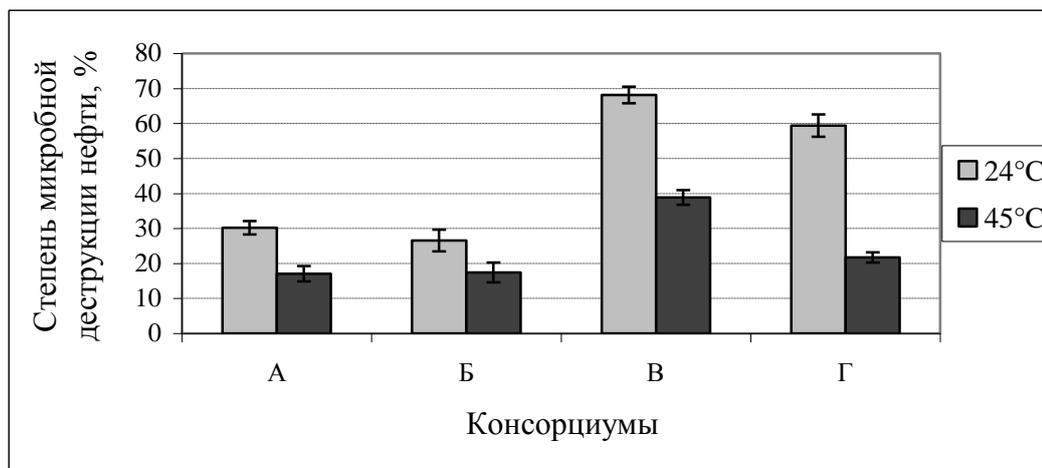


Рис. 14. Степень деструкции нефти консорциумами термотолерантных бактерий в жидкой минеральной среде за 14 суток при 24°C и 45°C. Консорциумы А, Б, В, Г обозначены в соответствии с табл. 15.

Консорциум В утилизировал 69% нефти при 24°C и 40% нефти при 45°C. Консорциум Г (*Deinococcus* sp. A2-6, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *Gordonia* sp.1D) при 24°C утилизировал незначительно меньшее количество нефти (59%) по сравнению с консорциумом В. Однако при 45°C наблюдали менее эффективную деградацию (21%).

Консорциум В утилизировал нефти больше, чем каждый из входящих в него штаммов отдельно (Рис. 13). Так, при повышенной (45°C) температуре степень деструкции нефти монокультурой штамма 1D составила 25%, L5A-BSU – 27%, Par7 – 20%.

Таким образом, наиболее эффективным сочетанием микроорганизмов для консорциума как основы биопрепарата термотолерантных нефтедеструкторов являлся вариант В (*Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *Gordonia* sp. 1D).

3.5.2.1. Проверка эффективности консорциума термотолерантных штаммов в модельных системах с нефтезагрязненным грунтом

Для проверки эффективности индивидуальных штаммов и консорциума в грунте в условиях жаркого климата были смоделированы песчаные системы со следующими условиями: нефти – 2%, морской соли – 3%, влажности – 10%. Инокулят вносили до конечной концентрации  $10^4$  КОЕ/г грунта. Эксперимент проводили в течение 21 суток как при 24°C, так и при 45°C. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию углеводородов в образцах и оценивали абиотическую убыль в системах без микроорганизмов методом ИК-спектроскопии.

Абиотическая убыль нефти через 21 сутки при температурах 24°C и 45°C составила 20% и 33%, соответственно. В процессе деструкции нефти в грунте консорциумом было утилизировано 70 и 59% нефти (при температурах 24°C и 45°C соответственно) при исходной концентрации нефти 2%, солености 3% и влажности 10% за 21 сутки (Рис. 15).

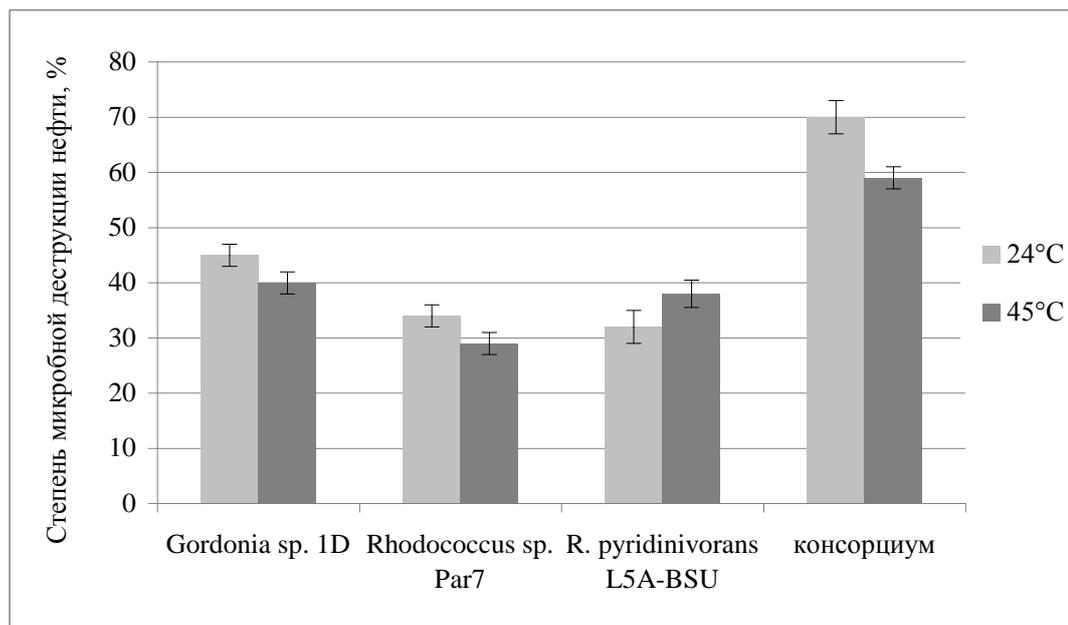


Рис. 15. Степень деструкции нефти штаммами 1D, Par7, L5A-BSU и консорциумом трех штаммов в грунте с 2% нефти, 3% соли и влажностью 10% при 24°C и 45°C. Время эксперимента – 21 сутки.

Эффективность утилизации нефти в грунте индивидуальными штаммами, входящими в состав консорциума, при 24°C и 45°C составила: *Gordonia sp.* 1D – 51% и 40% нефти, *R. pyridinivorans* L5A-BSU – 37% и 44% нефти, *R. erythropolis* Par7 – 32% и 30% нефти. Таким образом, использование этих штаммов совместно в составе консорциума значительно повышает эффективность деструкции нефти как в жидкой минеральной среде, так и в грунте.

3.5.2.2. Изучение динамики численности термотолерантных штаммов в консорциуме при 24°C и 45°C в жидкой минеральной среде с нефтью и проверка стабильности консорциума

Динамику численности микроорганизмов консорциума изучали как при умеренной (24°C), так и при повышенной (45°C) температурах в жидкой минеральной среде с 2% нефти и 3% соли в течение 25 суток. Посевная доза каждого штамма в обоих случаях составляла  $10^5$  КОЕ/мл.

Помутнение среды и частичное диспергирование нефти микроорганизмами консорциума при 24°C отмечали уже на вторые сутки культивирования. К концу эксперимента остаточная нефть была полностью диспергирована в раствор.

Штаммы, внесенные в систему в одинаковой исходной концентрации, демонстрировали различные скорости роста в смешанной культуре (Рис. 16 А, Б). Так, при 24°C у штамма L5A-BSU экспоненциальная фаза начиналась через 80 часов, а у Par7 –

через 120 часов роста. Логарифмический рост родококков прекращался почти одновременно, между 200 и 240 часами культивирования, после чего в ходе эксперимента наблюдали периоды стабилизации численности, падения и вторичного роста (Рис. 16 А).

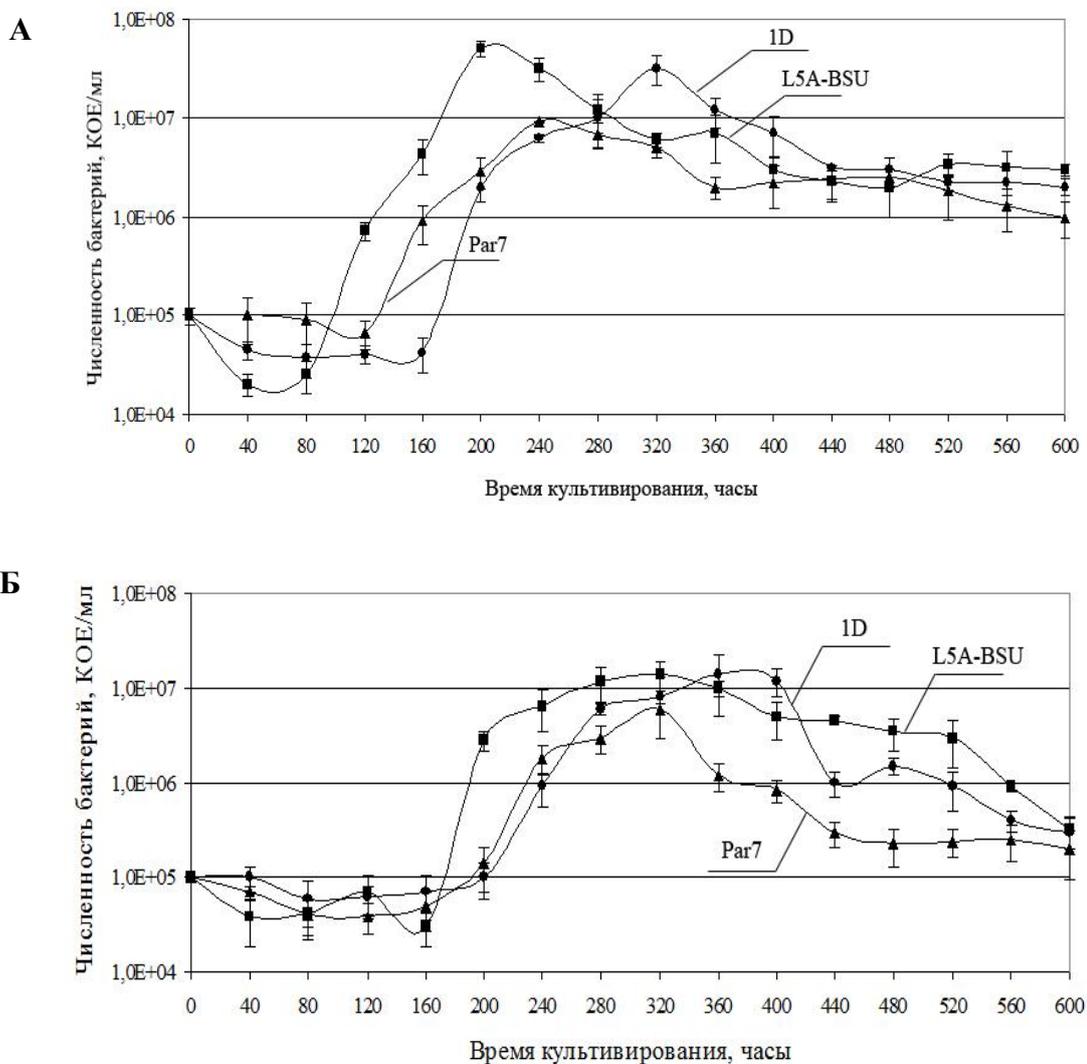


Рис. 16. Кривые роста штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 и *R. pyridinivorans* L5A-BSU в смешанной культуре при температуре А) 24°C, Б) 45°C.

Ростовые характеристики культуры штамма *Gordonia* sp. 1D отличались от характеристик культур родококков. Штамм демонстрировал долгий период лаг-фазы (160 часов), когда его численность, снизившаяся относительно исходной на полпорядка, не изменялась. Затем штамм 1D переходил в фазу активного роста, которая заканчивалась к 280 часам роста. Тем не менее, численность штамма продолжала расти, окончательную стабилизацию наблюдали еще через 40 часов. После этого штамм *Gordonia* sp. 1D, как и остальные штаммы консорциума, демонстрировал непродолжительные периоды падения и стабилизации количества жизнеспособных клеток. При 24°C на момент окончания фазы

логарифмического роста штаммы достигали численности: *Gordonia* sp. 1D –  $3.2 \times 10^7$ , *R. pyridinivorans* L5A-BSU –  $5.2 \times 10^7$ , *R. erythropolis* Par7 –  $1 \times 10^7$ .

На момент окончания эксперимента при 24°C численность штаммов в консорциуме была примерно одинаковой и составляла  $3 \times 10^6$  КОЕ/мл для штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU,  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл для штамма *R. erythropolis* Par7 и  $2 \times 10^6$  КОЕ/мл для штамма *Gordonia* sp. 1D (Рис. 16 А). Таким образом, консорциум, составленный из трех штаммов термотолерантных бактерий, стабилен на протяжении как минимум 25 суток. Штаммы не проявляли взаимного антагонизма, периоды их развития в смешанной культуре почти не отличались от периодов развития в индивидуальной культуре.

Картина развития смешанной культуры трех штаммов при 45°C отличалась от результатов, полученных для 24°C. При повышенной температуре для родококков характерна более долгая лаг-фаза (около 160 часов). Что касается гординии, то время ее перехода в фазу экспоненциального роста не изменилось (Рис. 16 Б). По окончании экспоненциальной фазы штаммы Par7, 1D и L5A-BSU достигали численности соответственно  $0.6 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^7$ ,  $1.3 \times 10^7$  КОЕ/мл относительно начальной концентрации  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл, после чего в системе наблюдали стабилизацию численности родококков с последующим медленным снижением количества жизнеспособных клеток. У штамма *Gordonia* sp. 1D отмечали резкое падение численности между 400 и 440 часами, после чего также происходила стабилизация. На 25 сутки роста численность штаммов консорциума составляла  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3.2 \times 10^5$  КОЕ/мл для штаммов Par7, 1D и L5A-BSU, соответственно (Рис. 16 Б). Таким образом, из полученных данных можно заключить, что, несмотря на колебания в процессе роста смешанной культуры, численность клеток в определенный момент времени стабилизируется, а все штаммы консорциума сосуществуют, не подавляя друг друга.

3.5.2.3. Анализ и сравнение фракционного состава остаточной нефти в модельных системах относительно ее исходного состава, в результате культивирования отобранных термотолерантных бактерий в жидкой минеральной среде с нефтью при температурах 24°C и 45°C.

Для оценки эффективности деградации различных фракций нефти отобранными термотолерантными бактериями был поставлен модельный эксперимент (его схема представлена в табл. 17) по культивированию штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 и *R. pyridinivorans* L5A-BSU жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода при температурах 24°C и 45°C. Анализ остаточного содержания нефти и эффективности микробной деградации проводили через

14 суток эксперимента методом жидкостно-адсорбционной хроматографии с использованием микроколонок, заполненных силикагелем.

Таблица 17. Модельные системы – схема эксперимента

Номер системы	Описание модельной системы
1	Среда Эванса + нефть + <i>Gordonia</i> sp. 1D
2	Среда Эванса + нефть + <i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU
3	Среда Эванса + нефть + <i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7
4	Среда Эванса + нефть без микроорганизмов (контроль)

Результаты фракционного анализа состава нефти в контроле без микроорганизмов и в модельных системах после культивирования нефтеокисляющих штаммов при температурах 24°C и 45°C приведены в табл. 18 и 19.

Таблица 18. Фракционный состав углеводородов нефти через 14 суток эксперимента в условиях культивирования при 24°C

№ Системы (согласно табл. 1 б)	Остаточное содержание, %			Убыль углеводородов относительно контроля, %		
	Фракция 1 – Гексановая (Алканы)	Фракция 2 – Бензольная (Полиароматические углеводороды и нафтены)	Фракция 3 – Спирто-бензольная (Смолисто-асфальтеновые вещества)	Фракция 1 – Гексановая (Алканы)	Фракция 2 – Бензольная (Полиароматические углеводороды и нафтены)	Фракция 3 – Спирто-бензольная (Смолисто-асфальтеновые вещества)
1	29.34	65,14	18,27	41.20	8.11	31.81
2	43.02	54.34	20.14	12.02	23.34	24.81
3	39.94	68,01	23.01	18.95	4.06	14.10
4	48.90	70.89	26.79	0	0	0

Как видно из данных табл. 18, штаммы *Gordonia* sp. 1D и *R. erythropolis* Par7 деградировали углеводороды гексановой и спирто-бензольной фракций нефти при 24°C. В

этих же условиях штамм *Rhodococcus pyridinivorans* L5A-BSU утилизировал компоненты бензольной и спирто-бензольной фракций.

Таблица 19. Фракционный состав углеводородов нефти через 14 суток эксперимента в условиях культивирования при 45°C

№ Системы (согласно табл.5)	Остаточное содержание, %			Убыль углеводородов относительно контроля, %		
	Фракция 1 – Гексановая (Алканы)	Фракция 2 – Бензольная (Полиароматические углеводороды и нафтены)	Фракция 3 – Спирто-бензольная (Смолисто-асфальтеновые вещества)	Фракция 1 – Гексановая (Алканы)	Фракция 2 – Бензольная (Полиароматические углеводороды и нафтены)	Фракция 3 – Спирто-бензольная (Смолисто-асфальтеновые вещества)
1	14.98	90.27	21.11	65.12	5.81	38.30
2	36.71	64.23	25.14	11.05	33.01	27.71
3	35.03	89.21	29,05	18,14	6.90	16,53
4	42.80	95.83	34,78	0	0	0

При 45°C штамм *Gordonia* sp. 1D также являлся наиболее эффективным деструктором углеводородов гексановой и бензольной фракций (Табл. 19), к тому же степень деградации штаммом алканов (65.12%) и смолисто-асфальтеновых соединений (38.30%) превышала аналогичные данные для 24°C (41.20% и 31.81% соответственно) (Табл. 18).

Штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU при 45°C более активно, чем при 24°C, осуществлял деструкцию полиароматических соединений (33.01% и 23.34% соответственно). Картина деструкции углеводородов штаммом *Rhodococcus erythropolis* Par7 при повышении температуры не менялась, он примерно одинаково утилизировал алканы и смолисто-асфальтеновые вещества в обоих температурных режимах.

Таким образом, можно заключить, что исследуемые термотолерантные бактерии родов *Gordonia* и *Rhodococcus* с повышением температуры не теряют своей деструкционной активности, а степень деградации отдельных фракций нефти штаммами 1D и L5A-BSU даже частично увеличивалась.

### 3.6. Генетические особенности термотолерантных актиномицетов

#### 3.6.1. Определение локализации генов деструкции алканов у штаммов *Gordonia* sp. 1D и *Rhodococcus erythropolis* Paг7 и генов деструкции ПАУ у штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU

Методом ПЦР-анализа было установлено, что штамм *Gordonia* sp. 1D содержит гены двух алкан гидроксилаз, отличающихся спектрами окисляемых субстратов. Так, субстратами гидроксилазы *alkB* в основном являются линейные алканы длиной C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> (Nie et al., 2014), а субстратами гидроксилазы CYP – короткие алканы длиной от C<sub>6</sub>. У выделенных в данной работе термотолерантных штаммов *Gordonia* отмечали способность к росту на октане и слабый рост на гептане, также была проверена и отмечена способность к росту на алканах длиной C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>, что позволяет предположить у штаммов активность обеих гидроксилазных систем.

Ранее было показано, что, в отличие от системы *alk*, гены системы CYP обычно располагаются на плазмидах или мобильных генетических элементах в составе хромосомы (Nie et al., 2013). Для проверки этого предположения у термотолерантного штамма *Gordonia* sp. 1D был проведен анализ методом пульс-электрофореза в агарозном геле, направленный на поиск и визуализацию возможных плазмид. На электрофореграмме ДНК штамма 1D плазмид обнаружено не было, возможно, штамм не содержит плазмид. Таким образом, гены, кодирующие алкан гидроксилазную систему CYP штамма 1D, располагаются на хромосоме, как и гены гидроксилазы *alkB*.

Штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU содержит гены деструкции нафталина *nar*, характерные для родококков. Путем реакции ДНК штамма со специфическими праймерами (таблица 3 раздела «Материалы и методы») были получены ампликоны фрагментов генов *narAa*, *narAb* и *narB*. Стабильность этих генов в штамме L5A-BSU была проверена: был получен *nar*<sup>-</sup> элиминант путем последовательных пересевов на неселективную среду. При амплификации генов *nar* у элиминанта продуктов получено не было. Таким образом, признак деструкции нафталина у штамма L5A-BSU является нестабильным, а соответствующие гены легко теряются в неселективных условиях.

Методом пульс-электрофореза ДНК штамма L5A-BSU в агарозном геле плазмид обнаружено не было. Таким образом, гены деструкции нафталина *nar*, вероятно, располагаются в составе МГЭ, предположительно, транспозоноподобной структуры. Этим объясняется их нестабильность и быстрая элиминация в неселективных условиях. Тем не менее, *nar*<sup>-</sup> элиминант сохраняет способность утилизировать алканы, гены деструкции алканов в штамме значительно более стабильны, чем гены деструкции нафталина.

В отличие от гордони 1D, обладающей двумя системами деструкции алканов, но не имеющей генов деструкции нафталина, штамм L5A-BSU способен утилизировать как ПАУ, так и алканы. Ранее о такой способности родококков сообщалось, например, в работе Андреони с соавт. (Andreoni et al., 2000), где у штамма *Rhodococcus* sp. 1BN также отмечали одновременное присутствие генов катаболизма нафталина, алканов (в том числе длинноцепочечных до C<sub>25</sub>), а также толуола и бензола. Что касается вида *R. pyridinivorans*, то ферменты деструкции алканов у представителей этого вида ранее были обнаружены (например, у штамма AK37 в работе Кришта с соавт. (Kriszt et al., 2012)), однако об одновременной способности утилизировать алканы и ПАУ нет данных.

Гены деструкции нафталина штамма L5A-BSU были секвенированы, полученные нуклеотидные последовательности проанализированы. Выявлено, что гены *narAa*, *narAb* и *narB* штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU, имеют высокий уровень сходства с генами *nar* *Rhodococcus opacus* (Рис. 17 А, Б). Наибольшее сходство последовательности фрагмента гена *narAb* малой субъединицы нафталин диоксигеназы отмечали с последовательностью гена *narAb*, входящего в состав плазмиды *R. opacus* B4 (92.2%). У гена *narB* штамма L5A-BSU отмечено сходство с последовательностью, принадлежащей *R. opacus* PD630. Таким образом, учитывая сходство последовательностей и нестабильность генов *nar* у штамма L5A-BSU, сделано предположение, что транспозоноподобная структура, в составе которой находятся эти гены, приобретена штаммом извне, предположительно в ходе переноса от *Rhodococcus opacus*.

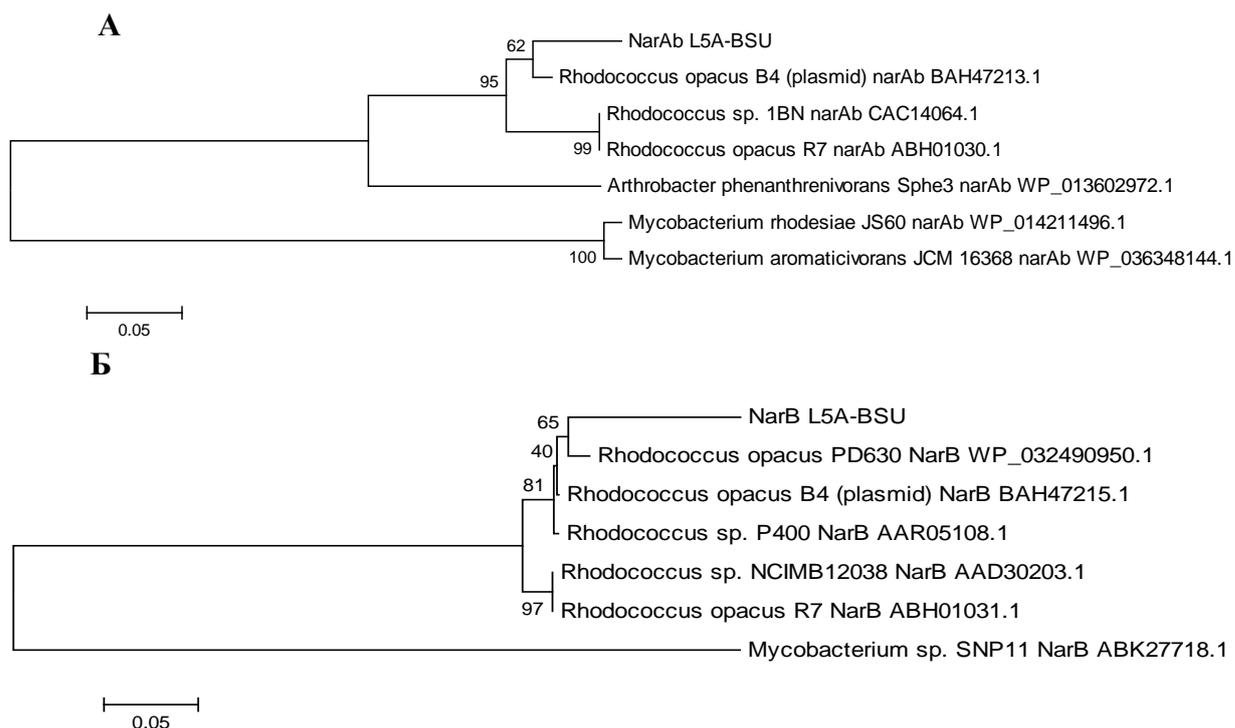


Рис. 17. Филогенетический анализ фрагментов генов *narAb* (А) и *narB* (Б) штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU, основанный на соответствующих аминокислотных последовательностях. Штаммы даны с номерами в GenBank.

Была проверена способность генов деструкции нафталина штамма L5A-BSU переноситься в другие микроорганизмы. Проверку выполняли путем скрещивания *R. pyridinivorans* L5A-BSU с реципиентом – Rif<sup>R</sup>Sm<sup>R</sup> мутантом штамма *R. erythropolis* Par7, не способным утилизировать нафталин. В ходе скрещивания были получены рекомбинанты – *R. erythropolis* Par7 Rif<sup>R</sup>Sm<sup>R</sup>Nah<sup>+</sup>. Методом ПЦР с праймерами M13 и ERIC было подтверждено, что получены именно рекомбинанты штамма Par7, а не спонтанные мутанты L5A-BSU (Рис. 18 А, Б).

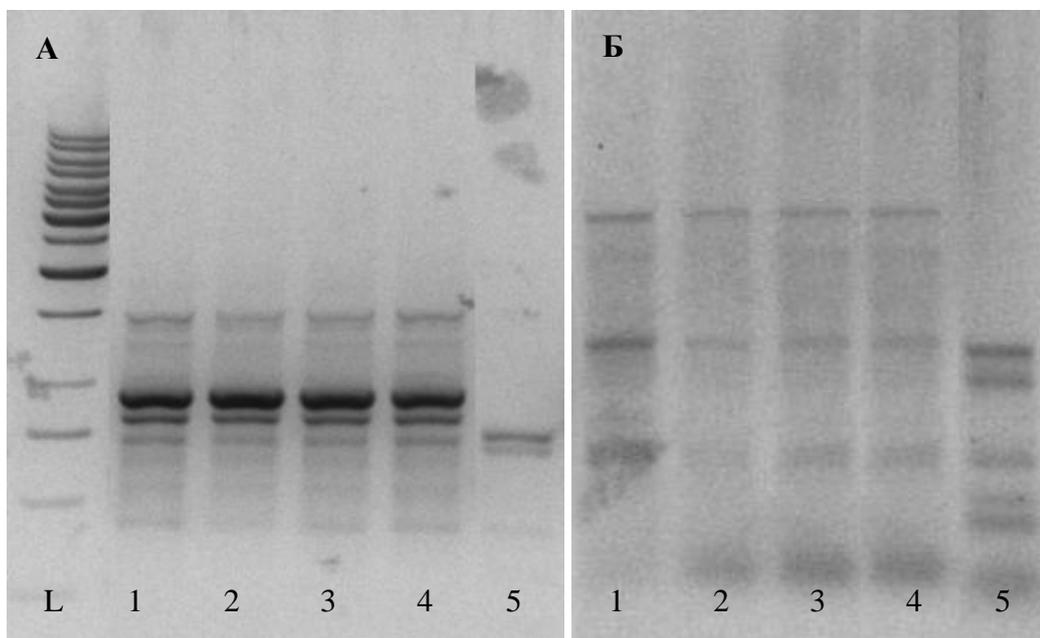


Рис. 18. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймером А) М13, Б) ERIC. 1 – *R. erythropolis* Par7, 2, 3, 4 – *R. erythropolis* Par7 Rif<sup>R</sup>Sm<sup>R</sup>Nah<sup>+</sup>, 5 – *R. pyridinivorans* L5A-BSU, L – маркер.

Таким образом, мы показали, что гены деструкции нафталина *nar* в составе МГЭ из штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU могут перемещаться в родственные штаммы, распространяя признак деструкции нафталина.

Штамм *Rhodococcus erythropolis* Par7 содержит гены единственной гидроксилазной системы *alkB*, характерной для родококков (Рис. 10 А). Гены стабильны и располагаются, по-видимому, в хромосоме штамма.

Таким образом, составленный нами консорциум термотолерантных бактерий представлен штаммами, в геномах которых находятся гены деструкции алканов и ПАУ. Гены располагаются в хромосомах штаммов и стабильны даже в неселективных условиях,

за исключением генов *nar* штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU. Штаммы не теряют углеводородокисляющей активности при температурах до 50°C, следовательно, их генетические системы продолжают экспрессироваться даже в таких условиях. При попадании консорциума в нефтезагрязненный грунт присутствие загрязнителя как селективирующего фактора будет обеспечивать стабильность признака деструкции нафталина в штамме *R. pyridinivorans* L5A-BSU, кроме того, учитывая известную метаболическую гибкость актиномицетов, можно предполагать вероятность горизонтального переноса углеводородокисляющих элементов из штаммов консорциума в аборигенные микроорганизмы.

### 3.7. Депонирование штаммов, подготовка заявки на патент РФ

#### 3.7.1. Депонирование культур термотолерантных актиномицетов

Три штамма термотолерантных актиномицетов, входящих в состав разработанного консорциума, были подготовлены для депонирования во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Были составлены паспорта культур, включающие сведения о месте выделения штамма, его таксономическом положении, морфологических признаках, окраске по Граму, спектре окисляемых субстратов. Штаммы консорциума были депонированы в ВКМ и получили следующие обозначения: *Gordonia* sp. 1D – ВКМ Ac2720D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 – ВКМ Ac2722D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU - ВКМ Ac2721D. Свидетельства о депонировании прилагаются (Приложение 1).

#### 3.7.2. Патентование консорциума термотолерантных актиномицетов для очистки грунтов и вод от нефти в условиях жаркого климата

Подана заявка на патент РФ №2015143402 «Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата». Приоритет от 13.10.2015. Уведомление о поступлении заявки прилагается (Приложение 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нефть является одним из основных источников энергии в современном мире. Развитая добыча нефти в регионах, где располагаются крупные месторождения, приводит к росту уровня антропогенного загрязнения почв и вод. Помимо антропогенного фактора, следует учитывать естественное загрязнение окружающей среды путем проникновения нефти через трещины и разломы в земной коре. Углеводороды нефти и их производные оказывают токсическое воздействие на экосистемы на уровне как микро-, так и макроорганизмов.

В связи с высоким уровнем загрязнения нефтью как регионов непосредственной добычи, так и территорий, связанных с нефтедобывающей промышленностью только косвенно, всё большее внимание уделяется очистке грунтов и вод от углеводородов нефти. Внесение микроорганизмов-деструкторов нефти в составе биопрепаратов в места загрязнения является эффективным способом удаления остаточной (<10%) нефти.

На эффективность биологической очистки загрязненного участка влияет ряд физико-химических показателей, определяющих состояние территории. Температура является одним из ключевых факторов, влияющих на протекание метаболических процессов микроорганизмов и, следовательно, на ход и скорость утилизации органических загрязнителей. Значительная часть месторождений нефти, в том числе на территориях России и стран СНГ, находится в регионах с жарким климатом, обычно полупустынь. Для эффективной очистки загрязненных нефтью грунтов и вод в таких условиях микроорганизмы-деструкторы, входящие в состав препарата, должны обладать способностью осуществлять метаболические процессы при температурах выше 40°C.

Тем не менее, высокие температуры окружающей среды в дневное время суток являются не единственной особенностью климата полупустынь. Для таких регионов характерны также резкие перепады температуры, в результате которых разница между днем и ночью может составлять до 30°C. Этот аспект также необходимо учитывать при разработке микробного препарата для деструкции нефти в таких условиях. Препарат не должен терять эффективности ни при высоких (около 50°C) температурах днем, ни при умеренных – ночью. Это не позволяет использовать при составлении препарата термофильные штаммы, для которых оптимальными являются температуры окружающей среды 50-60°C: нижняя граница их рабочего диапазона обычно находится в районе 35-40°C, что, таким образом, значительно снизит эффективность препарата вплоть до прекращения его действия в ночное время суток.

В условиях жаркого засушливого климата с резкими суточными перепадами температур наиболее подходящими агентами ремедиации являются термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы. Группа термотолерантных микроорганизмов как объект исследования не выделяется четко: одни авторы указывают узкий температурный диапазон, характерный для роста таких культур – максимальная температура роста 45-48°C (Логинова, Позмогова, 1974), другие (Гусев, Минаева, 2003) полагают, что термотолерантные виды растут в пределах от 10°C до 55-60°C. Максимальная температура роста 55-60°C представляется завышенной, мы полагаем, что термотолерантные виды близки мезофильным и основное их отличие от мезофилов – способность расти при повышенных температурах, хотя оптимальные температуры роста для обеих групп находятся на одном уровне (Гусев, Минаева, 2003).

В ходе исследования бактерий-нефтедеструкторов в данной работе автором были сформулированы характеристики термотолерантных бактерий, позволяющие выделить их как промежуточную группу в температурной классификации микроорганизмов, и определены основные отличия термотолерантных культур от мезофильных. Путем исследования зависимости удельной скорости роста от температуры было выявлено, что оптимальный рост термотолерантных бактерий осуществляется при температурах 35-37°C (Рис. 5-Б). Полученные значения верхней (53°C) и нижней (18°C) границ рабочего температурного диапазона показывают, что в условиях нефтезагрязненных полупустынь с резкими суточными перепадами температур термотолерантные бактерии являются наиболее перспективными агентами ремедиации: процесс деструкции, осуществляемый такими бактериями, будет протекать как при повышенных, так и при умеренных температурах.

Термотолерантные бактерии выделяли из образцов грунта и воды, отобранных в регионах с различными климатическими условиями. Такие штаммы были выделены не только из образцов, отобранных в Казахстане, но также из проб шламонакопителя в Москве и почвы с берегов озера Байкал. Присутствие термотолерантных бактерий на участках, расположенных в умеренном климате, неудивительно, поскольку при умеренных температурах они способны расти и эффективно утилизировать углеводороды. Идентификация термотолерантных бактерий путем использования различных филогенетических маркеров, а также с помощью субстратов-маркеров показала, что большинство выделенных бактерий относятся к нокардиоподобным актиномицетам, помимо этого выделены также представители родов *Paenibacillus* sp. и *Deinococcus* sp. (п. 3.2 Результаты).

Таким образом, в данной работе сформулированы характеристики термотолерантных нефтеокисляющих бактерий как промежуточной группы в температурной классификации бактерий-нефтедеструкторов. Показано, что представителями термотолерантной группы могут быть бактерии, принадлежащие к родам и видам, ранее классифицированным как мезофильные. Так, в работе впервые выделены представители *Gordonia amicalis* и *Rhodococcus erythropolis*, способные утилизировать нефть при температурах до 50°C.

Для эффективного использования термотолерантных бактерий как компонентов потенциального микробного препарата при деструкции нефти в жарком климате необходимо понимание особенностей физиологических процессов, протекающих в микробных клетках при культивировании их в различных условиях (диапазон температур, содержание соли, концентрация нефти как загрязнителя). В данной работе мы проанализировали генетические особенности термотолерантных микроорганизмов, их рост и продукцию внеклеточных ПАВ в различных смоделированных условиях, а также развитие смешанных культур термотолерантных микроорганизмов и эффективность деструкции нефти консорциумами в водных и грунтовых системах.

#### 4.1. Фенотипические и генетические особенности термотолерантных нефтеокисляющих бактерий

Микробные препараты, вносимые на загрязненные территории и акватории с целью их очистки, могут содержать в качестве основы как монокультуры, так и сочетания микроорганизмов. Использование монокультур целесообразно в том случае, если загрязнителем является индивидуальное вещество (Ghaly et al., 2013). Однако в случае загрязнителей, представленных сложными смесями (нефть, дизельное топливо) неоднократно подтверждалось преимущество консорциумов перед препаратами-монокультурами (Al-Wasify & Named, 2014; Alkhatib et al., 2011; Guizhou et al., 2013).

Одной из задач данной работы являлось составление эффективного консорциума термотолерантных бактерий для деструкции нефти в условиях жаркого климата. Такая разработка перспективна в качестве основы биопрепарата, направленного на решение проблемы нефтяного загрязнения в условиях полупустынь, например, в Казахстане и южных регионах России. При составлении консорциумов, эффективность деструкции нефти которыми гарантированно бы превышала результаты, полученные для монокультур штаммов, необходимо учитывать фенотипические особенности бактерий, в частности, их способность утилизировать различные углеводородные субстраты. Микроорганизмы, существенно отличающиеся спектрами окисляемых субстратов, при использовании в

составе консорциума в биопрепарате не конкурируют за доступные источники углерода. Таким образом, не происходит взаимного подавления активности бактерий, понижающего общую эффективность препарата. В ходе работы для составления эффективного консорциума бактерий-деструкторов углеводородов различной химической структуры были проанализированы спектры утилизируемых бактериями субстратов (Таблица 8).

Штаммы *Gordonia* обладают не меньшей метаболической гибкостью, чем представители родококков – распространенных деструкторов различных поллютантов. Согласно известным из литературы сведениям, гордонии могут утилизировать как алканы (Shen et al., 2010; Lo Piccolo et al., 2011), так и полиароматические соединения, в частности, нафталин (Lin et al., 2012). Как известно, в родококках могут совместно присутствовать гены деструкции алканов и ПАУ (Andreoni et al., 2000; Zampolli et al., 2014; Yang et al., 2014), однако в отношении гордоний такой информации нет. В подтверждение этого, термотолерантные гордонии, выделенные в данной работе, утилизируют широкий спектр алканов (C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub>), однако характеризуются полной неспособностью утилизировать ПАУ. Тем не менее, наблюдаемая интенсивная деструкция алканов гордониями, особенно штаммом *Gordonia* sp. 1D, делает их перспективными объектами для дальнейшего исследования в качестве возможных компонентов консорциума.

#### 4.1.1. Особенности деструкции алканов термотолерантными гордониями

Известно, что короткие алканы (короче C<sub>9</sub>) недоступны для утилизации большинством микроорганизмов, так как оказывают токсичное влияние на клеточные мембраны (Fritsche, Hofrichter, 2008; Vasylychenko et al., 2012). Однако при разливе нефти контакт микроорганизмов с короткими алканами длится обычно не более суток, а при повышенной температуре – несколько часов по причине быстрого испарения этих соединений (Atlas, 1994). Тем не менее, в случае проведения ремедиационных мероприятий *in situ*, например, непосредственно на территории месторождения контакт применяемого препарата с нефтью и короткими алканами в ее составе может быть неоднократным. Использование в составе препарата культур, устойчивых к токсическому действию коротких алканов и способных утилизировать эти соединения в качестве субстратов, позволяет минимизировать вероятность инактивации уже внесенного в грунт препарата при новом загрязнении.

Обнаружение в бактериальных клетках фермента деструкции коротких алканов – гемовой алкан гидроксилазы цитохромового семейства CYP153 (Maier et al., 2001) доказывает, что такие соединения могут быть использованы в качестве субстратов без

вреда для клетки. Несмотря на то, что впервые гидроксилаза CYP была обнаружена у грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* sp.), наибольшее распространение этот фермент получил у актиномицетов (Nie et al., 2013; Alonso-Gutierrez et al., 2011; van Beilen et al., 2006; Amouric et al., 2010; Nicolau et al., 2009). Таким образом, именно актиномицеты являются наиболее эффективными деструкторами коротких алканов и, вероятно, в целом более резистентны к их токсическому влиянию.

У термотолерантных гордоний были обнаружены гены, кодирующие ферменты двух различных алкан гидроксилаз – CYP153 и негемовой гидроксилазы FADS-семейства *alkB* (Рис. 8 А, Б). Отсутствие изменений в спектрах окисляемых штаммами алканов при повышении температуры позволяет предположить, что оба гидроксилазных фермента активны в клетках как при умеренной (24°C), так и при повышенной (45°C) температурах. Согласно литературным данным, минимальная и максимальная длина цепи алканов, окисляемых ферментами *AlkB* и CYP153, могут отличаться у различных родов микроорганизмов, однако, обобщая известные данные, можно заключить, что гидроксилаза CYP позволяет бактериям утилизировать алканы от C<sub>6</sub> (или C<sub>8</sub>) до C<sub>10</sub> (или C<sub>12</sub>) (van Beilen et al., 2006; Scheps et al., 2011; Nie et al., 2013; Bihari et al., 2010; Bihari et al., 2011), а гидроксилаза *AlkB* – алканы от C<sub>12</sub> до C<sub>20</sub>. Выделенные в данной работе бактерии окисляли алканы от C<sub>8</sub>, следовательно, они могут быть использованы для утилизации легких фракций нефти. Несмотря на быстрое испарение легких фракций из нефти на территориях с жарким климатом, способность бактерий, используемых в ходе ремедиационных мероприятий, утилизировать короткоцепочечные алканы позволяет снизить вероятность гибели клеток препарата при новом загрязнении нефтью.

Последовательности фрагментов генов *alkB* (520-550 п.н.) исследуемых нами гордоний были секвенированы и использованы в качестве филогенетических маркеров для идентификации штаммов. Было показано, что по последовательностям *alkB* гордонии 1В, 1D и 1G, выделенные из нефтезагрязненного грунта в Подмосковье, близки к *Gordonia amicalis*. Однако только штамм 1В может быть однозначно отнесен к этому виду, т.к. гомология его последовательности *alkB* с последовательностью *alkB* типового штамма *G. amicalis* составила 99.6%.

Ван Бейлен (van Beilen et al., 2003; van Beilen et al., 2007) полагает, что у большинства бактериальных штаммов гены алкан гидроксилаз расположены по всему геному, они могут располагаться на хромосомах, плаزمиде или транспозонах. Структура генного кластера *alkB* актиномицетов по сравнению с оперонами *alkB* псевдомонад (van Beilen et al., 1994; van Beilen et al., 2001; Dinamarca et al., 2003) упрощена, он содержит

меньшее количество компонентов. Гены гидроксилаз актиномицетов (негемовой alkB FADS-семейства и цитохромовой CYP153) могут с равной вероятностью располагаться как на плаزمиде, так и на хромосомах штаммов (Andria, 2015). Также известно, что гидроксилазы, расположенные на плазмиде, могут в составе этих плазмид перемещаться от грамотрицательных бактерий к грамположительным (Musovic et al., 2006; Andria, 2015). Ранее (Nie et al., 2014) было показано, что при сосуществовании двух ферментных систем, ответственных за окисление алканов, одна из них вероятнее всего будет располагаться на плазмиде, а другая – на хромосоме штамма.

Термотолерантные штаммы *Gordonia* sp. 1D и 1G, *G. amicalis* 1B были проверены на наличие возможных плазмид. Обнаружение у этих штаммов плазмид и локализация генов одного из гидроксилазных комплексов на плазмиде позволила бы изучать гидроксилазы гординий обособленно. Визуализацию возможных плазмид выполняли методом пульс-электрофореза, однако на электрофореграмме фрагментов, соответствующих плазмидной ДНК, не было обнаружено. Более того, путем множественных пересевов в неселективных условиях было проверено, что обе гидроксилазы стабильны. Это позволяет предполагать, что гены обеих гидроксилаз располагаются на хромосомах штаммов *Gordonia* 1B, 1D и 1G. Подобное расположение генов гидроксилазных ферментов необычно, т.к. ранее не сообщалось об одновременной хромосомной локализации двух гидроксилазных кластеров.

4.1.2. Термотолерантные штаммы *Rhodococcus* как эффективные деструкторы углеводов различной химической природы

Большинство нефтедеструкторов рода *Rhodococcus* являются мезофильными или психротолерантными бактериями (Sharma & Pant, 2001; Lee et al., 2006; Petrikov et al., 2013; Li et al., 2013; Paswa-Plóciniczak et al., 2016; Masy et al., 2016; Ветрова с соавт., 2013; Пирог с соавт., 2015; Maass et al., 2015). Среди грамположительных бактерий родококки являются одними из наиболее распространенных деструкторов углеводов, их неоднократно выделяли даже из грунтов и морской воды в регионах с жарким климатом (Abdelmohsen et al., 2014; Abdel-Megeed et al., 2011; Ali et al., 2016). Тем не менее, в большинстве таких работ культивирование бактерий ведется при температурах не выше 30°C, а о диапазонах температур выживания родококков нет данных, что не позволяет судить об их устойчивости к высоким температурам. О термотолерантных родококках известно мало. Сорхо с соавт. (Sorkhoh et al., 1990a; Sorkhoh et al., 1990b) выделили из почвы с нефтяного месторождения в Кувейте штаммы KUCC 8801 и KUCC 8802, в дальнейшем идентифицированные как *R. rhodochrous*. Оптимум температуры для роста

штаммов составлял 40°C, верхний предел выживаемости – 50°C. Также культуры являлись умеренно галотолерантными: они могли расти и утилизировать нефть при содержании соли в среде до 5%. Абу-Рувайда с соавт. (Abu-Ruwaida et al., 1990) выделили из почвы Кувейта штамм *Rhodococcus* sp., утилизирующий нефть и парафины и способный продуцировать биосурфактанты. Оптимальная температура роста штамма составляла 37°C. Однако больше о физиологии и метаболическом потенциале термотолерантных родококков не сообщалось.

В ходе выделения бактерий в данной работе были получены штаммы, идентифицированные как *Rhodococcus* (в том числе *R. erythropolis* и *R. pyridinivorans*) и способные утилизировать углеводороды нефти при температурах до 50°C. Один термотолерантных из штаммов, идентифицированных как *R. erythropolis* (штамм Par2), был выделен из воды подледного озера в Антарктиде. Несмотря на то, что в целом по характеристикам это менее эффективный деструктор нефти и отдельных алканов, чем штаммы, выделенные в Казахстане и Беларуси, о выделении термотолерантных родококков из воды антарктических озер также ранее не сообщалось.

Родококки, исследуемые в данной работе, были способны утилизировать нефть, дизельное топливо, а также ряд линейных алканов с длиной скелета от C<sub>10</sub>. Анализ последовательностей генов алкан гидроксилаз штаммов показал, что термотолерантные родококки содержат гены единственной гидроксилазы – фермента семейства *alkB*.

О сосуществовании алкан гидроксилаз двух типов у родококков также сообщалось ранее (Amouric et al., 2010). Однако исследуемые в данной работе штаммы родококков содержали гены только гидроксилазы *alkB* (Рис. 10) и не росли на алканах короче C<sub>10</sub>. Тем не менее, несмотря на ограниченное количество окисляемых соединений (большой частью линейные алканы C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>), это первый случай деструкции алканов штаммами *Rhodococcus erythropolis*, наблюдаемой при температуре 45°C.

Основной особенностью штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU, с которой связана перспектива его использования в составе препарата для утилизации нефти и нефтепродуктов, является его способность утилизировать ПАУ: у штамма отмечен рост на нафталине, фенантрене, антрацене, флуорене, пирене и бифениле. Среди термотолерантных штаммов, выделенных из проб разных географических регионов, штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU демонстрирует наиболее широкий спектр полиароматических соединений, используемых в качестве субстратов.

Также в коллекции термотолерантных штаммов, исследуемых в работе, присутствовал штамм *Paenibacillus* sp. 12B, однако он отличался низким выходом по

биомассе и в целом малоэффективен, что ограничивает его потенциальное практическое применение в разрабатываемых консорциумах. Способность к окислению полиароматических соединений отмечали также у *R. pyridinivorans* AL-18, однако, несмотря на эффективную утилизацию отдельных углеводов, этот штамм слабо рос на средах с нефтью. Его возможное применение может быть связано исключительно с очисткой окружающей среды от отдельных углеводов – алканов и ПАУ.

Среди термотолерантных штаммов, отобранных путем температурной селекции среди общего количества нефтеокисляющих бактерий, выделенных из образцов различных географически удаленных регионов, было, таким образом, выделено три штамма, утилизирующих полиароматические соединения (2-4 кольца), причем все эти штаммы также частично утилизировали алканы. Термотолерантные бактерии-деструкторы алканов, наоборот, отличались полной неспособностью расти на ПАУ и не содержали соответствующих генов.

При изучении генов деструкции полиароматических соединений у штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU было выявлено, что штамм обладает характерным для родококков набором генов *nar*, ранее неоднократно обнаруженном в других родококках (Kulakov et al., 2005; Di Gennaro et al., 2010). Согласно данным, полученным Кулаковым с соавт. (2005), кластер генов *nar* может располагаться как на хромосоме, так и на плаزمиде штаммов. У штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU отмечали нестабильность генов *nar* и признака деструкции ПАУ (нафталина). Тем не менее, предположение о плазмидной локализации генов не удалось подтвердить: в штамме не было обнаружено плазмид. Секвенирование трех генов *nar* (*narAa*, *narAb*, *narB*) показало, что последовательности имеют значительное сходство с последовательностями расположенных на плазмиде генов *R. opacus* (Рис. 17). В отличие от *R. pyridinivorans*, о способности которых утилизировать ПАУ нет данных, представители *Rhodococcus opacus* являются распространенными деструкторами этих соединений, в частности нафталина (Di Gennaro et al., 2014; Pathak et al., 2013; Di Gennaro et al., 2010; Uz et al., 2000). Учитывая, что плазмид у штамма L5A-BSU не было найдено, а гены деструкции нафталина нестабильны, сделано предположение, что эти гены были приобретены в составе МГЭ (возможно, транспозоноподобной структуры), предположительно от *R. opacus*.

Несмотря на то, что признак деструкции ПАУ штаммом L5A-BSU нестабилен и легко теряется в неселективных условиях, этот штамм наиболее перспективен как деструктор ПАУ. Мы выяснили, что гены, ответственные за деструкцию нафталина штаммом L5A-BSU, находятся в составе МГЭ и могут перемещаться в родственные

штаммы, таким образом, распространяя этот признак среди бактерий, изначально не утилизирующих нафталин.

В литературе нет данных о способности *R. pyridinivorans* утилизировать ПАУ при температурах, отличных от умеренных. На примере исследуемого в данной работе штамма L5A-BSU предположено, что в хромосоме штамма *R. pyridinivorans*, помимо собственных генов деструкции алканов, поддерживается МГЭ предположительно транспозоноподобной структуры, который в селективных условиях стабильно наследуется даже при повышенных (до 50°C) температурах, что дает штамму возможность эффективно утилизировать полиароматические компоненты нефти.

Таким образом, в ходе работы была проанализирована способность термотолерантных штаммов утилизировать углеводороды различного химического строения. Известно, что с увеличением числа колец у ПАУ и длины скелета у алканов растворимость этих соединений в воде падает, и они становятся практически недоступными для микробной деструкции. Для повышения биодоступности труднорастворимых углеводородов бактерии используют ряд стратегий, одна из которых – продукция поверхностно-активных веществ. Способность к продукции ПАВ была одним из параметров, которые мы учитывали при отборе штаммов, наиболее перспективных как деструкторы нефти в условиях повышенных температур.

#### 4.1.3. Биосурфактанты термотолерантных нефтеокисляющих бактерий

Биосурфактанты (биоПАВ), продуцируемые микроорганизмами, могут быть связаны с клеточной стенкой (эндо-тип) или выделяться в среду культивирования (экзо-тип). В ходе работы была проанализирована способность термотолерантных бактерий к продукции биоПАВ.

При культивировании родококков на гидрофобных субстратах мы отмечали флотацию штаммов и образование ими поверхностного плотного слоя, состоящего из клеток и эмульгированного субстрата, в то время как жидкая минеральная среда оставалась практически прозрачной. Такой рост, как и модификация клеточной стенки гидрофобными соединениями, в целом характерен для нокардиоподобных соединений и в частности для родококков (Bouchez-Naitali et al., 2001; Chang et al., 2009; Hua & Wang, 2014). Также родококки являются известными продуцентами внеклеточных биосурфактантов в различных условиях – не только при умеренных (Cai et al., 2015; Kuyukina et al., 2015; Pirog et al., 2014; Inaba et al., 2013; Zaragoza et al., 2013; Pirog et al., 2013), но также при пониженных (Dang et al., 2015) и повышенных температурах (Dhail, 2012; Abu-Ruwaida et al., 1991). В основном эти микроорганизмы продуцируют в

культуральную среду липиды трегалозы, однако также есть сведения о продукции родококками свободных жирных кислот (Peng et al., 2007). Измерение поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта родококков, выращенных на минеральной среде с гексадеканом, показало, что изучаемые термотолерантные родококки вне зависимости от температуры не продуцируют в среду культивирования соединений, способных понижать поверхностное натяжение среды. Однако суспензия клеток исследуемых родококков была способна эмульгировать гексадекан (Табл. 11). Следовательно, клеточная стенка термотолерантных штаммов, используемых в работе, модифицирована соединениями, которые могут быть охарактеризованы как сурфактанты эндо-типа.

У термотолерантных гордоний при культивировании в диапазоне температур 24-50°C обнаружили образование не только клеточносвязанных, но также внеклеточных биосурфактантов (Табл. 12). Штаммы *G. amicalis* 1В, *Gordonia* spp. 1D и 1G продуцировали в среду культивирования соединения, понижающие поверхностное натяжение культуральной жидкости до 45 мН/м относительно контроля (воды – 72 мН/м). Как видно из данных табл. 12, все три штамма продуцировали соединения, практически одинаковые по поверхностно-активным свойствам.

В целом биосурфактанты гордоний изучены не так подробно, как у родококков, однако известно, что для штаммов *Gordonia* характерна продукция гликолипидов, углеводный остаток в которых может быть представлен рамнозой (Franzetti et al., 2009) или трегалозой (Franzetti et al., 2010), а также липопептидных ПАВ. Гликолипиды гордоний могут быть связаны с клеточной стенкой (Garton & Sutcliffe, 2006; Flaherty & Sutcliffe, 1999; Kugler et al., 2015) или продуцироваться в культуральную среду. Также у многих штаммов *Gordonia* отмечали продукцию биосурфактантов, структура которых не была определена авторами, однако поверхностно-активные свойства этих соединений были изучены (Iwahori et al., 2001; Pagilla et al., 2002; Pizzul, 2006; Saeki et al., 2009) или даже применены для ремедиации нефтезагрязненных участков (Saeki et al., 2009; Matsui et al., 2012; Silva et al., 2014). Тем не менее, следует отметить, что большинство работ, посвященных биосурфактантам гордоний, направлены на изучение мезофильных представителей этого рода. Способность к продукции ПАВ термотолерантным штаммом *G. alkanivorans* отмечали Йонг с соавт. (Young et al., 2005). Штамм СС-JG39, исследуемый в данной работе, продуцировал поверхностно-активные соединения при культивировании на минеральной среде с дизельным топливом в диапазоне температур 15-45°C. Кроме того, Лин с соавт. (Lin et al., 2008) отмечали у этого штамма продукцию

экзополисахаридов, способствующих флотации самого штамма и образованию его эмульсии в дизельном топливе.

Исследуемые нами штаммы *G. amicalis* 1B, *Gordonia* spp. 1D и 1G также образовывали слой эмульсии с гидрофобными субстратами (гексадеканом, дизельным топливом) на поверхности культуральной среды, однако часть клеток всё же оставалась рассредоточенной по всему объему жидкости. Было сделано предположение, что изучаемые штаммы *Gordonia* являются продуцентами гликолипидных ПАВ. Предполагаемые гликолипиды экстрагировали из культуральной жидкости, после чего очищали и сравнивали свойства сурфактантов, полученных при умеренной (24°C) и повышенной (45°C) температурах. Было выявлено, что поверхностно-активные свойства (поверхностное натяжение, индекс эмульгирования  $E_{24}$ ) биоПАВ, продуцируемых гордониями, не отличались, следовательно, уровень продукции сурфактантов не зависит от температуры. Тем не менее, при хроматографировании ПАВ гордоний на пластинах наблюдали качественные различия в составе гликолипидных смесей (Рис. 12). Работы по сравнению качественного состава смесей биосурфактантов, продуцируемых гордониями при различных температурах, ранее не проводились. В работе Йонга с соавт. (Young et al., 2005), например, отмечена зависимость поверхностно-активных свойств биосурфактантов штамма *G. alkanivorans* от температуры, однако о структуре или хотя бы типе этих соединений нет данных.

В ходе работы мы проанализировали физиологические и генетические особенности термотолерантных бактерий, позволяющие в дальнейшем составлять бактериальные ассоциации и отчасти прогнозировать их эффективность. Штаммы, исследуемые в работе, окисляли углеводороды различной химической природы, а также продуцировали ПАВ. Основываясь на полученных данных, мы отбирали наиболее перспективные культуры для дальнейшего анализа с целью составления микробных консорциумов. Термотолерантные бактерии как компоненты консорциумов для деструкции нефти в жарком климате могут быть значительно более эффективны по сравнению с известными мезофильными представителями, что даст возможность использовать исследуемые штаммы как одно из средств решения проблемы нефтяного загрязнения в регионах с жарким аридным климатом.

4.2. Биодеструкция нефти наиболее активными термотолерантными нефтеокисляющими штаммами и составление эффективного консорциума для деградации нефти в условиях жаркого климата

Анализ современной литературы, в том числе патентный поиск по российским и зарубежным источникам, показывает, что при составлении микробных препаратов, в том числе в регионах с жарким климатом, преимущественное влияние уделяется мезофильным штаммам-нефтедеструкторам (Бабаев с соавт., 2009; Казиева, Мелякина, 2014; Аюпова с соавт., 2014; Мухамбетов с соавт., 2013; Айткельдиева, Тлеулина, 2007; Раманкулов с соавт., патент KZ29967, 2014; Раманкулов с соавт., патент KZ29948, 2015). Такие разработки не рассчитаны на жаркий аридный климат, характерными особенностями которого являются резкие перепады температур, высокие (до 50°C) температуры воздуха и грунта в дневное время суток, а также, вследствие быстрого испарения воды, низкая влажность грунтов и высокое содержание в них соли.

Представляется очевидным, что для эффективной очистки территорий и акваторий в таких условиях термотолерантные микроорганизмы будут более перспективны, их потенциал как агентов ремедиации в жарком климате существенно превышает возможности распространенных мезофильных нефтедеструкторов. Однако особенности метаболизма и применения термотолерантных бактерий в технологиях очистки в настоящее время изучены слабо. В ходе выполнения данной работы показано, что термотолерантные бактерии обладают рядом преимуществ, позволяющих рассматривать их как перспективных агентов ремедиации грунтов и вод при повышенных температурах. Такие бактерии обладают смещенным (35-37°C) по сравнению с мезофильными (25-30°C) оптимумом роста, причем явное подавление роста термотолерантных культур, свидетельствующее о температурном стрессе, наблюдали только при повышении температуры до 48-50°C (Рис. 5 А, Б). Следовательно, с точки зрения температурной устойчивости термотолерантные бактерии будут более эффективны. Кроме того, в ходе работы было показано, что такие бактерии сохраняют способность утилизировать нефть и нефтепродукты в присутствии соли в среде культивирования. Это позволит применять препарат на их основе в засоленных грунтах и воде. Параметры температурной устойчивости и резистентности к соли, а также данные о минимальной необходимой влажности грунта для роста микроорганизмов-нефтедеструкторов являются ключевыми при отборе бактерий в основу разрабатываемого препарата, поскольку от этих сведений зависит не только суммарная эффективность деструкции нефти препаратом, но также нормы внесения биопрепарата, расход воды на орошение и количество грунта, с которым

необходимо перемешивать землю обрабатываемого участка для снижения солености. Таким образом, свойства бактерий-нефтедеструкторов по большей части определяют общую стоимость технологии очистки.

Тем не менее, большинство исследований, посвященных разработке и возможному применению биопрепаратов в жарком климате (например, на территориях Казахстана), не содержат данных об эффективности испытаний микроорганизмов в засоленных средах, а модельные эксперименты проводятся при умеренных (не выше 35°C) температурах. В ходе данной работы, направленной на создание микробного консорциума, эффективного именно в жарком климате, для испытания бактерий-нефтедеструкторов были смоделированы условия, соответствующие жаркому ариднему климату. В состав разрабатываемого консорциума, который в дальнейшем планируется использовать как основу микробного препарата для очистки грунтов и вод при повышенных температурах, вошли термотолерантные микроорганизмы, способные наиболее эффективно разлагать нефть в условиях, моделирующих засоленную воду и засоленный грунт с низкой влажностью, как при умеренных, так и при повышенных температурах.

Первоначальный отбор термотолерантных микроорганизмов для дальнейших исследований вели в среде без добавления избыточных количеств соли, поскольку выделение исключительно галофильных бактерий сузило бы в дальнейшем возможности применения потенциального биопрепарата на основе таких бактерий. Однако дальнейшая проверка выделенных микроорганизмов на способность утилизировать нефть в присутствии соли (3-10%) показала, что почти все бактерии в коллекции растут при концентрации соли в среде до 5% (Табл. 13). Галотолерантность актиномицетов в целом не является редкостью, ранее эту способность неоднократно отмечали у бактерий, выделенных в самых разных климатических условиях, в том числе и в регионах с жарким климатом (Ballav et al., 2015; Namedi et al., 2013). Результаты культивирования исследуемых нами бактерий в среде с содержанием различных концентраций соли показали, что с повышением температуры до 45°C рост многих бактерий ингибировался уже при 5% соли, хотя при 24°C в среде с такой соленостью отмечали активный рост. Это касалось всех термотолерантных родококков, кроме L5A-BSU, AL18 и штамма *Paenibacillus*. Для трех штаммов *Gordonia* (1B, 1D, 1G), *R. pyridinivorans* L5A-BSU и AL18 получили похожие результаты: эти штаммы росли на нефти в средах, содержащих 5% соли, при 24°C и 45°C, а при 7% соли в среде рост культур в значительной степени ингибировался. Полученные данные позволяют заключить, что среди выделенных в

работе бактерий присутствуют умеренно галотолерантные штаммы, которые было бы целесообразно включить в разрабатываемый консорциум.

4.2.1. Составление консорциумов термотолерантных актиномицетов и сравнение эффективности деструкции ими нефти

Определение эффективности деструкции нефти бактериями с целью отбора наиболее перспективных штаммов проводили в жидкой минеральной среде с добавлением 3% соли при 24 и 45°C, моделируя, таким образом, условия применения потенциального биопрепарата. Наибольшую степень деструкции нефти (рис. 13) демонстрировали штаммы *Gordonia* sp. 1D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Rhodococcus erythropolis* Par7 и *Rhodococcus* sp. Par6. Эти штаммы активно окисляли нефть не только при умеренной, но также при повышенной (45°C) температуре, что показывает их перспективность как компонентов потенциального биопрепарата. Интересно отметить, что из трех штаммов *Gordonia*, выделенных из пробы нефтезагрязненного грунта с территории нефтеперерабатывающего завода (Москва), штамм 1D утилизировал нефть наиболее полно, в то время как степень деструкции нефти штаммами 1B и 1G при 45°C резко падала по сравнению с 24°C. При этом три штамма морфологически сходны, а различия в спектрах окисляемых ими субстратов и резистентности к соли незначительны. Также отмечали рост и частичную деструкцию нефти штаммами *Deinococcus* sp. A2-6 и *Gordonia* sp. 1G, а штаммом *R. pyridinivorans* AL18 при умеренной температуре. Перечисленные штаммы отобрали для дальнейшего анализа их деструкционной эффективности в различных условиях.

При оценке микроорганизмов как кандидатов в потенциальный микробный препарат для деструкции нефти необходимо знать, какие концентрации загрязнителя являются для штаммов критическими. В ходе работы мы изучили рост наиболее активных термотолерантных бактерий при различных концентрациях нефти в среде культивирования. Результаты культивирования (табл. 15) показали, что 6 исследуемых штаммов росли и утилизировали нефть при концентрациях ее в среде до 10% как при умеренной, так и при повышенной температуре, однако при дальнейшем повышении концентрации нефти в среде начиналось ингибирование микробного роста, и при 20% нефти слабый рост, отмеченный по помутнению культуральной среды, наблюдали только у *Gordonia* sp. 1D и *Deinococcus* sp. A2-6. Из полученных данных можно заключить, что микроорганизмы, которые планируется включить в разрабатываемый консорциум, эффективны при концентрациях нефти не выше 10%, при более высоком уровне

загрязнения их применение будет нецелесообразным, и в таком случае потребуются снижение концентрации нефти механическими способами.

Учитывая сложность нефти как загрязнителя, состоящего из множества компонентов различной химической структуры, представляется очевидным, что использование отдельных штаммов, даже показавших высокую степень деструкции в монокультуре (как, например, *Gordonia* sp. 1D), для очистки территорий и акваторий не даст достаточного эффекта. Об эффективности консорциумов и их преимуществах перед индивидуальными штаммами в процессе очистки грунтов и вод от нефти сообщалось неоднократно (Al-Wasify & Named, 2014; Malik & Ahmed, 2012; Foght et al., 1999b; Кобзев с соавт., 2001). К тому же в природе индивидуальное действие монокультур практически не встречается, а деградация многокомпонентных смесей (таких как нефть) всегда обусловлена действием сообщества микроорганизмов и их взаимодействиями внутри этого сообщества (Шкидченко, Аринбасаров, 2001).

Тем не менее, четких критериев составления микробных консорциумов для включения их в состав биопрепаратов в настоящее время нет. Большинство исследователей при разработке таких консорциумов опираются на совместимость штаммов и их катаболическую активность (Shkidchenko & Akhmetov, 2013), а основным параметром, на основании которого формируется ассоциация, служит степень суммарной деструкции нефти. Такой подход не дает полной картины поведения микробного консорциума на обрабатываемом участке и не учитывает всех возможностей включаемых в ассоциацию бактерий. К тому же часто при составлении и дальнейшем патентовании консорциумов не берутся в расчет реальные условия участков, которые предстоит обрабатывать, а моделируется некий усредненный вариант. Например, препарат с условным названием «Микотрих» (Шигаева с соавт, 2010, патент РК №19425), разработанный в Казахстане, был испытан в модельных почвенных системах при комнатной температуре, а во время очистки нефтезагрязненного грунта температура воздуха держалась в диапазоне 28-35°C. Однако на территории Казахстана, особенно в южной части страны, температуры воздуха и, как следствие, почв не ограничиваются этим диапазоном и могут быть значительно выше.

К основным недостаткам микробных препаратов, которые могли бы быть применены для ремедиации грунтов в жарком климате, следует также отнести отсутствие данных о минимально допустимой влажности грунта. В случае же, когда этот параметр учитывается разработчиками, испытания препарата проводят при влажности, характерной для почв и грунтов умеренных широт (40-60%) (Бишимбаев с соавт, 2004, патент РК

№14923; Идрисова с соавт., 2015, патент РК №30176). Следует, однако, отметить, что использование препарата на основе микроорганизмов, адаптированных под такие значения влажности грунта, в засушливом климате полупустынь, будет чрезвычайно затратно именно с точки зрения расхода воды на орошение.

Саданов с соавт. (2009, патент РК №21710; 2012, патент РК №26078) разработали и запатентовали два консорциума штаммов, выделенных из почв с хроническим нефтяным загрязнением, для очистки грунтов от нефти в Казахстане. В состав консорциума, созданного авторами в 2009 г., входят представители исключительно актиномицетов родов *Micrococcus*, *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. Авторы полагают, что такой консорциум будет эффективен в жарком аридном климате. Однако сведений о температурной устойчивости и минимально допустимой влажности грунта нет, что не позволяет оценить целесообразность применения такого консорциума для очистки больших объемов грунта от нефти в условиях жаркого аридного климата. Второй консорциум (Саданов с соавт., 2011, патент РК №26078) представлен тремя штаммами *Arthrobacter* и одним штаммом дрожжей *Candida tropicalis*. Консорциум утилизировал 55% нефти при 10% уровне начального загрязнения за два месяца при 30°C. Далее Саданов с соавт. (2011, патент РК №24879) испытывали полученный консорциум на полигоне под Атырау и показали, что за два месяца степень микробной деструкции нефти составила 79.6% при начальном уровне загрязнения 133 г нефти/кг грунта. Однако такой результат достигнут посредством внесения микробной биомассы в виде пасты ( $10^9$  КОЕ/г препарата) с расходом 200 кг/га. Таким образом, несмотря на высокий показатель очистки грунта, можно полагать, что применение препарата именно в таком виде будет слишком дорогим, чтобы применять его на больших площадях.

При изучении информации о препаратах, применяемых для ремедиации нефтезагрязненных территорий в жарком климате, и анализ их основных недостатков, был выделен ряд принципов, которые, по мнению автора работы и на основании опыта предыдущих исследований лаборатории, позволят составить консорциум бактерий, наиболее эффективный и адаптированный к условиям, в которых планируется его использовать, т.е. при температурах до 50°C, повышенной солености грунта или воды, а также низкой влажности грунта. Эти параметры необходимо учитывать при моделировании условий жаркого аридного климата.

При составлении консорциума как основы биопрепарата целесообразно использовать бактерии, принадлежащие к разным родам или хотя бы видам. Это позволит минимизировать вероятность взаимного подавления роста близкородственными

штаммами, имеющими идентичные метаболические пути. Так, например, Саданов с соавт. (2011, патент РК №24879) при наработке биомассы для препарата «Бакойл», состоящего из двух штаммов *Micrococcus roseus* и одного штамма *R. erythropolis*, отмечали, что «при совместном выращивании отобранных штаммов наблюдается более низкое накопление клеток и слабая нефтеокисляющая активность».

Так как нефть является сложным загрязнителем, включающим множество соединений различной химической природы, микробный консорциум не может быть направлен на деструкцию только узкого их спектра. Для повышения суммарной степени деградации нефти в консорциум следует включать бактерии, способные окислять различные фракции нефти. Тем не менее, количество штаммов консорциума оптимально не должно превышать 3-5 культур, т.к. в противном случае их взаимодействие становится непредсказуемым, а наработка биомассы для препарата превращается в сложный, дорогостоящий и трудоемкий процесс.

При отборе микроорганизмов для создания консорциума, способного эффективно утилизировать нефть в жарком климате, учитывали данные о спектрах окисляемых штаммами субстратов (табл. 8), устойчивость бактерий к содержанию соли в среде (табл. 13), а также эффективность деструкции нефти бактериями при умеренной и повышенной температурах (рис. 13). На основании перечисленных параметров было отобрано 6 термотолерантных штаммов, из которых составили 4 консорциума (табл. 16). Все консорциумы отвечали перечисленным выше критериям: они не содержали близкородственных штаммов, а культуры, включенные в их состав, использовали в качестве источников углерода разные субстраты. У всех консорциумов оценили степень деградации нефти в жидкой минеральной среде (рис. 14) и выявили, что наиболее эффективно процесс деградации нефти протекал в системе с консорциумом В, составленным из *Gordonia* sp. 1D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *Rhodococcus erythropolis* Par7. Данный консорциум был эффективен как при умеренной, так и при повышенной температуре (рис. 14), вследствие чего может рассматриваться как основа потенциального микробного препарата для деструкции нефти в жарком климате. При начальном уровне загрязнения нефтью 2% консорциум утилизировал 68% нефти при 24°C и 39% нефти при 45°C за 14 суток культивирования.

Все консорциумы были составлены таким образом, чтобы включать деструкторов как алканов, так и полиароматических соединений – двух основных фракций нефти. В выбранном для дальнейшего исследования консорциуме В сочетание штаммов оказалось наиболее оптимальным. Проверка на возможное взаимодействие культур и их антагонизм

показала, что штаммы не оказывали негативного влияния друг на друга, зон лизиса или задержки роста отмечено не было. Следовательно, можно полагать, что даже при совместном культивировании возможное негативное влияние будет сведено к минимуму. Для проверки этого предположения три культуры консорциума выращивали совместно в жидкой минеральной среде и наблюдали динамику развития смешанной культуры (Раздел 3.5.2.2. Результаты). В ходе эксперимента было выявлено, что штаммы, инокулированные примерно в одинаковой численности, в процессе роста испытывают колебания численности и растут с разной скоростью. Так, например, у штамма *Gordonia* sp. 1D отмечали наиболее долгую лаг-фазу по сравнению с остальными штаммами консорциума. Однако к моменту окончания эксперимента (25 сутки) численность клеток штаммов смешанной культуры по большей части выравнивалась. Мы показали, что консорциум актиномицетов (два штамма *Rhodococcus* и один штамм *Gordonia*) стабилен, а при совместном культивировании бактерии не испытывают стресса.

4.2.2. Оценка деградирующей активности консорциума термотолерантных бактерий в грунте и анализ деградации штаммами консорциума основных фракций нефти

Для более полного представления о возможностях составленного консорциума и понимания его потенциала как основы биопрепарата для очистки грунтов в жарком аридном климате была оценена эффективность деструкции нефти консорциумом в модельном грунте. Эксперимент выполняли в модельном грунте (песке) с влажностью 10%, что соответствует среднему значению параметра влажности грунта для полупустынь Казахстана и юго-востока европейской части России. В модельный грунт добавляли нефть (20 г/кг грунта) и соль (3%). По итогам эксперимента отмечали значительно бóльшую абиотическую убыль нефти в грунте по сравнению с жидкой средой: при 24°C она составила 20%, при 45°C – 33%. Следует также отметить, что повышенная температура провоцирует быстрое испарение легко усваиваемых средних и легких фракций нефти, оставляя тяжелые соединения для утилизации микроорганизмами. Таким образом, консорциум бактерий в грунте утилизировал даже труднодоступные для окисления компоненты нефти.

По результатам эксперимента, консорциум трех штаммов в грунте утилизировал нефти больше, чем монокультура каждого из штаммов отдельно (рис. 14). За три недели культивирования консорциумом было утилизировано 70% нефти при 24°C и 59% нефти при 45°C. Остаточное загрязнение нефтью модельного грунта по итогам эксперимента составило 10% от исходного (20 г/кг грунта) количества, т.е. 2 г/кг грунта, при 24°C, и 8% от исходного (1.6 г/кг грунта) при 45°C.

Таким образом, подтверждена эффективность консорциума штаммов *Gordonia* sp. 1D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *Rhodococcus erythropolis* Par7 не только в жидкой минеральной среде, но также в грунте с низкой влажностью. Составленный в данной работе консорциум трех актиномицетов может стать перспективной основой биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов и вод в регионах с жарким климатом: на юге России или, например, в Казахстане, где применение микроорганизмов для очистки территорий от нефти в настоящее время широко распространено (Адилов с соавт., 2010, патент РК №22556; Саданов с соавт., 2009, патент РК №21710; Идрисова с соавт., 2015, патент РК №30176; Саданов с соавт., 2011, патент РК №24879). Так, например, Идрисова с соавт. (2015, патент РК №30176) использовали биопрепарат «Бакойл-KZ» для очистки от нефти грунта на полигоне «К-Курылыс» месторождения Кумколь. Расход препарата составил 75 кг/га, влажность грунта на протяжении эксперимента поддерживали на уровне 60%. Преимуществами предлагаемого нами консорциума является то, что бактерии выдерживают повышенные (до 50°C) температуры, а эффективность разработки подтверждена при влажности грунта 10%.

За исключением разработок Саданова с соавт. (Саданов с соавт., 2009, патент РК №21710; Саданов с соавт., 2011, патент РК №24879), о консорциумах на основании только актиномицетов, эффективных в условиях повышенных температур, ранее не сообщалось. Несмотря на то, что представители этого семейства являются широко распространенными деструкторами нефти в умеренном и холодном климате, по эффективности деструкции нефти в жарком климате известные представители актиномицетов уступают бациллам. В свою очередь, консорциум с добавлением бацилл ранее был применен в Казахстане для очистки нефтезагрязненного грунта с территории месторождения Жанаталап под Атырау (Саданов с соавт., 2006, патент РК №21686). Однако авторы указывают, что верхняя граница рабочего температурного диапазона всех штаммов консорциума не превышала 37°C. Достоинством этой разработки можно считать способность входящих в нее штаммов выдерживать содержание соли в среде 7%.

По химическому составу нефть является многокомпонентной смесью соединений различной природы. Основных фракций нефти можно выделить три: гексановая (алканы), бензольная (полиароматические углеводороды, нафтены) и спирто-бензольная (смолисто-асфальтеновые вещества). Соотношение этих фракций может меняться в зависимости от месторождения, что необходимо учитывать при выборе ремедиационного подхода. Так, например, доля алканов в нефти обычно не превышает 50%, однако в некоторых нефтях количество алканов может составлять до 70% или, наоборот, не более 15%. Среди нефтей,

добываемых на территориях стран СНГ, наибольшим содержанием алканов отличается нефть с полуострова Мангыстау в Казахстане (месторождения Узень и Жетыбай).

Полиароматических соединений в нефти обычно не больше 10-15%, однако в ряде случаев их количество может достигать 30%. После тяжелых смол, которые до недавнего времени считались недоступными для микробной деградации, ПАУ являются наиболее трудно утилизируемыми субстратами. Основная причина этого – низкая растворимость ПАУ в воде, которая падает с увеличением количества колец.

Высокие температуры воздуха и, как следствие, грунта в весенне-летний период в регионах с жарким климатом приводят к тому, что легкие и средние фракции нефти испаряются в первые дни и недели после разлива нефти, а в грунте остаются тяжелые соединения сложной структуры. В нефтешламах и хронически загрязненном грунте с территории месторождений такие соединения являются основными потенциальными субстратами для микроорганизмов. Именно они представляют основную проблему при очистке грунтов биопрепаратами.

Несмотря на то, что тяжелые фракции нефти утилизируются бактериями медленно и в меньшей степени, чем более доступные соединения, существуют микробные препараты, целесообразность применения которых для деструкции хронически загрязненных грунтов была проверена на территориях месторождений и прилежащих полигонов. Так, биопрепарат «Ойлдест» (Раманкулов с соавт., 2011, патент РК №25751) использовали для очистки от нефти грунта на полигоне месторождения Жетыбай (Мангыстау), а препарат «Микотрих» (Шигаева с соавт., 2009, патент РК №19425) – в замазученном грунте в Алматы. Среди биопрепаратов, которые могут быть применены для ремедиации нефтезагрязненных грунтов в регионах с жарким климатом, наиболее близким аналогом предлагаемой нами разработки является «Перойл», состоящий из двух штаммов, принадлежащих к *Rhodococcus* sp. и *Micrococcus luteus* (Бишимбаев с соавт., 2006, патент РК №14923; Исаева с соавт., 2013). Штамм *Micrococcus* способен выдерживать температуру до 40°C, штамм *Rhodococcus* – до 45°C. Препарат «Перойл» был испытан на территории нефтеперерабатывающего завода. Авторы выявили, что штаммы, входящие в состав препарата, в основном ориентированы на ПАУ, однако полициклоалканы не подвергались деструкции бактериями препарата.

В ходе выполнения данной работы была проанализирована способность наиболее эффективных термотолерантных бактерий-деструкторов утилизировать углеводороды трех основных фракций нефти: алканов различной длины, ПАУ и нафтенов, смолисто-асфальтеновых соединений.

В ходе эксперимента выявили, что при 24°C и 45°C штаммы *Gordonia* sp. 1D и *R. erythropolis* Par7 утилизировали алканы, *R. pyridinivorans* L5A-BSU – ПАУ, и все три штамма частично окисляли смолисто-асфальтеновые вещества. Полученные результаты позволяют заключить, что использование консорциума термотолерантных актиномицетов позволит наиболее полно различные фракции нефти в грунтах и водах.

Проведенный в ходе работы анализ свойств термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов позволяет заключить, что штаммы с такими свойствами могут быть выделены не только в регионах с жарким климатом, но также и в умеренных условиях. Так, в консорциум, проявивший наибольшую деградирующую активность в отношении нефти, были отобраны штаммы, выделенные в Казахстане (*Rhodococcus erythropolis* Par7), Московской области (*Gordonia* sp. 1D) и Беларуси (*R. pyridinivorans* L5A-BSU). Были исследованы основные генетические детерминанты, контролирующие деструкцию углеводородов этими штаммами, и показано, что штаммы консорциума эффективно утилизируют основные фракции нефти как при умеренной (24°C), так и повышенной (45-50°C) температурах. На основании выполненных исследований была подана заявка на патент на консорциум термотолерантных актиномицетов как средство деструкции нефти при температурах до 50°C, содержании соли до 7%, концентрации нефти до 10%, а также минимально допустимой влажности грунта 10%.

## ВЫВОДЫ

1. У 18 термотолерантных культур была проанализирована способность утилизировать углеводороды при температурах до 50°C. Штаммы были идентифицированы как представители родов *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus* и *Deinococcus*.

2. Наиболее эффективные термотолерантные деструкторы – *Gordonia* sp. 1D, *Gordonia* sp. 1G, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Rhodococcus* sp. Par6, *Deinococcus* sp. A2-6 – утилизировали нефть как при 24°C, так и при 45°C, в присутствии нефти до 10% и соли до 7%.

3. Все исследуемые штаммы *Gordonia* продуцировали внеклеточные биоПАВ (гликолипидные смеси). При культивировании при различных температурах смеси отличались по составу, однако обладали одинаковой поверхностной и эмульгирующей активностью.

4. Проанализированы последовательности фрагментов генов алкан гидроксилаз *alkB* и *CYP153* в штамме *Gordonia* sp. 1D. Отсутствие изменений в спектрах окисляемых штаммом субстратов позволяет предположить, что оба фермента активны как при умеренных, так и при повышенных (45-50°C) температурах.

5. Гены деструкции нафталина *nar* в штамме *R. pyridinivorans* L5A-BSU предположительно находятся в составе мобильного генетического элемента в хромосоме штамма. Был осуществлен перенос МГЭ в штамм *R. erythropolis* Par7, получены  $\text{Nah}^+$  рекомбинанты.

6. Составлен консорциум штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, способный утилизировать нефть и нефтепродукты в грунтах и водах при температурах 20-50°C, уровне загрязнения нефтью до 10%, при влажности грунта около 10%. Показана эффективность консорциума штаммов в условиях, моделирующих жаркий аридный климат (уровень загрязнения нефтью 2%, соленость 3%, влажность грунта 10%): степень деструкции составила 70 и 59% нефти за вычетом абиотической убыли (при температурах 24°C и 45°C соответственно).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel-Megeed A., Al-Rahma A.N., Mostafa A.A., Husnu Can Baser K. Biochemical characterization of anti-microbial activity of glycolipids produced by *Rhodococcus erythropolis* // *Pak. J. Bot.* – 2011. – Vol. 43. – No. 2. – P. 1323-1334.
2. Abdelmohsen U.R., Yang C., Horn H., Hajjar D., Ravasi T., Hentsche U. Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity // *Mar. Drugs.* – 2014. – Vol. 12. – P. 2771-2789.
3. Abed R.M.M., Al-Sabahi J., Al-Maqrashi F., Al-Habsi A., Al-Hinai M. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2014. – Vol. 89. – P. 58-66
4. Abed R.M.M., Al-Thukair A., de Beer D. Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2006. – Vol. 57. – P. 290–301
5. Abed R.M.M., Safi N.M.D., Koster J., de Beer D., Rullkotter J., Garcia-Pichel F. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 1674–1683.
6. Aburas M.M. Enhancing Bioremediation of Saudi Desert Soils Polluted with Hydrocarbons // PhD Thesis. – University of Surrey, Guildford . – 2010.
7. Abu-Ruwaida A. S., Banat I.M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri M. Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria Product Characterization, and Evaluation // *Acta Biotechnologica.* – 1991. – Vol. 11. – No. 4. – P. 315-324.
8. Acer O., Güven K., Bekler F.M., Güven R. Isolation and characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakır, in the Southeast of Turkey // *Bioremediation Journal.* – 2016. – Vol. 20. – No. 1. – P. 80-87.
9. Adamopoulou E., van Gelderen L., Kirkelund G.M., Jomaas G. Chemical herding and in-situ burning of crude oil in a water basin in Sisimiut, Greenland // Poster session presented at SPE Copenhagen. November 2015 Meeting, Kgs. Lyngby, Denmark. – 2015.
10. Adesodun J.K., Mbagwu J.S.C. Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings // *Bioresource Technol.* – 2008. – Vol. 99. – No. 13. – P. 5659-5665.

11. Agarry S. E., Owabor C. N. and Yusuf R. O. Bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbon mixtures: Evaluation of the use of animal manure and chemical fertilizer // *Bioremediation J.* – 2010. – Vol. 14. – No. 4. – P. 189 - 195.
12. Agarry S.E., Jimoda L.A. Application of Carbon-Nitrogen Supplementation from Plant and Animal Sources in In-situ Soil Bioremediation of Diesel Oil: Experimental Analysis and Kinetic Modelling // *Journal of Environment and Earth Science.* – 2013. – Vol. 3. – No.7. – P. 51-62.
13. Agbor R. B., Ekpo I. A., Osuagwu A. N., Udofia U. U., Okpako E. C. and Antai S. P. Biostimulation of microbial degradation of crude oil polluted soil using cocoa pod husk and plantain peels // *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* – 2012. – Vol. 2. – No. 3. – P. 464-469
14. Al-Daher R., Al-Awadhi N., El-Nawawy A. Bioremediation of damaged desert environment using the windrow soil pile system in Kuwait // *Environ Int.* – 1998. – Vol. 24. – P. 175–180.
15. Alexander M. *Biodegradation and Bioremediation* // Academic Press, San Diego, CA, USA. – 1994.
16. Alexander, M. *Biodegradation and Bioremediation*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego. – 1999.
17. Ali N., Dashti N., Salamah S., Sorkhoh N.A., Radwan S.S. Dynamics of bacterial populations during bioremediation of oily seawater and desert soil bioaugmented with coastal microbial mats // *Microb Biotechnol.* – 2016. – Vol. 9. – No. 2. – P. 157-171.
18. Alkhatib M.F., Alam M. Z., Muyibi S.A., Husain I.A.F. An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation // *African Journal of Biotechnology.* – 2011. – Vol. 10. – No. 81. – P. 18763-18767.
19. Allen, A.A., D.H. Dale. Dispersant mission planner: A computerized model for the application of chemical dispersants on oil spills // *Proceedings of the Eighteenth Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar.* – June 14-16, 1995, Edmonton. – P. 393-414.
20. Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H., Eliyas M., Radwan S.S. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf // *Extremophiles.* –2010. – Vol. 14. – No. 3. – P. 321-328.
21. Almeda R., Hyatt C.J., Buskey E. Toxicity of dispersant Corexit 9500A and crude oil to marine microzooplankton // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2014. – Vol. 5. – P. 76-85.

22. Almeida P.F., Moreira R.S., Almeida R.C.C., Guimarães A.K., Carvalho A.S., Quintella C., Esperidiã M.C.A., Taf C.A. Selection and Application of Microorganisms to Improve Oil Recovery // *Eng.Life Sci.* – 2004. – Vol. 4. – No. 4. – P. 319-325.
23. Alonso-Gutierrez J., Teramoto M., Yamazoe A., Harayama S., Figueras A., Novoa B. Alkane-degrading properties of *Dietzia* sp. H0B, a key player in the Prestige oil spill biodegradation (NW Spain) // *J Appl Microbiol.* – 2011. – Vol. 111. – No. 4. – P. 800–810.
24. Al-Sayed H.A., Mahasneh A.M., Al-Saad J. Variations of trace metal concentrations in seawater and pearl oyster *Pinctada radiata* from Bahrain (Arabian Gulf) // *Mar. Pollut. Bull.* – 1994. – Vol. 28. – No. 6. – P. 370–374.
25. Al-Wasify R.S., Hamed S.R. Bacterial Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates // *International Journal of Bacteriology.* – 2014. - Article ID 863272. – 8 pages
26. Amouric A., Quéméneur M., Grossi V., Liebgott P.P., Auria R., Casalot L. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete // *J Appl Microbiol.* – 2010. – Vol. 108. – P. 1903–1916.
27. Andreoni V., Bernascon S., Colombo M., van Beilen J.B., Cavalca L. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN // *Environmental Microbiology.* – 2000. – Vol. 2. – No. 5. – P. 572-577.
28. Andria V. Molecular Analysis of Hydrocarbon-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (alk) genes in Association with Highly Tolerant Plant Species for Phytoremediation of Petroleum Oil Contamination in Soil // *Dissertation, Vienna.* – 2008.
29. Annweiler E., Richnow H.H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W., Michaelis W. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* // *Appl Environ Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 518–523.
30. Arenskötter M., Bröker D., Steinbuchel A. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia* // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2004. – Vol. 70. – No. 6. – P. 3195-3204.
31. Atlas R. M. Effects of hydrocarbons on microorganisms and biodegradation in Arctic ecosystems // in *Petroleum Effects in the Arctic Environment*, F.R.Engelhardt,Ed. Elsevier, London, UK. – 1985. – P. 63–99.
32. Atlas R.M., Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation // *Advances in Microbiology and Ecology.* – 1992. – Vol. 12. – P. 287–338
33. Atlas R.M., Bronner A. Microbial hydrocarbon degradation within intertidal zones impacted by the Amoco Cadiz oil spillage // *In Proceedings of the International*

Symposium on the Amoco Cadiz: Fates and Effects of the Oil Spill. Centre Oceanologique de Bretagne, Brest, France. – 1980a.

34. Atlas R.M., Roubal G., Haines J. Biodegradation of hydrocarbons in mousse from the IXTOC-I well blowout // Proceedings of Symposium on Assessment of the Environmental Impact of Accidental Oil Spills in the Oceans. – 24-29 August 1980, San Francisco. Ann Arbor Science Publications, Inc., Ann Arbor, Mich. – 1980b.

35. Ausubel. F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Struhl, K. Current protocols in molecular biology. – N.Y.: John Wiley & Sons. – 2003. – P. 180-183.

36. Bagdasarian A., J. Feather, B. Hull, R. Stephenson and R. Strong. Crude unit corrosion and corrosion control, Corrosion/96, Paper No. 615, Houston, Texas, NACE International, 1996.

37. Balba M.T., Al-Awadhi N., Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation // Journal of Microbiological Methods. – 1998. – Vol. 32. – P. 155-164.

38. Balba T. Bioremediation of oil-contaminated sites. Case Studies Involving Light and Heavy Petroleum Hydrocarbons // Ph. D. Thesis – Conestoga-Rovers & Associates (Niagara Falls, NY). – 2003.

39. Ballav S., Kerkar S., Thomas S., Augustine N. Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites // J Biosci Bioeng. – 2015. – Vol. 119. – No. 3. – P. 323-30.

40. Banat I.M., Marchant R. Geobacillus Activities in Soil and Oil Contamination Remediation // In: Endospore-forming Soil Bacteria. – 2011. – P. 259-270.

41. Barbieri P., Palladino L., Di-Gennaro P., Galli E. Alternative pathways for o-xylene or m-xylene and p-xylene degradation in a Pseudomonas stutzeri strain // Biodegradation. – 1993. – Vol. 4. – P. 71-80.

42. Bargiela R., Mapelli F., Rojo D., Chouaia B., Tornés J., Borin S., Richter M., Del Pozo M.V., Cappello S., Gertler C., Genovese M., Denaro R., Martínez-Martínez M. [et al.] Bacterial population and biodegradation potential in chronically crude oil-contaminated marine sediments are strongly linked to temperature // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 1-15.

43. Barnsley E.A. Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene // J Bacteriol. – 1983. – Vol. 153. – No. 2. – P.1069–1071.

44. Bayat Z., Hassanshahian M., Cappello S. Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review // The Open Microbiology Journal. – 2015. – Vol. 9. – P. 48-54.

45. Beal R., Betts W.B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexdecane by hydrocarbon assimilation and biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* // *J Appl Microbiol.* – 2000. – Vol. 89. – P. 158-168.
46. Bell T.H., Callender K.L., Whyte L.G., Greer C.W. Microbial Competition in Polar Soils: A Review of an Understudied but Potentially Important Control on Productivity // *Biology.* – 2013. – Vol. 2. – P. 533-554.
47. Ben Ali Gam Z., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J. L., Oueslati R. and Labat M. *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2307–2313
48. Ben Belgacem Z., Bijttebier S., Verreth C., Voorspoels S., Van de Voorde I., Aerts G., Willems K.A., Jacquemyn H., Ruyters S., Lievens B. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar // *Journal of Applied Microbiology.* – 2015. – Vol. 118. – P. 1370—1384.
49. Benyahia F., Abdulkarim M., Zekri A., Mohamed A.M.O., Chaalal O. (2006) Bioremediation of Crude Oil Contaminated UAE Soils: Challenges and Advances // In: *Developments in Arid Regions Research.* – 2006. – Vol. 3. – P. 255-262.
50. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1951. V. 62. P. 293–300.
51. Berthe-Corti L., Fetzner, S. Bacterial metabolism of alkanes and ammonia under oxygen depleted conditions // *Acta Biotechnol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 299-336.
52. Bihari Z., Szabo Z., Szvetnik A., Balazs M., Bartos P., Tolmacsov P., Zombori Z., Kiss I. Characterization of a novel long-chain n-alkane-degrading strain, *Dietzia* sp. E1 // *Z Naturforsch C.* – 2010. – Vol. 65. – P. 693–700.
53. Bihari Z., Szvetnik A., Szabo Z., Blastyak A., Zombori Z., Balazs M., Kiss I. Functional analysis of long-chain n-alkane degradation by *Dietzia* spp. // *FEMS Microbiol Lett.* – 2011. – Vol. 316. – No. 2. – P. 100-107.
54. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic acids research.* – 1979. – Vol. 7. – No. 6. - 1513-1523.
55. Bodour A.A., Maier R.M. Biosurfactants: types, screening methods and application // *Encyclopedia of environmental microbiology.* – 2002. – Vol. 2. – P. 750–769.

56. Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons // *Colloids Surf.* – 1999. – Vol. 152. – P. 41–52.
57. Boonmak C. Gene cloning and functional analysis of triple alkane monooxygenases from *Geobacillus thermoleovorans* B23 // *Doctoral dissertation.* – 2014.
58. Boonmak C., Takahashi Y., Morikawa M. Cloning and expression of three ladA-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23 // *Extremophiles.* – 2014. – Vol. 18. – P. 515–523
59. Bossert I., Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystem // in: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology.* Macmillan Co., New York. – 1984. – P. 435–476
60. Bouchez-Naitali M., Blanchet D., Bardin V., Vandecasteele J.P. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 2537–2543.
61. Bouwer E.J., Zehnder A.J.B. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work // *TIBTECH.* – 1993. – Vol. 11. – P. 360–367.
62. Bregnard T., Hoehener P., Haener A., Zeyer J. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1996. – Vol. 15. – P. 299–307.
63. Bridie A.L., Bos J. Biological degradation of mineral oil in seawater // *J. Inst. Pet.* – 1971. – Vol. 57. – P. 270–277.
64. Cai Q., Zhang B., Chen B., Song X., Zhu Z., Cao T. Screening of biosurfactant-producing bacteria from offshore oil and gas platforms in North Atlantic Canada // *Environ Monit Assess.* – 2015. – Vol. 187. – No. 5. – P. 284–296.
65. Calvo C., Toledo F.L., González-López J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge // *Journal of Biotechnology.* – 2004. – Vol. 109. – P. 255–262.
66. Carmichael L.M., Pfaender, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils // *Biodegradation.* – 1997. – Vol. 8. – P. 1–13.
67. Cerniglia C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 1997. – Vol. 19. – P. 324–333.
68. Cerniglia C.E., Heitkamp M.A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment // In M. Varanasi (ed.), *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment.* – 1989. – P. 48–68.

69. Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of Maize (*Zea mays* L.) // *Journal of Environmental Quality*. – 2000. – Vol. 29. – P. 569–578.
70. Chaîneau C.H., Rougeux G., Yepremian C., Oudot J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil // *Soil Biology & Biochemistry*. – 2005. – Vol. 37. – P. 1490–1497
71. Chamkha M., Mnif S. and Sayadi S. Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus*, from a Tunisian high-temperature oil field // *FEMS Microbiol Lett.* – 2008. – Vol. 283. – P. 23–29.
72. Chang W.N., Liu C.W., Liu H.S. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis* // *Process Biochemistry*. – 2009. – Vol. 44. – P. 955–962.
73. Chekroun K.B., Sánchez E., Baghour M. The role of algae in bioremediation of organic pollutants // *International Research Journal of Public and Environmental Health*. – 2014. – Vol.1. – No. 2. – P. 19-32.
74. Chibuike G.U., Obiora, S.C. Bioremediation of hydrocarbon-polluted soils for improved crop performance // *International journal of Environmental Sciences*. – 2014. – Vol. 4. – No. 5. – P. 840-858.
75. Chopard C., Bertho G., Prangé T. Naphthalene-dioxygenase catalysed cis-dihydroxylation of bicyclic azaarenes // *RSC Adv.* – 2012. – Vol. 2. – P. 605-615.
76. Chorom M., Sharifi H.S., Motamedi H. Bioremediation of a Crude Oil-polluted Soil by Application of Fertilizers // *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* – 2010. – Vol. 7. – No. 4. – P. 319-326.
77. Chouteau J., Azoulay E., Senez J. C. Anaerobic formation of n-hept-1-ene from n heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* // *Nature*. – 1962. – Vol. 194. – P. 576-578.
78. Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // *J Appl Microbiol.* – 2002. – Vol. 93. – P. 915–929.
79. Coates J.D., Anderson R.T., Lovley D.R. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996a. – Vol. 62. – P. 1099–1101.
80. Coates J.D., Anderson R.T., Woodward J.C., Phillips E.J.P., Lovley D.R. Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions // *Environ. Sci. Tech.* – 1996b. – Vol. 30. – P. 2764–2769.

81. Colwell R.K., Mills A.L., Walker J.D., Garcia-Tello P., Campos V. Microbial ecology studies of the Metula spill in the Straits of Magellan // *J. Fish. Res. Board Can.* – 1978. – Vol. 35. – P. 573-580.
82. Cooney J. J. The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems // in *Petroleum Microbiology*, R.M. Atlas, Ed. Macmillan, New York, NY, USA. – 1984. – P. 399–434.
83. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1987. – Vol. 53. – No. 2. – P. 224-229.
84. Cornforth D.M., Foster K.R. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses // *Nat Rev Microbiol.* – 2013. – Vol. 11. – No. 4. – P. 285-293.
85. Crapez M.A.C., Borges A.L.N., Bispo M.G.S., Prereira D.C. Tratamento para derrames de petróleo // *Ciencia Hoje.* – 2002. – Vol. 30. – No. 179. – P. 32–37.
86. Daane L.L., Harjono I., Barns S.M., Launen L.A., Palleroni N.J., Haggblom M.M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalenedegrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 52. – P. 131-139.
87. Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P. Biological surface-active compounds from marine bacteria // *Environ Technol.* – 2016. – Vol. 37. – No. 9. – P. 1151-1158.
88. Danjuma B. Y., Abdulsalam S. and Sulaiman A. D. I. Kinetic investigation of Escravos crude oil contaminated soil using natural stimulants of plantsources // *Int. J. Emerging Trends in Eng. & Dev.* – 2012. – Vol. 2. – No. 5. – P. 478-486.
89. Das K., Mukherjee A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2005. – Vol. 69. – P. 192-199.
90. Dastgheib S.S.M., Amoozegar M.A., Elahi E., Asad S., Banat I.M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery // *Biotechnology Letters.* – 2008. – Vol. 30. – P. 263-270.
91. de Mora S., Tolosa I., Fowler S.W., Villeneuve J.P., Cassi R., Cattini C. Distribution of petroleum hydrocarbons and organochlorinated contaminants in marine biota and coastal sediments from the ROPME Sea Area during 2005 // *Marine Pollution Bulletin.* – 2010. – Vol. 60. – P. 2323–2349.
92. Deeb R.A., Alvarez-Cohen L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and

*Rhodococcus rhodochrous* // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1999. – Vol. 62. – No. 5. – P.526-536.

93. Denger K., Schink B. New halo- and thermotolerant fermenting bacteria producing surface-active compounds // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 1995. – Vol. 44. – P. 161-166.

94. Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2002. – Vol. 52. – P. 173-178.

95. Dhail S. Isolation of potent biosurfactant producing bacteria from oil spilled marine water and marine sediments // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 11. – No. 103. – P. 16751-16757.

96. Di Gennaro P., Terreni P., Masi G., Botti S., De Ferra F., Bestetti G. Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2010. – Vol. 87. – No. 1. – P. 297-308.

97. Di Gennaro P., Zampolli J., Presti I., Cappelletti M., D'Ursi P., Orro A., Mezzelani A., Milanese L. Genome Sequence of *Rhodococcus opacus* Strain R7, a Biodegrader of Mono- and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // *Genome Announc*. – 2014. – Vol. 2. – No. 4. – P. 827.

98. Diestra E., Esteve I., Castell O., Solé A. Ultrastructural changes in *Microcoleus chthonoplastes* growing in the presence of crude oil. Applications for Ecological Studies // In A. Mendez-Vilas (ed.), *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, FORMATEX Microscopy Book Series. – 2007a. – Vol. 3.

99. Dinamarca M.A., Aranda-Olmedo I., Puyet A., Rojo F. Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: Evidence from continuous cultures // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – Vol. 185. – P. 4772–4778.

100. Ehrhardt D.D., Secato J.F.F., Tambourgi E.B. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Using the Residue from Processing of Pineapple, Enriched with Glycerol, as Substrate // *Chemical Engineering Transactions*. – 2015. – Vol. 43. – P. 277-282.

101. Ekperusi O.A., Aigbodion F.I. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus* // *3 Biotech*. – 2015. – Vol. 5. – P. 957–965.

102. El-Tarrs A.E., Shahaby A.F., Awad N.S., Bahobial A.S., El-Abib O.A. In vitro screening for oil degrading bacteria and evaluation of their biodegradation potential for hydrocarbon // *African Journal of Microbiology Research*. – 2012. – Vol. 6. – No. 49. – P. 7534-7544.
103. Ensley B.D., Gibson D.T. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component // *J Bacteriol*. – 1983. – Vol. 155. – No. 2. – P. 505-511.
104. Evans C.G.T., Herbet D., Tempest D.W. The continuous culture of microorganisms 2. Construction of a chemostat // In: Norris J.R., Ribbons D.W. (eds) *Methods in microbiology*, vol 2. – 1970. – P. 277–327.
105. Farahani H.F. A Study on Burning of Crude Oil in Ice Cavities // PhD Thesis, Worcester Polytechnic Institute. – 2013.
106. Farrington J.W. Oil Pollution in the Marine Environment II: Fates and Effects of Oil Spills, *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*. – 2014. – Vol. 56. – No. 4. – P. 16-31.
107. Fedorak P.M., Westlake D.W.S. Degradation of aromatics and saturates in crude oil by soil enrichments // *Water Air Soil Pollution*. – 1981. – Vol. 16. – P. 367–375
108. Feitkenhauer H., Muller R., Markl H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain n-alkanes at 60–70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. // *Biodegradation*. – 2003. – Vol. 14. – P. 367–372.
109. Feng L., Wang W., Cheng J., Ren Y., Zhao G., Gao C., Tang Y., Liu X., Han W., Peng X., Liu R., Wang L. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir // *PNAS*. – 2007. – Vol. 104. – No. 13. – P. 5602-5607.
110. Fiedler L., Gilbert E. Introduction to in situ bioremediation of groundwater // United States Environmental Protection Agency. – 2013. – 86 pages.
111. Flaherty C., Sutcliffe I.C. Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglycan in *Gordonia rubropertincta* // *Syst. Appl. Microbiol*. – 1999., - Vol. 22. – P. 530–533.
112. Floodgate G. D. Nutrient limitation // In A. W. Bourquin and P. H. Pritchard (ed.), *Proceedings of workshop, Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments*. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, Fla. – 1979. – P. 107-118.
113. Foght J.M., McFarlane D.M. Growth of extremophiles on petroleum. Enigmatic microorganisms and life in extreme environments // Seckbach J, ed. – 1999. – P. 527–538.
114. Foght J.M., Semple K., Gauthier C., Wetlake D.W.S., Blenkinsopp S., Wang Z., Fingas M. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial

consortium incubated under cold, marine conditions // *Environ. Technol.* – 1999b. – Vol. 20. – P. 839-849.

115. Foster K.R., Bell T. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species // *Current Biology.* – 2012. – Vol. 22. – P. 1845–1850.

116. Francy D., Thomas J., Raymond R., Ward C. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // *J. Industrial Microbiol.* – 1991 – V. 8. – No 3. – P. 237-246.

117. Franzetti A., Caredda P., Ruggeri C., La Colla P., Tamburini E., Papacchinic M., Bestetti G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies // *Chemosphere.* – 2009. – Vol. 75. – P. 801-807.

118. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 112. – P. 617–627.

119. Freije A.M. Heavy metal, trace element and petroleum hydrocarbon pollution in the Arabian Gulf: Review // *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences.* – 2015. – Vol. 17. – P. 90-100.

120. Fritsche W., Hofrichter M. Investigation of the bioremediation potential of aerobic zymogenous microorganisms in soil for crude oil biodegradation // *Biotechnology.* – 2008. – Vol. 11. – No. 2. – P. 146-164.

121. Fusconi R., Godinho M.J.L. Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater // *Braz. J. Biol.* – 2002. – Vol. 62. – P. 363-369.

122. Garton N.J., Sutcliffe I.C. Identification of a lipoarabinomannanlike lipoglycan in the actinomycete *Gordonia bronchialis* // *Arch. Microbiol.* – 2006. – Vol. 184. – P. 425–427.

123. Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.C. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium // *Int J Syst Bacteriol.* – 1992. – Vol. 42. – P. 568–576.

124. Ghaly A.E., Yusran A., Dave D. Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on The Degradation of Pyrene in Soil // *J Bioremed Biodeg.* – 2013. – S5:001.

125. Ghazali F.M., Zaliha R.N., Rahman A., Salleh A.B., Basri M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2004. – Vol. 54. – P. 61-67.

126. Ghojavand H., Vahabzadeh F., Mehranian M., Radmehr M., Shahraki A.K., Zolfagharian F., Emadi M.A., Roayaei E. Isolation of thermotolerant halotolerant, facultative

biosurfactant-producing bacteria // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 80. – P. 1073-1085.

127. Gousterova A., Paskaleva D. and Vasileva-Tonkova E. Characterization of Culturable Thermophilic Actinobacteria from Livingston Island, Antarctica // *Int. Res. J. Biological Sci.* – 2014. – Vol. 3. – No. 3. – P. 30-36.

128. Gudiña E.J., Pereira J.F.B., Rodrigues L.R., Coutinho J.A.P., Teixeira J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2012. – Vol. 68. – P. 56-64.

129. Guibert L.M., Loviso C.L., Borglin S., Jansson J.K., Dionisi H.M., Lozada M. Diverse Bacterial Groups Contribute to the Alkane Degradation Potential of Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments // *Microb Ecol.* – 2016. – Vol. 71. – P. 100–112.

130. Guizhou G., Zheng L., Dongfeng Z., Chaocheng Z. Isolation and Characterization of a Thermophilic Oil-Degrading Bacterial Consortium // *China Petroleum Processing and Petrochemical Technology*. – 2013. – Vol. 15. – No. 2. – P. 82-90.

131. Hamamura N., Arp D.J. Isolation and characterization of n-alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8 // *FEMS Microbiol Lett.* – 2000. – Vol. 186. – P. 21–26.

132. Hamed M.M. Screening level modeling of long-term impact of petroleum hydrocarbon contamination on fresh groundwater lenses in the Arabian Gulf Region // *Environmental Modeling and Assessment*. – 2004. – Vol. 9. – P. 253-264.

133. Hamedi J., Mohammadipanah F., Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes // *Extremophiles*. – 2013. – Vol. 17. – P. 1–13.

134. Hao D., Lin J.Q., Song X., Su Y.J., Qu Y.B. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3 // *Biotechnology and Bioprocess Engineering February*. – 2008. – Vol. 13. – No. 1. – P. 61-68.

135. Hao D., Lin J.Q., Song X., Su Y.J., Qu Y.B. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3 // *Biotechnology and Bioprocess Engineering February*. – 2008. – Vol. 13. – No. 1. – P. 61-68.

136. Hashem A.R. Bioremediation of Petroleum Contaminated Soils in the Arabian Gulf Region: A Review // *JKAU: Sci.* – 2007. – Vol. 19. – P. 81-91.

137. Head I.M., Gray N.D., Larter S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – Article 586.

138. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle // *Nat Rev Microbiol.* – 2010. – Vol. 8. – No. 1. – P. 15–25.
139. Högn T., Jaenicke L. Benzene metabolism of *Moraxella* species // *Eu. J. Biochem.* – 1972. – Vol. 30. – P. 369-375.
140. Hommel R.K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms // *Biodegradation.* – 1990. – Vol. 1. – P. 107-119.
141. Hua F., Wang H.Q. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* – 2014. – Vol. 28. – No. 2. – P. 165–175.
142. Hutchins S.R., Sewell G.W., Kovacs D.A., Smith G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions // *Environmental Science and Technology.* – 1991. – Vol. 25. – P. 68–76.
143. Iizuka H., Iida M., Fujita S. Formation of n-decene-1 from n-decane by resting cells of *C. rugosa* // *Z. Allg. Mikrobiol.* – 1969. – Vol. 9. – P. 223-226.
144. Imperio T., Viti C., Marri L. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica) // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2008. – Vol. 58. – No. 1. – P. 221-225.
145. Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Analysis of Genes for Succinoyl Trehalose Lipid Production and Increasing Production in *Rhodococcus* sp. Strain SD-74 // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2013. – Vol. 79. – No. 22. – P. 7082–7090.
146. Iqbal J. Effect of temperature on efficiency of in situ bioremediation technology: A laboratory microcosm and field study // PhD Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. – 2003.
147. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., et al. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 14925–14930
148. Ismail W., Alhamad N.A., El-Sayed W.S., El Nayal A.M., Chiang Y.R., Hamzah R.Y. Bacterial Degradation of the Saturate Fraction of Arabian Light Crude oil: Biosurfactant Production and the Effect of ZnO Nanoparticles // *J Pet Environ Biotechnol.* – 2013. – Vol. 4. – No. 6. – P. 163-174.
149. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Plekhov O.A., Naimark O.B., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I. Biosurfactant-enhanced immobilization of hydrocarbon-

oxidizing *Rhodococcus ruber* on sawdust // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97. – No. 12. – P. 5315-5327.

150. Iwahori K., Tokutomi T., Miyata N., Fujita M. Formation of stable foam by the cells and culture supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae* // *J. Biosci. Bioeng.* – 2001. – Vol. 92. – P. 77–79.

151. 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. – Vol. 7. – P. 885–895.

152. Jaekel U., Zedelius J., Wilkes H., Musat F. Anaerobic degradation of cyclohexane by sulfate-reducing bacteria from hydrocarbon-contaminated marine sediments // *Frontiers in Microbiology.* – 2015. – Vol. 6. – Article 116.

153. Javaheri M., Jenneman G.E., McInerney M.J., Knapp R.M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2 // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1985. – Vol. 50. – P. 698-700.

154. Jenneman G.E., McInerney M.J., Knapp R.M., Clark J.B., Feero J.M., Revus D.E. A halotolerant, biosurfactant producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery // *Developments in Industrial Microbiology.* – 1983. – Vol. 24. – P. 485-492.

155. Joanneau Y., Meyer C., Duraffourg N. Dihydroxylation of four- and five-ring aromatic hydrocarbons by the naphthalene dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1 // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100. – P. 1253-1263.

156. Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil // *Environ Pollut.* – 2005. – Vol. 133. – P. 71–84.

157. Kaczorek E., Bielicka-Daszkiwicz K., Héberger K., Sándor K., Olszanowski A., Voelkel A. Best conditions for biodegradation of diesel oil by chemometric tools // *Brazilian Journal of Microbiology.* – 2014. – Vol. 45. – No. 1. – P. 117-126.

158. Kaplan C.W., Kitts C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 1777-1786.

159. Kapley A., Purohit H.J., Chhatre S., Shanker R., Chakrabarti T., Khanna P. Osmotolerance and hydrocarbon degradation by a genetically modified microbial consortium // *Bioresour Technol.* – 1999. – Vol. 67. – P. 241–245.

160. Karthikeyan R., Bhandari A. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: A review // *Journal of Hazardous Substance Research.* – 2001. – Vol. 3. – P. 1-19.

161. Kato T. Isolation and characterization of thermophilic and psychrophilic bacteria from oil fields // Department of Material and Life Science Graduate School of Engineering Osaka University, Japan. – 2001.
162. Kelley L., Freeman J. P., Cerniglia C. E. 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. // *Biodegradation*. – 1990. – Vol. 1. – P. 283–290.
163. Kenworthy W.J., Durako M.J., Fatemy S.M.R., Valavi H., Thayer G.W. Ecology of Seagrasses in Northeastern Saudi Arabia one year after the Gulf War Oil Spill // *Marine Pollution Bulletin*. – 1993. – Vol. 27. – P. 3-222.
164. Khan N.Y., Al-Ajmi D. Post-war imperatives for the sustainable management of the Gulf ecosystem // *Environ Int*. – 1998. – Vol. 24. – P. 239–248.
165. Kim J., Roh S.W., Bae J.W. Draft genome sequence of *Dietzia alimentaria* 72T, belonging to the family Dietziaceae, isolated from a traditional Korean food // *J Bacteriol*. – 2011. – Vol. 193. – No. 23. – P. 6791.
166. Kim S.J., Choi D.H., Sim D.S. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand // *Chemosphere*. – 2005. – Vol. 59. – No. 6. – P. 845–852.
167. Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer // *Appl Environ Microbiol*. – 2002. – Vol. 68. – P. 1516–1523.
168. Kohring G.W., Rogers J.E., Wiegel J. Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at different temperatures // *Appl Environ Microbiol*. – 1989. – Vol. 55. – P. 348–353.
169. Komukai-Nakamura S.K., Yamauchi T.H., Inomata Y., Venkateswaran K., Yamamoto T.H.S., Harayama S. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil // *J. Ferment. Bioeng*. – 1996. – Vol. 82. – P. 570-574.
170. Korda A., Santas P., Tenente A., Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1997. – Vol. 48. – No. 6. – P. 677–686.
171. Kostecki P.T. Assessments and Remediation of Oil Contaminated Soils // Taylor & Francis, 1999 г. – 400 pages.
172. Krishna Vangala, Ohoud Jimaan Mohd, Mansour Al-Khareji. Design of Remediation Program for Soils Impacted with Landmines, Weathered Crude, Salt and Effluent // 20th International Petroleum & Environmental Conference San Antonio, TX Nov 12-14, 2013

173. Kügler J.H., Le Roes-Hill M., Syltatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class Actinobacteria // *Front Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 212-220.
174. Kulakov L.A., Chen S., Allen C.C.R., Larkin M.J. Web-Type Evolution of Rhodococcus Gene Clusters Associated with Utilization of Naphthalene // *Applied and environmental microbiology.* – 2005. – Vol. 71. – No. 4. – P. 1754–1764.
175. Kumar M., Leon V., de Sisto Materano A., Ilzins O.A. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2007. – Vol. 23. – P. 211-220.
176. Kumar M., Leon V., De Sisto Materano A., Ilzins O.A., Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 1047-1057.
177. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Baeva T.A., Kochina O.A., Gein S.V., Chereshev V.A. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities // *New Biotechnology.* – 2015. – Vol. 32. – No. 6. – P. 559-566.
178. Lagenhoff A., Zehnder A., Schraa G. Behavior of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment column // *Biodegradation.* – 1996. – Vol. 7. – P. 267–274.
179. Larkin M.J., Allen C.C.R., Kulakov L.A., Lipscomb D.A. Purification and Characterization of a Novel Naphthalene Dioxygenase from *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB12038 // *Journal of Bacteriology.* – 1999. – Vol. 181. – No. 19. – P. 6200-6204.
180. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. Biodegradation and *Rhodococcus* masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 282-290.
181. Lee K., Merlin F.X. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines // *Pure Appl Chem.* – 1999. – Vol. 71. – P. 161–171.
182. Lee K., Park J.W., Ahn I.S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 // *J Hazard Mater.* – 2003. – Vol. 105. – No. 1. – P. 157-67.
183. Lee M., Kim M.K., Singleton I., Goodfellow M., Lee S.T. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid // *Journal of Applied Microbiology.* – 2006. – Vol. 100. – P. 325–333.
184. Lee S.K., Lee S.B. Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – Vol. 56. – P. 270-275.

185. Li C., Zhou Z.X., Jia X.Q., Chen Y., Liu J., Wen J.P. Biodegradation of Crude Oil by a Newly Isolated Strain *Rhodococcus* sp. JZX-01 // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – Vol. 171. – No. 7. – P. 1715-1725.
186. Li L., Liu X., Yang W., Xu F., Wang W., Feng L., Bartlam M., Wang L., Rao Z. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase // *J Mol Biol.* – 2008. – Vol. 376. – No. 2. – P. 453-465.
187. Li P., Sun T., Stagnitti F., Zhang C., Zhang H., Xiong X., Allinson G., Ma X., Allinson M. Field-Scale Bioremediation of Soil Contaminated with Crude Oil // *Environmental Engineering Science.* – 2002. – Vol. 19. – No. 5.
188. Li S.G., Tang Y.Q., Nie Y., Cai M., Wu X.L. Complete Genome Sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1, a Crude Oil-Degrading Bacterium from Oil-Polluted Saline Soil // *J Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193. – No. 11. – P. 2894–2895.
189. Liebeg E.W., Cutright T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 1999. – Vol. 44. – P. 55-64
190. Lin C.L., Shen F.T., Tan C.C., Huang C.C., Chen B.Y., Arun A.B., Young C.C. Characterization of *Gordonia* sp. strain CC-NAPH129-6 capable of naphthalene degradation // *Microbiol Res.* – 2012. – Vol. 167. – No. 7. – P. 395-404.
191. Lin T.C., Chang J.S., Young C.C. Exopolysaccharides produced by *Gordonia alkanivorans* enhance bacterial degradation activity for diesel // *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol. 30. – P. 1201-1206.
192. Lin T.C., Young C.C., Ho M.J., Yeh M.S., Chou C.L., Wei Y.H., Chang J.S. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates // *J Biosci Bioeng.* – 2005. – Vol. 99. – P. 466-472.
193. Lincoln S.A., Hamilton T.L., Valladares Juárez A.G., Schedler M., Macalady J.L., Müller R., Freeman K.H. Draft Genome Sequence of the Piezotolerant and Crude Oil-Degrading Bacterium *Rhodococcus qingshengii* Strain TUHH-12 // *Genome Announc.* – 2015. – Vol. 3. – No. 2. – P. 00268-15.
194. Liu C., Wang W., Wu Y., Zhou Z., Lai Q., Shao Z. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5 // *Environ Microbiol.* – 2011. – Vol. 13. – No. 5. – P. 1168-1178.

195. Liu J.F., Mbadanga S.M., Yang S.Z., Gu J.D., Mu B.Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 4814-4837.
196. Lo Piccolo L., De Pasquale C., Fodale R., Puglia A.M., Quatrini P. Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – Vol. 77. – No. 4. – P. 1204-1213.
197. Lovely D.R. Potential of anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers // *J Ind Microbiol Biotechnol.* – 1997. – Vol. 18. – P. 75–81.
198. Luna-Velasco M.A., Esparza-Garcia F., Canizares-Villanueva R.O., Rodriguez-Vasquez R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. // *Process Biochem.* – 2007. – Vol. 42. – P. 310–314.
199. Lyles C.N., Le H.M., Beasley W.H., McInerney M.J., Suflita J.M. Anaerobic hydrocarbon and fatty acid metabolism by syntrophic bacteria and their impact on carbon steel corrosion // *Frontiers in Microbiology.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1-12.
200. Maass D., Todescato D., Moritz D.E., Oliveira J.V.,•Oliveira D., Ulson de Souza A.A., Guelli Souza S.M.A. Desulfurization and denitrogenation of heavy gas oil by *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 // *Bioprocess Biosyst Eng.* – 2015. – Vol. 38. – No. 8. – P. 1447-1453.
201. Maier T., Förster H.H., Asperger O., Hahn U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104 // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2001. – Vol. 286. – No. 3. – P. 652-658.
202. Makkar R.S. Production, Characterization and Applications of Biosurfactants with Special Emphasis to their Synthesis by Extremophiles // PhD thesis, CSIR-IMTECH. Panjab University, Chandigarh. – 1997.
203. Malik Z.A., Ahmed S. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium // *African Journal of Biotechnology.* – 2012. – Vol. 11. – No. 3. – P. 650-658
204. Marchant R., Sharkey F.H., Banat I.M., Rahman T.J., Perfumo A. The degradation of n-hexadecane in soil by thermophilic *Geobacilli* // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – Vol. 56. – P. 44-54.
205. Margesin R., Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 3127-3133.

206. Masy T., David Caterina D., Tromme O., Lavigne B., Thonart P., Hiligsmann S., Nguyen F. Electrical resistivity tomography to monitor enhanced biodegradation of hydrocarbons with *Rhodococcus erythropolis* T902.1 at a pilot scale // *Journal of Contaminant Hydrology*. – 2016. – Vol. 184. – P. 1–13.
207. Matsui T., Namihira T., Mitsuta T., Saeki H. Removal of oil tank bottom sludge by novel biosurfactant, JE1058BS // *J. Jpn. Pet. Inst.* – 2012. – Vol. 55. – P. 138–141.
208. Mueller J.G., Chapman P.J., Pritchard P.H. Action of fluoranthene-utilizing community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – Vol. 55. – P. 3085–3090.
209. Michel J. 1991 Gulf war oil spill / Ed. Fingas M., *Oil Spill Science and Technology*. Elsevier, USA, 2011. P. 1127-1132.
210. Miller J.H. *Experiments in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory. – 1972. – P. 431-433.
211. Mills S.A., Frankenberger Jr W.T. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1994. – Vol. 53. – P. 280-284.
212. Milne, B.J., Baheri, H.R., Hill, G.A. Composting of a heavy oil refinery sludge // *Environmental Progress*. – 1998. – Vol. 1. – P. 24-27.
213. Mitsch W.J. and Gosselink J.G. *Wetlands* // John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2nd edition. – 1993.
214. Mnif S., Chamkha M. and Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – Vol. 107. – P. 785–794
215. Mnif S., Chamkha M., Labat M., Sayadi S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oil field-selected bacteria // *J. Appl. Microbiol.* – 2011. – Vol. 111. – P.525-536
216. Mohr P.W., Krawiec S. Temperature Characteristics and Arrhenius Plots for Nominal Psychrophiles, Mesophiles and Thermophiles // *Journal of General Microbiology*. – 1980. – Vol. 121. – P. 311-317.
217. Morgan P., Watkinson R.J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment // *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. – 1989. – Vol. 4. – P. 305–333.
218. Mueller J.G. et al. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote // *Appl Environ Microbiol.* – 1989. – Vol. 55. – P. 3085-3090.

219. Mulkins-Phillips G.J., Stewart J.E. Effect of environmental parameters on bacterial degradation of Bunker C oil, crude oils, and hydrocarbons // *Appl. Microbiol.* – 1974. – Vol. 28. – P. 915-922.
220. Muller R., Antranikian G., Maloney S., Sharp R. Thermophilic degradation of environmental pollutants // *Biotechnology of Extremophiles: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Antranikian G, ed). – 1998. – P. 155–169.
221. Musovic S., Oregaard G., Kroer N., Sørensen. Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among Gram-positive and Gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere // *Applied Environmental Microbiology.* – 2006. – Vol. 72. – P. 6687-6692.
222. Nakamura F.M., Germano M.G., Tsai S.M. Capacity of Aromatic Compound Degradation by Bacteria from Amazon Dark Earth // *Diversity.* – 2014. – Vol. 6. – P. 339-353.
223. Naser H.A. Testing taxonomic resolution levels for detecting environmental impacts using macrobenthic assemblages in tropical waters // *Environ. Monit. Assess.* – 2010. – Vol. 170. – P. 435–444.
224. Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Grigoryan A.A., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Lysenko A.M., Osipov G.A., Belyaev S.S. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species // *Syst Appl Microbiol.* – 2005. – Vol. 28. – P. 43–53.
225. Neu T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces // *Microbiol. Rev.* – 1996. – Vol. 60. – P. 151-166.
226. Nicolau E., Kuhn L., Marchal R., Jouanneau Y. Proteomic investigation of enzymes involved in 2-ethylhexyl nitrate biodegradation in *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173 // *Research in Microbiology.* – 2009. – Vol. 160. – No. 10. – P. 838-847.
227. Nie Y., Fang H., Li Y., Chi C.Q., Tang Y.Q., Wu X.L. The genome of the moderate halophile *Amycolicococcus subflavus* DQS3-9A1T reveals four alkane hydroxylation systems and provides some clues on the genetic basis for its adaptation to a petroleum environment // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – No. 8. – P. 70986.
228. Nie Y., Liang J., Fang H., Tang Y.Q., Wu X.L. Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain n-alkane degradation // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – Vol. 77. – No. 20. – P. 7279-88.

229. Nie Y., Liang J.L., Fang H., Tang Y.Q., Wu X.L. Characterization of a CYP153 alkane hydroxylase gene in a Gram-positive *Dietzia* sp. DQ12-45-1b and its “team role” with alkW1 in alkane degradation // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2014. – Vol.98. – No.1. – P.163-173.
230. Noordman W.H., Janssen D.B. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 4502-4508.
231. Nwadinigwe A.O., Onyeidu E.G. Bioremediation of Crude Oil-Polluted Soil Using Bacteria and Poultry Manure Monitored through Soybean Productivity // *Pol. J. Environ. Stud.* – 2012. – Vol. 21. – No. 1. – P. 171-176
232. Obuekwe C.O., Badrudeen A.M., Al-Saleh E., Mulder J.L. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress // *Intern. Biodeter. Biodegrad.* – 2005. – Vol. 56. – P. 197–205.
233. Ojeda J.L.G. Oxidation of long-chain n-alkanes by mutants of a thermophilic alkane-degrading bacterium: *Thermus* sp. ATN1 // PhD Thesis. Parral, Mexiko. – 2013.
234. Okoh A.I. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants // *Biotechnology and Molecular Biology Review.* – 2006. – Vol. 1. – No. 2. – P. 38-50.
235. Okolo J.C., Amadi E.N., Odu C.T.I. Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil // *Applied Ecology and Environmental Research.* – 2005. – Vol. 3. – No. 1. – P. 47–53.
236. Okoro C., Agrawal A., Callbeck C. Isolation and characterization of thermotolerant and halotolerant aerobic bacterial that produce biosurfactants and degrade petroleum hydrocarbons from produced water discharge point // *Nature and Science.* – 2012. – Vol. 10. – No. 8. – P. 53-62.
237. Oren A., Gurevich P., Azachi M., Henis Y. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations // *Biodegradation.* – 1992. – Vol. 3. – P. 387–398.
238. Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T., Iwan J., Zarska M., Chorazewski M., Dzida M., Piotrowska-Seget Z. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits // *Journal of Environmental Management.* – 2016. – Vol. 168. – P. 175-184.
239. Pagilla K.R., Sood A., Kim H. *Gordonia (nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production // *Water Sci Technol.* – 2002. – Vol. 46. – No. 1. – P. 519-524.

240. Pandey J., Chauhan A., Jain R.K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation // *FEMS Microbiol Rev.* – 2009. – Vol. 33. – P. 324–375.
241. Pathak A., Green S.G., Ogram A., Chauhan A. Draft Genome Sequence of *Rhodococcus opacus* Strain M213 Shows a Diverse Catabolic Potential // *Genome Announc.* – 2013. – Vol. 1. – No. 1. – P. 144-145.
242. Patowary K., Deka S. Characterization of Biosurfactant during Crude Oil Biodegradation Employing *Pseudomonas* sp. PG1 – A Strain Isolated from Garage Soil // *International Journal of Environmental and Ecological Engineering.* – 2015. – Vol.2. – No. 4.
243. Payne C., Sand P. Gulf War Reparations and the UN Compensation Commission: Environmental Liability // Oxford University Press, 2011. – 392 Pages
244. Peng, F., Liu, Z., Wang, L., Shao, Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol. 102. – P. 1603–1611.
245. Perfumo A., Banat I.M., Canganella F., Marchant R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1 // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – Vol. 72. – P. 132-138.
246. Pirog T., Sofilkanych A., Shevchuk T., Shulyakova M. Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: Synthesis Intensification and Practical Application // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2013. – Vol. 170. – P. 880–894.
247. Pirog T.P., Gritsenko N.A., Konon A.D., Shevchuk T.A., Iutinskaia G.A. Antiadhesive potential of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 biosurfactants // *Mikrobiol Z.* – 2014. – Vol. 76. – No. 6. – P. 19-26.
248. Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanich A.P., Shevchuk T.A., Iutinska G.O. Destruction of oil in the presence of Cu<sup>2+</sup> and surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 // *Microbiol. Z.* – 2015. – Vol. 77. – No. 2. – P. 2-8.
249. Piyadasa H.T.N.I. Marine environment protection from offshore oil and gas: activities in Sri Lanka // *World Maritime University Dissertations.* – 2014. – 185 pages.
250. Pizzul L. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes // Doctoral thesis, Sweden. – 2006.
251. Prabhakaran P., Sureshbabu A., Rajakumar S., Ayyasamy P.M. Bioremediation of Crude Oil in Synthetic Mineral Salts Medium Enriched With Aerobic Bacterial Consortium //

International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. – 2014. – Vol. 3. – No. 2.

252. Procópio L., Alvarez V.M., Jurelevicius D.A., Hansen L., Sørensen S.J., Cardoso J.S., Padula M., Leitao A.C., Seldin L., van Elsas J.D. Insight from the draft genome of *Dietzia cinnamena*P4 reveals mechanisms of survival in complex tropical soil habitats and biotechnology potential // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2012. – Vol. 101. – P. 289-302.

253. Procópio L., de Cassia Pereira e Silva M., van Elsas J.D., Seldin L. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamena* P4 strain // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2013. – Vol. 44. – No. 2. – P. 633-641.

254. Qazi M.A., Malik Z.A., Qureshi G.D., Hameed A., Ahmed S. Yeast Extract as the Most Preferable Substrate for Optimized Biosurfactant Production by *rhIB* Gene Positive *Pseudomonas putida* SOL-10 Isolate // *J Bioremed Biodeg*. – 2013. – Vol. 4. – No. 7.

255. Qu D., Zhao Y., Sun J., Ren H., Zhou R. BTEX biodegradation and its nitrogen removal potential by a newly isolated *Pseudomonas thivervalensis* MAH1 // *Can J Microbiol*. – 2015. – Vol. 61. – No. 9. – P. 691-709.

256. Radwan S.S., Sorkhoh N.A., Fardoun F., Al-Hasan R.H. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 1995. – Vol. 44. – P. 265–270.

257. Radwan, S.S. and Al-Hasan, R.H. Oil pollution and cyanobacteria // *In The Ecology of Cyanobacteria* eds Whitton, B.A. and Potts, M. Hasbrouck heights: Gulf Publishing. – 2000. – Pp. 901-924.

258. Rahman K.S.M., Banat I.M., Thahira J., Thayumanavan T., Lakshmanaperumalsamy P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant // *Bioresour Technol*. – 2002. – Vol. 81. – P. 25-32.

259. Rainey F.A., Klatte S., Kroppenstedt R. M., and Stackebrandt E. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* // *Int. J. Syst. Bacteriol*. – 1995. – Vol. 45. – P. 32-36.

260. Rajaei S., Seyedi S.M., Raiesi F., Shiran B., Raheb J. Characterization and Potentials of Indigenous Oil-Degrading Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of Wild Oat (*Avena Fatua* L.) in South West of Iran // *Iran J Biotech*. – 2013. – Vol. 11. – No. 1. – P. 32-40.

261. Rambeloarisoa E., Rontani F., Giusti G., Duvnjak Z. and Bertrand J. C. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams // *Marine Biology*. – 1984. – Vol. 83. – P. 69-81.
262. Raza C., Bilal A., Jahan N. Evaluation of biodegradation potential of bacteria in crude oil contaminated soil // *Biologia (Pakistan)*. – 2010. – Vol. 56 (1&2). – P. 77-85
263. Reardon K.F., Mosteller D.C., Rogers J.D. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1 // *Biotechnol. Bioengin.* – 2000. – Vol. 69. – P. 385-400.
264. Resnick S.M., Lee K., Gibson D.T. Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816 // *Journal of Industrial Microbiology*. – 1996. – Vol. 17. – No. 5-6. – P. 438-457.
265. Reunamo A. Bacterial community structure and petroleum hydrocarbon degradation in the Baltic sea // PhD Thesis, University of Turku, Finland. – 2015.
266. Rhykerd R.L., Weaver R.W., McInnes K.J. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil // *Environ Pollut.* – 1995. – Vol. 90. – P. 127–130.
267. Ridgeway H.F., Safarik J., Phipps D., Carl P., Clark, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 3565-3575.
268. Rodgers-Vieira E.A. Diversity of biodegradative gene populations in aquatic sediments examined by gene-targeted metagenomics // A Dissertation submitted to the Graduate School-New Brunswick. – 2012.
269. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 11. – No. 10. – P. 2477–2490.
270. Ron E.Z., Rosenberg E. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // *Appl. Microbial. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 52. – P. 154-162.
271. Saeki H., Sasaki M., Komatsu K., Miura A., Matsuda H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058 // *Bioresour. Technol.* – 2009. – Vol. 100. – P. 572–577.
272. Saharan B.S., Sahu R.K., Sharma D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives // *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. – 2011.
273. Sakai Y., Maeng J.H., Tani Y., Kato N. Use of long-chain n-alkanes by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1 // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1994. – Vol. 58. – P. 2128–2130.

274. Sambles C.M., White D.A. Genome Sequence of *Rhodococcus* sp. Strain PML026, a Trehalolipid Biosurfactant Producer and Biodegrader of Oil and Alkanes // *Genome Announc.* – 2015. – Vol. 3. – No. 3. – P. e00433-15.
275. Santos H.F., Carmo F.L., Paes J.E., Rosado A.S., Peixoto R.S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum // *Water, Air, and Soil Pollution.* – 2011. – Vol. 216. – No. 1–4. – P. 329–350.
276. Scheps D., Malca S.H., Hoffmann H., Nestl B.M., Hauer B. Regioselective  $\omega$ -hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666 // *Org Biomol Chem.* – 2011. – Vol. 9. – No. 19. – P. 6727-6733.
277. Schneiker S., dos Santos V.A.P.M., Bartels D., Bekel T., Brecht M., Buhrmester J., Chernikova T.N., Denaro R., Ferrer M., Gertler C., Goesmann A., Golyshina O.V., Kaminski F., Khachane A.N., Lang S., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Nechitaylo T., Pühler A., Regenhardt D., Rupp O., Sabirova J.S., Selbitschka W., Yakimov M.M., Timmis K.N., Vorhölter F.J., Weidner S., Kaiser O., Golyshin P.N. (2006) Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis* // *Nat Biotechnol.* – 2006. – Vol. 24. – No. 8. – P. 997-1004.
278. Schuler L., Agathos S.N. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by two *Sphingomonas* species // In preparation for FEMS Microbial Reviews
279. Shalaby H.M. Refining of Kuwait's heavy crude oil: materials challenges // Workshop on Corrosion and Protection of Metals Arab School for Science and Technology. – December 3-7, 2005, Kuwait.
280. Sharma S.L., Pant A. Crude oil degradation by a marine actinomycete *Rhodococcus* sp. // *Indian Journal of Marine Sciences.* – 2001. – Vol. 30. – P. 146-150.
281. Shen F.T., Lu H.L., Lin J.L., Huang W.S., Arun A.B., Young C.C. Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the *gyrB* gene // *Res. Microbiol.* – 2006. – Vol. 157. – P. 367–375.
282. Shen F.T., Young L.S., Hsieh M.F., Lin S.Y., Young C.C. Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene from *Gordonia* spp. // *Systematic and Applied Microbiology.* – 2010. – Vol. 33. – P. 53–55.
283. Shimura M., Mukerjee G., Kimbara K., Nagato H., Kiyohara H. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene // *FEMS Microbiology Letters.* – 1999. – Vol. 178. – P. 87-93.

284. Shkidchenko A.N., Akhmetov L.I. Autoselection of a stable consortium formed by psychrophilic oil-degrading microorganisms // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2013. – Вып. 3. – С. 310–316.
285. Siegmund I., Wagner F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar // Biotech. Tech. – 1991. – Vol. 5. – P. 265–268.
286. Silva R.F.S., Almeida D.G., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills // Int J Mol Sci. – 2014. – Vol. 15. – No. 7. – P. 12523–12542.
287. Sokolovská I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P., Wattiau P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1 // Appl Environ Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – No. 12. – P. 7019-7027.
288. Sood N., Lal B. Isolation and characterization of a potential paraffin-wax degrading thermophilic bacterial strain *Geobacillus kaustophilus* TERI NSM for application in oil wells with paraffin deposition problems // Chemosphere. – 2008. – Vol. 70. – P. 1445–1451.
289. Sorkhoh N.A., Ghannoum M.A., Ibrahim A.S., Stretton R.J., Radwan S.S. Crude Oil and Hydrocarbon-Degrading Strains of *Rhodococcus rhodochrous* Isolated from Soil and Marine Environments in Kuwait // Environ Pollut. – 1990a. – Vol. 65. – No. 1. – P. 1-17.
290. Sorkhoh N.A., Ghannoum M.A., Ibrahim A.S., Stretton R.J., Radwan S.S. Sterols and diacylglycerophosphocholines in the lipids of the hydrocarbon-utilizing prokaryote *Rhodococcus rhodochrous* // Journal of Appl Bacteriol. – 1990b. – Vol. 69. – P. 856-863.
291. Sorkhoh N.A., Ibrahim A.S., Ghannoum M.A., Radwan S.S. High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert // App. Microbiol Biotechnol. – 1993. – Vol. 39. – P. 123–126.
292. Stratiev D., Dinkov R., Petkov K., Stanulov K. Evaluation of Crude Oil Quality // Petroleum & Coal. – 2010. – Vol. 52. – No. 1. – P. 35-43.
293. Sugiura K., Ishihara M., Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil // Environ.Sci.Technol. – 1997. – Vol. 31. – P. 45-51.
294. Sutcliffe I.C., Brown A.K., Dover L.G. The Rhodococcal Cell Envelope: Composition, Organisation and Biosynthesis // H.M. Alvarez (ed.), Biology of *Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2010.
295. Suthersan S.S. In situ bioremediation // Remediation engineering: design concepts. Ed. Suthan S. Suthersan. Boca Raton. – 1999.

296. Takei D., Washio K., Morikawa M. Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane // *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol. 30. – P. 1447-1452.
297. Táncsics A., Benedek T., Farkas M., Máthé I., Márialigeti K., Szoboszlay S., Kukolya J., Kriszt B. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA-DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii* // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2014. – Vol. 64. – No. 1. – P. 298-301.
298. Tanee, F.B.G., Albert, E. Biostimulation Potential of Sawdust on Soil Parameters and Cassava (*Manihot esculenta*; Crantz) Yields in Crude Oil Polluted Tropical Soil // *Advances in Environmental Biology.* – 2011. – Vol. 5. – No. 5. – P. 938-945.
299. Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 917–925.
300. Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection // *Environ Microbiol.* – 2005a. – Vol. 7. – P. 909–915.
301. Thomson J.M., Gaucher E.A., Burgan M.F., De Kee D.W., Li T., Aris J.P., Benner S.A. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast // *Nat Genet.* – 2005. – Vol. 37. – P. 630–635.
302. Tolosa I., de Mora S.J., Fowler S.W., Villeneuve J.-P., Bartocci J., Cattini C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman // *Mar. Pollut. Bull.* – 2005. – Vol. 50. – P. 1619–1633.
303. Tsapralis H. Properties of Dilbit and Conventional Crude Oils // *Alberta Innovates – Technology Futures.* – 2014. – 93 pages.
304. Tuleva B., Christova N., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // *J. of App. Microbiol.* – 2008 – V. 104. – P. 1703–1710.
305. Uz I., Duan Y.P., Ogram A. Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213 // *FEMS Microbiol Lett.* – 2000. – Vol. 185. – P. 231-238.
306. van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2007. – Vol. 74. – No. 1. – P. 13-21.
307. van Beilen J.B., Funhoff E.G., van Loon A., Just A., Kaysser L., Bouza M., Holtackers R., Rothlisberger M., Li Z., 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. – Vol. 72. – No. 1. – P. 59-65.

308. van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment // *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP.* – 2003. – Vol. 58. – No. 4. – P. 427-440.

309. van Beilen J.B., Panke S., Lucchini S., Franchini A.G., Rothlisberger M., Witholt B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – No. 6. – P. 1621–1630.

310. van Beilen J.B., Wubbolts M.G., Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans* // *Biodegradation.* – 1994. – Vol. 5. – No. 3-4. – P. 161–174.

311. van Beilen J.B., Wubbolts M.G., Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans* // *Biodegradation.* – 1994. – Vol. 5. – No. 3-4. – P. 161–174.

312. Van Hamme J. D., Ajay Singh and Owen P. Ward. Recent Advances in Petroleum Microbiology // *Microbiology and molecular biology reviews.* – 2003. – Vol. 67. – No. 4. – P. 503–549

313. van Hamme J.D., Ward O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them // *Appl Environ Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 4874–4879.

314. Varuntanya, C.P., Hornsby, M, Chemburkar, A, and Bozzelli, J.W. Thermal Desorption of Hazardous and Toxic Organic Compounds from Soil Matrices // In: Calabrese, E.J. and KostECKI, P.T. (Editors). *Petroleum Contaminated Sites: Volume 2.* Lewis Publishers, Chelsea, MI. 64. – 1989.

315. Veazey M.V. Phantom chlorides create real problems for refiners // *Materials Performance* – 2002. – Vol. 41. – No. 5. – P. 16.

316. Veerasingam S., Vethamony P., Mani Murali R., Babu, M.T. Sources, Vertical Fluxes and Accumulation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments from the Mandovi Estuary, west Coast of India // *Int. J. Environ. Res.* – 2015. – Vol. 9. – No. 1. – P. 179-186.

317. Velioğlu Z., Ozturk Urek R. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems // *Turk J Biol.* – 2015. – Vol. 39. – P. 160-166.

318. Viggor S., Jõesaar M., Vedler E., Kiiker R., Pärnpuu L., Heinaru A. Occurrence of diverse alkane hydroxylase alkB genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water // *Marine Pollution Bulletin.* – 2015. – Vol. 101. – No. 2. – P. 507-516.

319. Vogel T.M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach // *Curr Opin Biotechnol.* – 1996. – Vol. 7. – P. 311–316.
320. von der Weid I., Marques J.M., Cunha C.D., Lippi R.K., Dos Santos S.C., Rosado A.S., Lins U., Seldin L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil // *Syst Appl Microbiol.* – 2007. – Vol. 30. – P. 331-339.
321. Vyas T. K., Dave B. P. Production of biosurfactant by *Nocardia otitidiscaviarum* and its role in biodegradation of crude oil // *Int. J. Environ. Sci. Tech.* – 2011. – Vol. 8. – No. 2. – P. 425-432.
322. Walker, J.D., Petrakis L., Colwell R.R. Comparison of the biodegradability of crude and fuel oils // *Can. J. Microbiol.* – 1976. – Vol. 22. – P. 598-602.
323. Wang L., Tang Y., Wang S., Liu R.L., Liu M.Z., Zhang Y., Liang F.L., Feng L. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes // *Extremophiles.* – 2006. – Vol. 10. – P. 347–356.
324. Wang Y.N., Cai H., Chi C.Q., Lu A.H., Lin X.G., Jiang Z.F., Wu X.L. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2007. – Vol. 57. – P. 1222–1226.
325. Wang Y.N., Chi C.Q., Cai M., Lou Z.Y., Tang Y.Q., Zhi X.Y. et al. *Amycolicoccus subflavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol.60. – P. 638-643
326. Ward D.M., Brock T.D. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes // *Appl Environ Microbiol.* – 1976. – Vol. 31. – P. 764–772.
327. Ward D.M., Brock T.D. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments // *Appl Environ Microbiol.* – 1978. – Vol. 35. – P. 353–359.
328. Weber W.J., Corseuil H.X. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates // *Wat. Res.* – 1994. – Vol. 28. – P. 1407-1414.
329. Westlake D.W.S., Jobson A.M., Cook F.D. In situ degradation of oil in a soil of the boreal region of the Northwest Territories // *Can. J. Microbiol.* – 1978. – Vol. 24. – P. 254-260.

330. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026 // *J Appl Microbiol.* – 2013. – Vol. 115. – No. 3. – P. 744-755.
331. Whyte L.G., Jalal H., 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. – Vol. 64. – P. 2578-2584.
332. Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbe 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 // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – No. 12. – P. 5933–5942.
333. Widdel F., Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons // *Curr Opin Biotechnol.* – 2001. – Vol. 12. – P. 259–276.
334. Williams J. Bioremediation of modelled petroleum-contaminated soils of the Niger Delta and the impact of zeolite augmentation // Thesis in partial fulfilment of the requirements of the Wolverhampton University for the degree of Master of Philosophy. – 2014.
335. Wong J.W.C., Zhenyong Z., Guanyu Z. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 Enhance the Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons // *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy.* – 2010. – Vol. 15. – Article 5.
336. Wu L., Richnow H., Yao J., Jain A. An efficient thermotolerant and halophilic biosurfactant-producing bacterium isolated from Dagang oil field for MEOR application // *Geophysical Research Abstracts.* – 2014. – Vol. 16. – EGU2014-3508.
337. Wu Q., Bedard D.L., Wiegel J. Influence of incubation temperature on the microbial reductive dechlorination of 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in two freshwater sediments // *Appl Environ Microbiol.* – 1996. – Vol. 62. – P. 4174–4179.
338. Xue Y., Sun X., Zhou P., Liu R., Liang F., Ma Y. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2003. – Vol. 53. – P. 1643-1646.
339. Yakimov M.M., Amro M.M., Bock M., Boseker K., Fredrickson H.L., Kessel D.G., Timmis K.N. The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery // *Journal of Petroleum Science and Engineering.* – 1997. – Vol. 18. – P. 147-160.
340. Yakimov M.M., Timmis K.N., Wray V., Fredrickson H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – P. 1706-1713.

341. Yakubu M. B. Biodegradation of Lagoma crude oil using pig dung // *Afri. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 6. – P. 2821-2825.
342. Young C.C., Lin T.C., Yeh M.S., Shen F.T., Chang J.S. Identification and kinetic characteristics of an indigenous diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* strain // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* – 2005. – Vol. 21. – P. 1409-1414.
343. Zamanian M., Mason J.R. Benzene dioxygenase in *Pseudomonas putida*. Subunit composition and immuno-cross-reactivity with other aromatic dioxygenases // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 244. – P. 611-616.
344. Zampolli J., Collina E., Lasagni M., Di Gennaro P. Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism // *AMB Express.* – 2014. – Vol. 4. – P. 73-82.
345. Zaragoza A., Teruel J.A., Aranda F.J., Ortiz A. Interaction of a trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 with a secretory phospholipase A2 // *J Colloid Interface Sci.* – 2013. – Vol. 408. – P. 132-137.
346. Zeinali M., Vossoughi M., Ardestani S.K. Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons // *Letters in Applied Microbiology.* – 2007. – Vol. 45. – P. 622-628.
347. Zhao B., Wang H., Mao X., Li R., Zhang Y.J., Tang S., Li W.J. *Halomonas xianhensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil contaminated with crude oil // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2012. – Vol. 62. – P. 173–178.
348. Zhao Y.H., Chen L.Y., Tian Z.J., Sun Y., Liu J.B., Huang L. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS // *Journal of basic Microbiology.* – 2016. – Vol. 56. – No. 2. – P. 184–195.
349. Zhuang W.Q., Tay J.H., Maszenan A.M., Tay S.T.L. *Bacillus naphthovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2002. – Vol. 58. – P. 547-553.
350. ZoBell C. E. Microbial modification of crude oil in the sea // *In Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills.* American Petroleum Institute. – 1969. – P. 317-326.
351. Адилов М.Т., Кубашева У.С., Саданов А.К., Шорабаев Е.Ж., Айтуганов К.А. Способ биологической очистки почв и грунтов от загрязнений нефтью и нефтепродуктами // Патент РК №22556, 2010.

352. Айткельдиева С.А., Тлеулина Ж.А. Состояние проблемы биоремедиации почвенных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Доклады НАН РК. – 2007. - С.120-127.
353. Алексеев А.Ю., Беднаржевский С.С., Забелин В.А., Комкова А.В., Пушкарев Н.С., Рассадкин Ю.Н., Шевченко Н.Г., Шестопапов А.М. 2007, RU 2337069.
354. Аюпова А.Ж., Сарсенова А.С., Молдагулова Л.Б. Отработка оптимальной концентрации внесения концентрированной и сухой форм биопрепарата при различных степенях загрязнения нефтью почвы // Аргіогі. Серия: Естественные и Технические Науки. – 2014. – Т. 6. – С. 1-5.
355. Бабаев Э. Р., Мамедова П. Ш., Кулиева Д. М., Мовсумзаде М. Э. Выбор активного микроорганизма – деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв Балаханского месторождения // Башкирский химический журнал. – 2009. – Т. 16.- № 1. – С. 103-106.
356. Белонин М.Д.; Рогозина Е.А.; Свечина Р.М.; Хотянович А.В.; Орлова Н.А. 1994. RU (11) 2053206 (13) С1.
357. Бишимбаев В.К., Исаева А.У., Успабаева А.А., Рысбаева Г.А., Сапарбекова А.А., Илялетдинов А.Н., Ембердиев А.Ж., Жаркимбеков С.У., Манапова Н.М. Консорциум микроорганизмов «Перойл», используемый для очистки воды и почвы от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Патент РК №14923, 2010.
358. ВРД 39-1.13-056-2002 Технология очистки различных сред и поверхностей, загрязненных углеводородами. – Москва, 2002.
359. Гусев М.В., Минаева Л.А. Микробиология. 4-е изд., стер. – М.: Академия, 2003. 464 с.
360. Идрисова У.Р., Саданов А.К., Мусалдинов Т.Б., Идрисова Д.Ж., Айткельдиева С.А., Ауэзова О.Н. Способ биологической рекультивации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами // Патент РК №30176, 2015.
361. Исаева А.У., Мырхалыков Ж.У., Успабаева А.А., Ешибаев А.А. Особенности разработки биопрепаратов экологического действия для юга Казахстана // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. - №10. – С. 105-107.
362. Казиева А. А., Мелякина Э. И. Сравнительная оценка различных доз биопрепарата для очистки нефтезагрязненных почв // Вестник АГТУ. – 2014. – Т. 58. - №2. – С. 54-58.
363. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. Т. 1. М.: Мир. 1981. – 606 с.

364. Кобзев Е.Н., С.Б. Петрикевич, А.Н. Шкидченко. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37. - №4. – С. 413-417.

365. Логинова Л.Г., Позмогова И.Н.. Термофильные бактерии // В книге: Жизнь растений. В 6-ти томах. Том 1. Введение. Бактерии и актиномицеты. Под ред. проф. Н. А. Красильникова и проф. А. А. Уранова. – М.: Просвещение. 1974.

366. Мухамбетов Б., Сагындыкова С., Нурлыбеков А., Джангалиева Ж., Нурмуханов Н., Улжабаева А., Саленов Н., Касанова Ж. Модельный эксперимент по очистке нефтезагрязненных почв // Успехи современного естествознания. – 2013. – Т. 1. – С. 185-186.

367. Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок / Е.Г. Плотникова [и др.] // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – No. 1. – С. 61-69.

368. Раманкулов Е.М., Молдагулова Н.Б., Сарсенова А.С., Аюпова А.Ж. Биологический препарат для очистки нефтезагрязненных почв // Патент РК №29948, 2015.

369. Раманкулов Е.М., Молдагулова Н.Б., Сарсенова А.С., Аюпова А.Ж. Штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* B12, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №29967, 2014.

370. Раманкулов Е.М., Нурлыбеков К.Н., Нурлыбеков А.Н., Жамангара А.К., Масалимов Ж.К., Апендина Г.С., Туякбаева А.У., Курманбаева А.Б. Биопрепарат “Ойлдест”, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №25751, 2012.

371. Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Препарат «Бакойл-KZ» для очистки почв от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №24879, 2011.

372. Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Курманбаев А.А. Консорциум штаммов *Micrococcus roseus* 34, *Rhodococcus maris* 65 и *Arthrobacter globiformis* 44А, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №21710, 2009.

373. Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Курманбаев А.А., Ауэзова О.Н., Смирнова И.Э., Олейникова Е.А., Галимбаева Р.Ш. Консорциум штаммов *Arthrobacter globiformis* 24, *Arthrobacter terregens* П-1, *Arthrobacter* sp. К-3, *Candida tropicalis* ФС-4 АТ, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №26078, 2012.

374. Саданов А.К., Шорабаев Е.Ж., Чукпарова А.У., Кулжанова К.А. Консорциум штаммов микроорганизмов-деструкторов: *Micrococcus varians* PR69, *Micrococcus roseus* УД6-4, *Bacillus firmus* S20, *Bacillus subtilis* PR28, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов // Патент РК №21686, 2006.
375. Ссылка 1 <http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-8.html>
376. Ссылка 2 <http://www.obg.com/resource-files/SoilSolidificationStabilization.pdf>
377. Ссылка 3 <http://www.uncc.ch/sites/default/files/attachments/documents/r2003-31.pdf>
378. Ссылка 4 [http://www.rlctechnologies.com/sg\\_userfiles/Completed\\_Projects\\_and\\_Case\\_Studies.pdf](http://www.rlctechnologies.com/sg_userfiles/Completed_Projects_and_Case_Studies.pdf)
379. Ссылка 5 <https://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/IEDIndex3.cfm?tid=5&pid=5&aid=2>
380. Страдомская А.Г., Боева Л.Г., Рязанцева И.А. Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом. РД 52.24.476-2007 / Ростов-на-Дону: «Гидрохимический институт», 2007. – 33 с.
381. Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Берзанова Р.Ж. Биопрепарат для очистки от нефти нефтезагрязненных экосистем // Патент KZ 19425, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2010.
382. Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Берзанова Р.Ж., Даутова Д.Б. Микробный препарат для очистки почвогрунтов и нефтешламов // Патент KZ 26078, С 12 N 1/20, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2012.
383. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 38. - №5. – С. 509-512.
384. Яненко А.С.; Аракелян Э.И.; Герасимова Т.В.; Губанова Т.А.; Кирсанов Н.Б.; Казаков А.Г.; Ларикина Г.А.; Полякова И.Н.; Пауков В.Н.; Цыганков Ю.Д. 1993. RU 2039714.