

маркеры являются стабильными и четко воспроизводимыми и позволяют выявить высокий уровень полиморфизма, который может служить основой для идентификации генотипов *A. ursinum* L.

Работа по оценке молекулярно-генетического полиморфизма, а также по тестированию видовой обособленности неясных в систематическом отношении некоторых редких таксонов растений Беларуси с помощью ISSR-маркеров продолжается и поддержана грантом от БРФФИ № Б13-124.

На основании полученных данных сделаны следующие выводы:

- в Беларуси выявлено 2 подвида лука медвежьего;
- данные молекулярно-генетического анализа коррелируют с морфологическими данными, однако требуют дальнейшего анализа;
- ISSR-маркеры являются стабильными и четко воспроизводимыми и позволяют выявить высокий уровень полиморфизма, который может служить основой для идентификации генотипов *A. ursinum* L.;
- особой охране подлежат генотипы, являющие собой морфологический подвид *Allium ursinum* subsp. *ucrainicum* и подвид *Allium ursinum* subsp. *ursinum*, т.к. они являются родительскими формами промежуточных форм.

Литература

1. Интернет-адрес:
<http://redbook.minpriroda.gov.by/plantsinfo.html?id=125>;
2. Stearn, W.T. *Allium* L. In: T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, D.A. Webb (eds.), *Flora Europaea* 5. Cambridge, 1980. – P. 49–69.
3. Червона книга України. Рослинний світ/ за ред. Я.П. Дідуха – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Karpavičienė, B. Distribution of *Allium ursinum* L. in Lithuania / B. Karpavičienė // *Acta Biol. Univ. Daugavp.* – 2006. – Vol. 6, N 1-2. – P.117 – 121.
5. Semagn K, Bjornstad, Ndjondjop MN (2006). An overview of molecular markers for plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (25): 2540–2568.
6. Сулимова Г. Е., Столповский Ю. А. и др. Перспективы и проблемы использования межмикросателлитных ДНК-маркеров (ISSR-маркеров) в систематике и оценке генетического разнообразия domesticiрованных видов животных / Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии: тезисы докладов научной конференции /. – Ростов н/Д: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – 128 с.

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

М. В. Козлова, М. И. Чернявская

Загрязнение природной среды нефтью и нефтепродуктами является актуальной экологической проблемой. Попадание нефти в почву приво-

дит к изменению ее морфологических, физических, физико-химических свойств и негативно влияет на жизнедеятельность всех живых организмов [1;4]. Управление процессами биодegradации должно быть направлено на активизацию природных микробных сообществ и создание оптимальных условий для их существования. К сожалению, наши познания систем, обеспечивающих биологическое разнообразие организмов в стрессовых условиях среды, весьма ограничены. В этом плане весьма перспективными представляются исследования природных микробных сообществ, способных эффективно размножаться в условиях длительных антропогенных нагрузок.

Были изучены 10 штаммов бактерий из коллекции кафедры микробиологии (выделены в 2011 году из загрязненной нефтепродуктами почвы на территории Ливии, Эз-Завия).

Способность утилизировать нефть (1 %) определялась в жидкой минеральной среде М9 [2]. Способность утилизировать нефтепродукты или отдельные их составляющие (алифатические, моноциклические и полициклические ароматические углеводороды) исследовалась на агаризованной среде М9. В результате было выявлено, что нефть в качестве источника углерода использовали 4 штамма, 2 из которых (4А и 3А) характеризовались широким спектром утилизируемых субстратов, относящихся к разным классам углеводородов (алифатические, ароматические и полиароматические). Остальные штаммы не утилизировали нефть и ее составляющие (табл. 1).

Известно, что нефть и нефтепродукты в больших концентрациях губительно влияют на живые организмы. В первую очередь подавляется ферментативная активность почвенной микрофлоры. Большое фенотипическое разнообразие изолированных бактерий, не являющихся деструкторами нефти и ее составляющих, свидетельствовало о наличии у них систем метаболизма, позволяющих им существовать в почве, в которую поступала сложная смесь углеводородов и других органических соединений. Способностью размножаться в подобных стрессовых условиях должны обладать только те микроорганизмы, которые оказывают положительное влияние друг на друга и на среду своего обитания, обеспечивая протекание широкого спектра биохимических реакций. Например, за счет наличия оксидоредуктаз (каталазы, оксидазы, нитрат- и нитритредуктазы и др.) и гидролаз (протеазы, лецитиназы, амилазы, целлюлазы, уреазы, сахаролитические ферменты и др.) в микробной клетке протекают окислительно-восстановительные реакции и расщепляется широкий спектр органических и неорганических субстратов.

Таблица 1

Биодеградативная способность исследованных бактерий

Штаммы		4А	1	3А	3	1А, 4, 2, 5, 8, 10
Субстрат						
Сложные смеси углеводородов	нефть*	+	+	+	+	-
	дизельное топливо	+	-	-	-	-
	керосин	+	-	-	-	-
Алифатические углеводороды	нонан	+	-	+	-	-
	гексан	+	-	+	-	-
	2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан	-	-	+	-	-
	гексадекан	+	-	+	-	-
Моноциклические ароматические углеводороды и их производные	бензол	-	-	+	-	-
	этилбензол	+	-	-	-	-
	толуол	-	-	-	-	-
	о-, м-, п-ксилол	-	-	-	-	-
	камфора	-	-	-	-	-
	фенол	+	-	+	-	-
Полициклические ароматические углеводороды	нафталин	+	-	-	-	-
	антрацен	+	-	+	-	-
	фенантрен	+	-	+	-	-
	флюорен	+	-	-	-	-
	пирен	-	-	+	-	-
	бифенил	+	-	+	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста; «+» – хороший рост до изолированных колоний; * - способность утилизировать нефть в концентрации 1 % оценивалась визуально по разрушению плёнки в жидкой среде М9

Активность ферментов определялась по стандартным методикам [3]. Было установлено, что 8 (80 %) штаммов обладали каталазной активностью (табл. 2) и, следовательно, способны противостоять окислительному стрессу, обезвреживая губительное действие образующейся в процессах окисления перекиси водорода.

Оксидазоположительными (определялась активность цитохром С оксидазы) были 5 (50 %) штаммов (табл. 2). Наличие фермента цитохром С оксидазы в клетке свидетельствует о том, что окислительно-восстановительные реакции протекают с участием кислорода. Хотя отрицательная реакция на оксидазу не является прямым указанием на то, что организм относится к факультативным анаэробам. Например, штамм 4А является строгим аэробом, но оксидазоотрицательный.

Ферментативная активность исследованных бактерий

Фермент	Наличие ферментативной активности у изучаемых штаммов	
	L15 (10 штаммов)	Всего в %
Каталаза	1*, 1А, 4А*, 3*, 3А*, 4, 5, 10	80
Оксидаза	2, 3*, 3А*, 4, 8	50
Нитратредуктаза	1А, 4А*, 3, 3А*, 4, 5, 8, 10	80
Нитритредуктаза	1*, 2, 5	30
Уреаза	1А	10
Образование сероводорода	1*, 3, 4, 8	40
Протеазы	1А, 3*, 10	30
β-Амилаза	1*, 1А, 2, 3А*, 5	50
Целлюлаза	3А*, 8	20
Субстрат	Наличие сахаролитических ферментов, определяющих расщепление с образованием кислоты	
Глюкозы	1*, 1А, 4А*, 3*, 3А* 5	60
Лактозы	-	0
Сахарозы	-	0
Маннозы	3*	10
Маннита	3*	10
Примечание: * - штаммы-деструкторы нефти; жирным шрифтом выделены грамотрицательные бактерии; грамположительные бактерии не выделены		

Все исследованные бактерии вовлечены в круговорот азота за счет продукции нитрат- или нитритредуктаз, а штамм 1А продуцировал уреазу, которая обеспечивает минерализацию органического азота мочевины (табл. 2). В круговороте серы за счет образования сероводорода участвовали 4 штамма (1, 3, 4, 8).

Ряд штаммов утилизировал белки (1А, 3, 10), целлюлозу (8, 3А) и крахмал (1, 1А, 2, 3А, 5). Для шести штаммов (1, 1А, 4А, 3, 3А, 5) была отмечена продукция сахаролитических ферментов, обеспечивающих расщепление глюкозы, маннозы и маннита с образованием кислоты.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что исследуемая природная популяция характеризуется широким спектром ферментативных активностей, обеспечивающих не только деградацию опасных поллютантов, но и круговорот веществ в загрязненной нефтепродуктами почве.

На основании результатов секвенирования генов 16S рНК и случайных фрагментов бактериальной хромосомы штамм 3А был отнесен к виду *Pseudomonas stutzeri*, а штамм 4А – к виду *Rhodococcus pyridinivorans*.

Нефть – смесь, состоящая из множества компонентов. Пути биodeградации отдельных соединений или классов соединений генетически

детерминированы. Одни из наиболее опасных составляющих нефти – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), поскольку они нерастворимы в воде, химически инертны, слабо биodeградебельны, большинство из них обладают мутагенным и канцерогенным действием. Одним из наиболее изученных ПАУ является нафталин.

Была определена генетическая локализация генов биodeградации нафталина у штамма *R. pyridinivorans* 4A. При длительном культивировании в неселективных условиях (т.е. в отсутствии нафталина) данные бактерии теряли способность утилизировать нафталин. Установлено, что бактерии, утратившие способность утилизировать нафталин, не способны также использовать фенантрен в качестве источника углерода. При постановке ПЦР со специфическими праймерами к генам биodeградации нафталина [5] было обнаружено, что при использовании в качестве матрицы тотальной ДНК бактерий, утративших способность утилизировать нафталин, не образуется специфических продуктов амплификации, что являлось дополнительным доказательством в пользу плазмидной локализации генов биodeградации нафталина у бактерий *R. pyridinivorans* 4A. В настоящее время определена полная нуклеотидная последовательность генома у одного из штаммов *R. pyridinivorans* SB3094 (CP006996.1), в клетках которого присутствуют две мегаплазмиды, однако ни одна из них не несет генов биodeградации нафталина. Окончательный вывод о новизне или сходстве исследованных детерминант с известными можно будет сделать после их секвенирования.

Литература

1. Киреева Н.А., Водопьянова В.В., Мифтахова А.М. Влияние нефтяного загрязнения на целлюлазную активность почв // Почвоведение. 2000. № 6. С. 748-753.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике // М.: Мир. 1976.
3. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Учеб. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, 1995.
4. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестник ОГУ. 2009. № 6 (100). С. 642-645.
5. Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M., van Beilen J.B., Calvaca L. Detection of genes for alkane catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN // Environmental Microbiology. 2000. № 2 (5). P. 572-577.

ВОДНАЯ И ПРИБРЕЖНО-ВОДНАЯ РАСТИТЕЛЬНОСТЬ ЛЮБАНСКОГО РАЙОНА

К. Л. Савицкая

Любанский район расположен в юго-восточной части Минской области. Согласно геоморфологическому районированию его территория принадлежит области равнин и низин Предполесья и области Полесской