

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ»

УДК 579.8; 579.222.2:4; 579.252

ЧЕРНЯВСКАЯ МАРИЯ ИВАНОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ  
РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

**Минск, 2016**

Научная работа выполнена в Белорусском государственном университете.

Научный руководитель:

**Титок Марина Алексеевна**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета.

Официальные оппоненты:

**Алещенкова Зинаида Михайловна**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией взаимоотношений микроорганизмов почвы и высших растений Государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

**Беясова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет»

Оппонирующая организация:

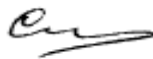
Белорусский научно-исследовательский центр «Экология»

Защита состоится 29 декабря 2016 г. в 12.30 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при Государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2, e-mail: [microbio@mbio.bas-net.by](mailto:microbio@mbio.bas-net.by), тел.: (+375-17) 267-62-09; факс (+375-17) 267-47-66.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан «28» ноября 2016 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций, кандидат биологических наук



Семашко Т.В.

## ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды углеводородами природного и антропогенного происхождения является серьезной экологической проблемой. Данные соединения, имеющие разную химическую природу (алифатические, моноароматические, полиароматические и их производные) попадают в окружающую среду в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также с выхлопными газами автомобилей. Особенно остро данная проблема стоит перед странами, добывающими, транспортирующими и перерабатывающими нефть.

Одним из быстро развивающихся направлений экологической биотехнологии, ставящим перед собой задачу безопасным способом очистить естественную среду обитания от загрязнений природного и антропогенного происхождения, является использование микроорганизмов-деструкторов, способных эффективно разлагать опасные поллютанты, восстанавливая нарушенные биоценозы. В этом плане особый интерес представляют нефтеокисляющие бактерии, поскольку их способность деградировать такую сложную смесь углеводородов и других органических (серо-, азот- и кислородсодержащих) и неорганических (в частности, ионов тяжелых металлов) соединений, многие из которых токсичны, мутагенны и канцерогенны для живых организмов (Хант, 1982), может быть обусловлена либо достаточно широким спектром утилизируемых субстратов, либо устойчивостью к входящим в состав нефти компонентам.

При разработке экологически безопасных технологий возникает проблема, связанная с универсальностью и специфичностью процессов, осуществляемых определенными видами бактерий в разных условиях внешней среды. При этом необходимо учитывать большое количество факторов, способных влиять на процессы жизнедеятельности микроорганизмов и, следовательно, на эффективность их систем метаболизма. Бактерии, адаптированные к стрессовым воздействиям (высокая, низкая температура и влажность, наличие радиации, почвенный покров с отсутствием плодородного слоя, повышенная концентрация солей, кислая и щелочная среда), могут характеризоваться рядом физиолого-биохимических и генетических особенностей, позволяющих использовать их для очистки загрязненных территорий от опасных поллютантов в условиях, далеких от физиологической нормы. В частности, такого типа деструкторы весьма актуальны для стран с экстремальными климатическими условиями.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.** Диссертационная работа выполнялась в рамках подзадания 2.18/1 «Изучение эффективности процесса микробной деградации нефти как основа для создания композиционного биопрепарата» задания 2.18 «Разработать биологические ме-

тоды оценки состояния окружающей среды» (№ госрегистрации 20115015) ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» подпрограммы «Природно-ресурсный потенциал» раздела 2 «Биоразнообразии, биоресурсы и экотехнологии» (2011-2013 гг.); НИР «Экспрессионные векторные системы для молекулярно-генетической диагностики полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде» (договор с БРФФИ № Б12Р-099 от 15.04.2012, № госрегистрации 20122474), выполняемой совместно с Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина (ИБФМ) РАН (г. Пущино, РФ) (2012-2014 гг.); задания 5.2.49 «Оценка эффективности процесса деградации нефти консорциумом нефтеокисляющих бактерий в модельных почвенных системах» (№ госрегистрации 20141809) ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» подпрограммы «Природно-ресурсный потенциал» (2014-2015 гг.); НИР «Сравнительный физиолого-биохимический и генетический анализ бактерий-деструкторов нефти из географически удаленных регионов» (договор с БРФФИ № Б14Р-027 от 23.05.2014, № госрегистрации 20142891), выполняемой совместно с ИБФМ РАН (г. Пущино, РФ) (2014-2016 гг.); задания 1.11 «Создание специализированной коллекции микроорганизмов - деструкторов ксенобиотиков» (№ госрегистрации 20143046) подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь» Межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» (2014-2015 гг.); задания 3.22 «Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих у бактерий образование биосурфактантов и наночастиц металлов» (№ госрегистрации 20161699) подпрограммы «Микробные биотехнологии» ГПНИ «Биотехнологии» (2016-2018 гг.); НИР «Молекулярно-генетический анализ термотолерантных бактерий, способных деградировать нефть при повышенных температурных режимах» (договор с БРФФИ № Б16Р-082 от 20.05.2016, № госрегистрации 20162989), выполняемой совместно с ИБФМ РАН (г. Пущино, РФ) (2016-2018 гг.).

Тема диссертационного исследования соответствует пунктам 3 «Биологические системы и технологии» и 10 «Экология и природопользование» из перечня «Приоритетные направления научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 гг.», утвержденного Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190.

**Цель и задачи исследования.** Цель исследования – отобрать эффективные углеводородокисляющие штаммы бактерий, пригодные для биоремедиации загрязненных территорий в экстремальных условиях внешней среды.

В соответствии с целью решались следующие задачи:

1. Отобрать и идентифицировать углеводородокисляющие бактерии различных климатических зон (Беларусь, Ливия, Ирак, Антарктида), оценить их деградативный потенциал;
2. Охарактеризовать сообщества бактерий, изолированные из отдельных загрязненных образцов почвы и грунта;
3. Провести молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих биodeградацию отдельных углеводов нефти;
4. Оценить деградативный потенциал и особенности генетической организации наиболее эффективного штамма-деструктора путем анализа его генома, нуклеотидная последовательность которого определена с помощью полногеномного секвенирования.

### **Научная новизна.**

Впервые выделены бактерии *Rhodococcus pyridinivorans*, способные утилизировать нафталин. Наличие данного признака обусловлено присутствием в клетках конъюгативной плазмиды, в составе которой локализованы генетические детерминанты «верхнего» и «нижнего» пути деградации нафталина, в том числе, определяющие синтез катехол-2,3-диоксигеназы и гентизат-1,2-диоксигеназы, что обеспечивает возможность плазмидсодержащим бактериям окислять нафталин через катехол и/или гентизат.

Для наиболее активного штамма-деструктора *R. pyridinivorans* 5Ap впервые осуществлен анализ полной нуклеотидной последовательности генома, позволивший выявить генетические системы биodeградации широкого круга ксенобиотиков (в частности, дибензофурана, дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его более токсичного производного 1,1'-дихлор-2,2-бис(п-хлорфенил)этилена (ДДЭ), эфиров фталевой кислоты, хлорированных производных бензола, фенола, циклогексана и др.) и большое количество мобильных генетических элементов (три плазмиды, в том числе одна уникальная, 44 транспозона и четыре уникальных профага).

Штамм *R. pyridinivorans* 5Ap является наиболее эффективным деструктором в микробном консорциуме (*R. pyridinivorans* 5Ap, *Gordonia amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д), способным очищать от нефти песчаные почвы с высоким содержанием NaCl, низкой влажностью и при высокой температуре. Созданная ассоциация может использоваться в качестве основы не имеющего аналогов биопрепарата для ремедиации территорий с жарким засушливым климатом (эффективность деградации нефти (2 %) консорциумом при 45 °С в жидкой среде составила 38,0 % за 14 сут, в почве – 59,0 % за 21 сут).

### **Положения, выносимые на защиту.**

- Отобранные и идентифицированные штаммы нефтеокисляющих бактерий, характеризующиеся устойчивостью к воздействию низких или высоких температур, кислой и щелочной среды, высокой осмолярности, высоких доз электромагнитных излучений, могут служить основой для разработки технологий биоремедиации загрязненных углеводородами территорий с экстремальными условиями внешней среды;

- Впервые описанный нафталинутилизирующий штамм *R. pyridinivorans* 5Ap, выделенный из образца ливийской почвы и эффективно деградирующий нефть при высоких температурных режимах (до 45 °С), пригоден для биоремедиации загрязненных территорий с жарким климатом, в том числе в составе консорциума (*G. amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* 5Ap) для очистки засоленных песчаных почв с низкой влажностью. Для известных консорциумов, составляющих основу рыночных биопрепаратов, подобные свойства не описаны;

- Генетический аппарат наиболее активного штамма-деструктора *R. pyridinivorans* 5Ap представлен хромосомой размером 5 220,4 т.п.н. (содержит 5 053 открытые рамки считывания, детерминирующие синтез полипептидов, в том числе, определяющих деградацию широкого спектра ксенобиотиков; 53 гена тРНК и 12 – рРНК) и мобильными генетическими элементами (три плазмиды, в том числе одна уникальная, 44 транспозона, в том числе уникальные, и четыре уникальных профага, один из которых находится в интактном состоянии).

**Личный вклад соискателя.** Соискателем проанализирована научная литература по теме диссертации, лично получены и систематизированы экспериментальные данные, составляющие основу работы, осуществлен их анализ, обобщение и статистическая обработка, подготовлены публикации. Соавторами опубликованных работ являются сотрудники кафедры микробиологии БГУ, лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН, лабораторий «Коллекция микроорганизмов» и «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси, ГНПО «Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам».

**Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.** Результаты диссертационного исследования были представлены на XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, РФ, 8–13 апреля 2013 г.); I Международной научно-практической конференции «Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций» (к.п. Нарочь, Беларусь, 26-29 мая 2014 г.); The 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2015, Maastricht, The Netherlands, June 7-11, 2015); IX Международной научной

конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, Беларусь, 7-11 сентября 2015 г.); 20-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, РФ, 18-21 апреля 2016 г.); II Международной научно-практической конференции «Природная среда Антарктики: Современное состояние изученности» (к.п. Нарочь, Беларусь, 18-21 мая 2016 г.).

Разработанный консорциум для очистки нефтезагрязненных территорий в регионах с жарким климатом находится на стадии патентования (ПРИЛОЖЕНИЕ А). Штаммы-деструкторы, а также оригинальные данные о системах биodeградации используются в учебном процессе на кафедре микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета (ПРИЛОЖЕНИЯ Б-В).

**Опубликование результатов диссертации.** По результатам диссертационного исследования опубликовано 17 научных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых журналах, 5 статей в материалах Республиканских и Международных конференций, 5 тезисов докладов. Подана 1 заявка на патент Российской Федерации на изобретение. Объем публикаций, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, составляет около 3,0 авторских листов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 7 глав, заключения, списка литературы (в том числе списка использованных источников из 166 наименований на 14 страницах), 3 приложений на 5 страницах. Работа изложена на 152 страницах, включает 31 таблицу на 29 страницах и 20 рисунков на 12 страницах.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе «Обзор литературы» дана характеристика нефти и соединений, входящих в ее состав, описано их влияние на жизнедеятельность живых организмов, рассмотрено разнообразие бактерий – деструкторов нефти, а также генетические системы и метаболические пути, обеспечивающие поступление компонентов нефти и их последующее окисление в клетках микроорганизмов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** В работе использовали образцы почвы и грунта (всего 51 образец), отобранные на территории Ливии, Ирака, Антарктиды; 110 штаммов бактерий – деструкторов углеводов, выделенных ранее на территории Беларуси (коллекция кафедры микробиологии БГУ), а также коллекционные штаммы *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987), *E. coli* BW19851 (Metcaff et al., 1994) и плазмиды pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985), pK18mob (Schäfer et al., 1994), pJET1.2, pTZ57R/T («Thermoscientific», ЕС).

*Среды и растворы.* Для культивирования бактерий использовали среды LB, M9 (Миллер, 1976), Эванса (Evans et al., 1970), Б с 2 % гексадекана (Пирог и др., 2005) и ПДА (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л, агар – 15 г/л, pH 7,0). Изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид («Thermoscientific», ЕС) использовали в концентрации 0,5 ммоль/л и 50 мкг/мл, соответственно. Коммерческие препараты антибиотиков тетрациклина, ампициллина и рифампицина применяли в концентрации от 5 до 100 мкг/мл, канамицина – от 5 до 50 мкг/мл, стрептомицина – от 5 до 200 мкг/мл. В качестве единственного источника углерода использовали нефть (Уфимское месторождение, 0,845 г/см<sup>3</sup>); фенол, дизельное топливо, керосин, гексадекан, гексан, нонан, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан, этилбензол, бензол, толуол, орто-, пара- и мета-ксилолы, нафталин, пиридин; фенантрен, антрацен, бифенил, пирен, флюорен, нафтиламин (0,02 % растворы в трихлорметане); глюкозу, сахарозу, лактозу, ксилозу, мальтозу, целлобиозу, рибозу, арабинозу, сорбит, инозит, маннит, ацетат и цитрат натрия (10 % водные растворы).

*Физиолого-биохимические тесты* проводили согласно стандартным методикам (Методы общей бактериологии, 1984).

*Для определения эффективности биодегградации нефти* остаточную фракцию нефтепродуктов экстрагировали из жидкой среды трихлорметаном (Другов, Родин, 2009) и определяли их концентрацию с использованием флюоресцентной спектроскопии (Гладилович, 2001). Эффективность деградации нефти консорциумом бактерий определяли методом инфракрасной спектроскопии (Другов, Родин, 2009). Статистическую обработку результатов и построение графиков проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

*Способность бактерий продуцировать ПАВ* оценивали с помощью OS-теста (Šipinytė et al., 2011). Выделение сурфактантов бактерий рода *Rhodococcus* осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира (Kuyukina et al., 2001). Для разделения полученного экстракта проводили тонкослойную хроматографию (Кирхнер, 1981) на пластинах, покрытых силикагелем Kieselgel 60 («Merck», ФРГ). Наличие трегалолипидов определяли в реакции с  $\alpha$ -нафтолом (Петриков, 2011).

*Молекулярно-биологические и генетические методы.* Тотальную ДНК выделяли согласно te Reile et al. (1986). Электрофорез ДНК и трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли стандартными методами (Маниатис и др., 1984).

*Инсерционный мутагенез генов narAa и alkB бактерий R. pyridinivorans 5Ap* и конъюгационный перенос плазмиды деградации нафталина в изогенной системе скрещивания осуществляли согласно методам, описанным в работе [7].

При проведении ПЦР использовали реактивы производства «Thermoscientific» (ЕС), ОДО «Праймтех» (РБ) и Института микробиологии НАН Беларуси. В



работе использовали праймеры, обеспечивающие амплификацию генов 16S рРНК (Weisburg et al., 1991), *alkB* (Chenier et al., 2003; Kuhn et al., 2009; Kloos et al., 2006), *nahAc* (Ferrero et al., 2002), *nahG* (Измалкова и др., 2005); *narAa*, *narAb*, *narB* (Andreoni et al., 2000); *rep* IncP-7, *oriV* IncP-9 (Krasowiak et al., 2002); *rpoC* [5], *groEL* [12] и фрагментов генома BOX A1R, (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic et al., 1994). Для амплификации гена *licB* использовали праймеры LicBF (5'-ATC GAA CTG CTT TCA GTC AAA GAG C-3') и LicBR (5'-ACG CTC TCT CAG TTC GGA AAC C-3'); *rep*-генов плазмид бактерий рода *Rhodococcus* - *rep-1F* (5'-TGT CGT GGG ATA AAT CAC ACA ACT CG-3') и *rep-1R* (5'-AGA GCT CAC CTC GCG ACA C-3'), *rep-2F* (5'-TCC ACG GTT CAA CAC TCC GAT CTC-3') и *rep-2R* (5'-TGG ATG AGC ATC GTT AGG CTG C-3').

Выделение плазмидной ДНК, очистку фрагментов ДНК из агарозного геля и секвенирующие реакции проводили с использованием наборов реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit, Agarose Gel Extraction Kit и DNA Cycle Sequencing Kit («Jena Bioscience», ФРГ). Для секвенирующей реакции использовали стандартные праймеры с флуоресцентной меткой (pJET1.2 forward, pJET1.2 reverse, M13 Forward IRDye 800, M13 Reverse IRDye 700). Разделение продуктов секвенирующей реакции в полиакриламидном геле осуществляли с помощью автоматического секвенатора 4300 DNA Analyzer (Li-COR, США). Результаты обрабатывали с помощью программ eSeq Version 3.1 (Li-COR, США), BLASTN2.2.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1990), MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базе данных ГенБанк NCBI под номерами KU740192, KU740193, KU740191, KU886577, KU886578, KU376262, KU740196, KU663051, KU376260, KU886580, KU886579, KU740197, KU664326, KU376261, KU886581, KU740194, KX025126, KX025128, KX025129, KX025130, KU740195, KX002016, KX011136, KX025127, KU740198.

При проведении полногеномного секвенирования использовали набор реактивов Illumina Nextera XT и прибор MiSeq, Illumina. Полученные данные обрабатывали с помощью программ Trimmomatic-0.36 (Bolger et al., 2014), SPAdes-3.8.1 (Bankevich et al., 2012), BLASTN2.2.1, RAST (Aziz et al., 2008) и RASTtk (Brettin et al., 2015) (<http://www.rast.nmpdr.org>), Mauve (Darling et al., 2004), SnapGene Viewer 3.2.1 ([http://www.snapgene.com/products/snapgene\\_viewer/](http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/)). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

### **ОТБОР БАКТЕРИЙ - ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ**

Биологическое разнообразие бактерий, способных утилизировать нефть, целесообразно изучать среди микроорганизмов, выделенных из различных природных источников, характеризующихся диаметрально противоположными климатическими условиями. Можно предположить, что бактерии, способные существо-

вать при высокой, низкой температуре и влажности, повышенной концентрации солей, в кислой и щелочной среде, при высоком уровне радиации, в почвах с отсутствием плодородного слоя, могут характеризоваться рядом физиолого-биохимических и генетических особенностей. Кроме того, среди таких микроорганизмов можно обнаружить эффективные штаммы-деструкторы, пригодные для разработки экологически безопасных технологий очистки загрязненных территорий с экстремальными условиями внешней среды. В результате работы из 51 образца почвы и грунта (отобраны на территории Ливии, Ирака, Антарктиды) и среди ранее выделенных 110 углеводородутилизирующих бактерий (Беларусь) отобрано 17 штаммов - деструкторов нефти и 2 штамма облигатных алканотрофов. Следует отметить, что образцы почвы и грунта, из которых было выделено наибольшее количество штаммов-деструкторов, характеризовались большим разнообразием бактерий (изолировано от 8 до 20 морфотипов). Например, в образце почвы L5A, изолированном на территории Ливии, выявлено 20 морфотипов, представленных грамположительными (7 штаммов) и грамотрицательными (13 штаммов) бактериями, большинство из которых (15 штаммов) деградировали нефть и отдельные углеводороды. Штаммы, не обладавшие деградативными свойствами (всего 5 штаммов) обеспечивали метаболизм углеводов и белков, а также участвовали в круговороте углерода, азота и серы. Большинство изолированных бактерий характеризовалось широким спектром ферментативных активностей.

### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

На основании физиолого-биохимического (определение грамм-принадлежности, образования спор, способности продуцировать каталазу, оксидазу, нитрат- и нитритредуктазу, уреазу, протеазы, амилазы, целлюлазу, сахаролитические и липолитические ферменты, использовать в качестве единственного источника углерода углеводы, спирты, углеводороды и их производные; устойчивости к антибиотикам и ультрафиолетовому облучению) и молекулярно-генетического (рестрикционный анализ и секвенирование генов 16S рРНК, *groC*, *groEL* и случайных фрагментов хромосомы) анализа был установлен таксономический статус 19 штаммов бактерий-деструкторов, 16 из которых были депонированы в специализированную коллекцию микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси) (таблица 1).

Ряд изолированных бактерий характеризовались уникальными свойствами. Например, бактерии *R. pyridinivorans*, выделенные из разных природных источников на территории Беларуси, Ливии и Антарктиды, обладали способностью утилизировать нафталин и, несмотря на сходную генетическую организацию (рисунок 1А), отличались между собой некоторыми физиолого-биохимическими свой-

ствами (диапазоном рН среды, спектром утилизируемых субстратов, эффективностью деградации нефти) (таблицы 1, 2, 3).

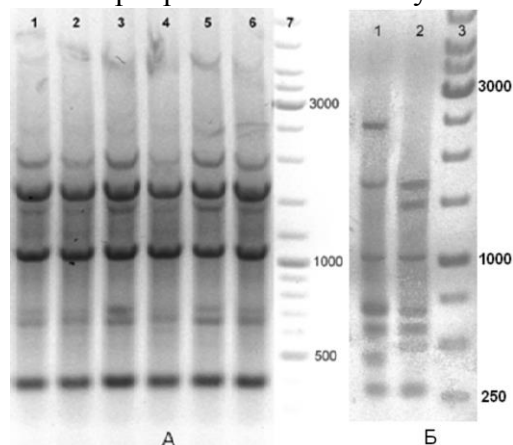
Таблица 1. – Идентификация бактерий-деструкторов

Штамм	№ БИМ*	Секвенированные детерминанты (номер депонирования в ГенБанке NCBI)	Таксономическая принадлежность	Рост при разных значениях			Рост после облучения УФ-светом
				t, °C	рН среды	NaCl, %	
GP1 <sup>1</sup>	В-846 Г	16S рPHK (KU740191), <i>rpoC</i> (KX025128), <i>groEL</i> , <i>yfhM</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>	18-28	5-10	0-3	-
AL18 <sup>1</sup>	В-847 Г	16S рPHK (KU740192,	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	18-45	6-10	0-7	-
5Ap <sup>2</sup>	В-939 Г	KU740193, KU663051,		18-45	6-11	0-7	-
7А-3А-2 <sup>2</sup>	-	KU664326, KU740194),		18-45	6-11	0-7	-
8А-3А <sup>2</sup>	В-835 Г	<i>rpoC</i> (KX025127,		18-45	6-10	0-7	-
15-4А <sup>2</sup>	-	KX025126), <i>alkB</i> , <i>nirB</i>		18-45	6-10	0-7	-
A31-2d <sup>4</sup>	-			18-45	6-10	0-7	-
A2-h2 <sup>4</sup>	В-875 Г	16S рPHK (KU886577),	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	4-28	5-10	0-5	-
A29-k1 <sup>4</sup>	В-986 Г	<i>rpoC</i> (KX025129, KX025130), <i>groEL</i>		4-28	5-12	0-5	-
10-15 <sup>2</sup>	В-876 Г	16S рPHK (KU886581)	<i>Dietzia</i> sp.	28-37	6-12	0-10	-
A2-6 <sup>4</sup>	В-940 Г	16S рPHK (KU886578)	<i>Deinococcus</i> sp.	10-37	6-8	0-3	+
6-3 <sup>2</sup>	В-838 Г	16S рPHK (KU740197)	<i>Bacillus flexus</i>	18-50	6-11	0-5	-
FD9 <sup>3</sup>	В-874 Г	16S рPHK (KX002016), <i>licB</i> (KX011136)	<i>Bacillus licheniformis</i>	28-55	4-12	0-10	-
10-1N <sup>2</sup>	В-941 Г	16S рPHK, <i>cco</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	4-37	4-11	0-7	-
15-3А <sup>2</sup>	В-942 Г	16S рPHK (KU740198), <i>alg</i> , <i>icd</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4-42	5-10	0-5	-
5Ab <sup>2</sup>	В-878 Г	16S рPHK (KU886580,	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	10-42	5-11	0-5	+
L5A-16 <sup>2</sup>	В-877 Г	KU886579)		10-42	5-11	0-5	+
A36-1 <sup>4</sup>	В-989 Г	16S рPHK (KU740195,	<i>Alkanindiges</i> sp.	4-28	5-9	0-3	-
A36-3 <sup>4</sup>	В-990 Г	KU740196)		4-28	5-9	0-3	-

Примечания:

1) штаммы выделены из образцов почвы/грунта, отобранных на территории <sup>1</sup>–Беларуси; <sup>2</sup> – Ливии; <sup>3</sup> – Ирака; <sup>4</sup> – Антарктиды;

2) «\*» – регистрационный номер штамма, депонированного в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси.



**А** – в качестве матрицы использовали тотальную ДНК, выделенную из клеток штаммов *R. pyridinivorans*:

**1** –AL18; **2** –5Ap; **3** –7А-3А-2; **4** –8А-3А; **5** –15-4А; **6** –А31-2d;

**7** – маркер DNA Ladder Mix;

**Б** - в качестве матрицы использовали тотальную ДНК, выделенную из клеток штаммов *R. erythropolis*: **1** –А2-h2, **2** –А29-k1, **3** – маркер 1 kb DNA Ladder.

**Рисунок 1.** – Электрофореграмма продуктов РЕР-ПЦР, полученных с использованием праймера BOX A1R

Из образцов антарктического грунта выделены штаммы *R. erythropolis*, характеризующиеся внутривидовым полиморфизмом (рисунок 1Б, таблицы 1, 2, 3), а также облигатные алканотрофные бактерии с неопределенным видовым статусом (*Alkanindiges* sp.), неспособные расти в отсутствие углеводов (таблицы 1, 2, 3). Из почвенных образцов, отобранных на территории Ливии и Ирака, изолированы штаммы спорообразующих бактерий *B. flexus* и *B. licheniformis*, обладающие практически неограниченными адаптивными возможностями (росли при температуре от 18 до 55 °С, при значениях рН среды от 4 до 12, в присутствии 10 % NaCl), а также бактерии *Dietzia* sp., устойчивые к NaCl в концентрации 10 %, и *P. stutzeri*, растущие при 42 °С (таблица 1). В природных образцах из регионов с повышенной радиацией (Антарктида, Ливия), выявлены бактерии *A. radioresistens* и *Deinococcus* sp., устойчивые к ультрафиолетовому облучению (таблица 1).

### **СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ УТИЛИЗИРОВАТЬ НЕФТЬ И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, ПРОДУЦИРОВАТЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ**

Нефть является сложным химическим соединением, в состав которого входят более 1000 компонентов. Безусловно, отдельно взятые штаммы микроорганизмов не способны утилизировать все ее составляющие. Однако спектр утилизируемых субстратов является важным свойством бактерий-деструкторов, позволяющим оценить их биодegradативный потенциал. Среди исследованных штаммов самым широким спектром утилизируемых субстратов и способностью с высокой эффективностью деградировать нефть характеризовался штамм *R. pyridinivorans* 5Ap. Он утилизировал 21 из 22 изученных соединений (таблица 2) и обеспечивал деградацию более 55 % нефти (начальная концентрация 4 %) при температурах 28-37 °С за 14 сут (таблица 3).

При температуре 4 °С деградацию нефти (4 %) осуществляли бактерии *R. erythropolis* A2-h2 и *R. erythropolis* A29-k1 (за 30 сут утилизировали  $(49,87 \pm 2,81)$  % и  $(6,40 \pm 5,74)$  % нефти соответственно) (таблица 3). Кроме того, бактерии штамма *R. erythropolis* A29-k1 эффективно продуцировали внеклеточные трегалолипиды (0,8 мл/л) двух типов ( $R_f = 0,46$  и  $0,54$ ) при культивировании в минеральной среде Б, содержащей 2 % гексадекана.

Штамм-деструктор *R. pyridinivorans* 5Ap был включен в консорциум (*G. amicalis* ВКМ Ас-2720 Д и *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722), который деградировал 68,0 и 38,0 % нефти за 14 сут в жидкой среде Эванса с 3 % NaCl (таблица 4). В песчаной почве эффективность деградации нефти консорциумом составила 70,0 и 59,0 % за 21 сут при температурах 24 и 45 °С, соответственно (начальная концентрация нефти - 2 %) (таблица 4).

Таблица 2. – Способность бактерий-деструкторов утилизировать нефть и ее КОМПОНЕНТЫ

Штамм	Нефть и НП (3)*	АУ (4)*	МАУ (6)*	ПАУ (6)*	ПУ (3)*	Всего (22)*
<i>R. opacus</i> GP1	3	4	1	3	2	13
<i>R. pyridinivorans</i> AL18	3	3	6	6	2	20
<b><i>R. pyridinivorans</i> 5Ap</b>	3	4	6	6	2	<b>21</b>
<i>A. radioresistens</i> 5Ab	3	1	0	1	0	5
<i>A. radioresistens</i> L5A-16	3	1	0	1	0	5
<i>B. flexus</i> 6-3	3	4	6	4	0	17
<i>R. pyridinivorans</i> 7A-3A-2	3	3	4	6	2	18
<i>R. pyridinivorans</i> 8A-3A	3	3	6	6	2	20
<i>Pseudomonas</i> sp. 10-1N	1	0	1	2	0	3
<i>Dietzia</i> sp. 10-15	3	1	0	0	1	5
<i>P. stutzeri</i> 15-3A	1	4	1	4	1	11
<i>R. pyridinivorans</i> 15-4A	3	3	4	6	2	18
<i>B. licheniformis</i> FD9	1	2	5	0	0	8
<i>R. erythropolis</i> A2-h2	3	4	4	1	1	13
<i>Deinococcus</i> sp. A2-6	1	2	0	0	0	3
<i>R. erythropolis</i> A29-k1	3	3	3	1	1	11
<i>R. pyridinivorans</i> A31-2d	3	3	4	6	2	18
<i>Alkanindiges</i> sp. A36-1	2	1	0	1	0	4
<i>Alkanindiges</i> sp. A36-3	2	1	0	0	0	3

\* - В скобках указано количество изученных субстратов каждого класса: НП – нефтепродукты; АУ – алифатические углеводороды; МАУ – моноциклические ароматические углеводороды; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; ПУ – производные углеводородов (фенол, пиридин, нафтиламин).

Таблица 3. - Эффективность деградации нефти бактериями-деструкторами

Штаммы	Эффективность деградации нефти (%) при температуре, °С		
	4	28	37
<i>R. opacus</i> GP1	0	11,70±0,28	0
<i>R. pyridinivorans</i> AL18	0	26,85±0,07	2,90±0,70
<b><i>R. pyridinivorans</i> 5Ap</b>	0	<b>59,79±8,20</b>	<b>55,56±3,11</b>
<i>R. pyridinivorans</i> 7A-3A-2	0	35,54±0,29	1,30±0,13
<i>R. pyridinivorans</i> 8A-3A	0	22,75±2,48	12,52±2,48
<i>R. pyridinivorans</i> 15-4A	0	2,86±0,14	12,95±0,12
<i>R. pyridinivorans</i> A31-2d	0	33,21±0,27	2,66±0,27
<i>R. erythropolis</i> A2-h2	<b>49,87±2,81</b>	23,81±2,68	0
<i>R. erythropolis</i> A29-k1	6,40±5,74	31,54±5,48	0
<i>Dietzia</i> sp. 10-15	0	12,93±0,81	0
<i>B. flexus</i> 6-3	0	5,30±1,70	3,4±1,4
<i>Deinococcus</i> sp. A2-6	0	6,72±1,53	3,22±3,42
<i>Pseudomonas</i> sp. 10-1N	0	9,4±1,50	2,70±1,30
<i>A. radioresistens</i> 5Ab	0	16,23±6,21	0
<i>A. radioresistens</i> L5A-16	0	19,24±3,33	0

Примечание - Нефть добавляли в концентрации 4 %.

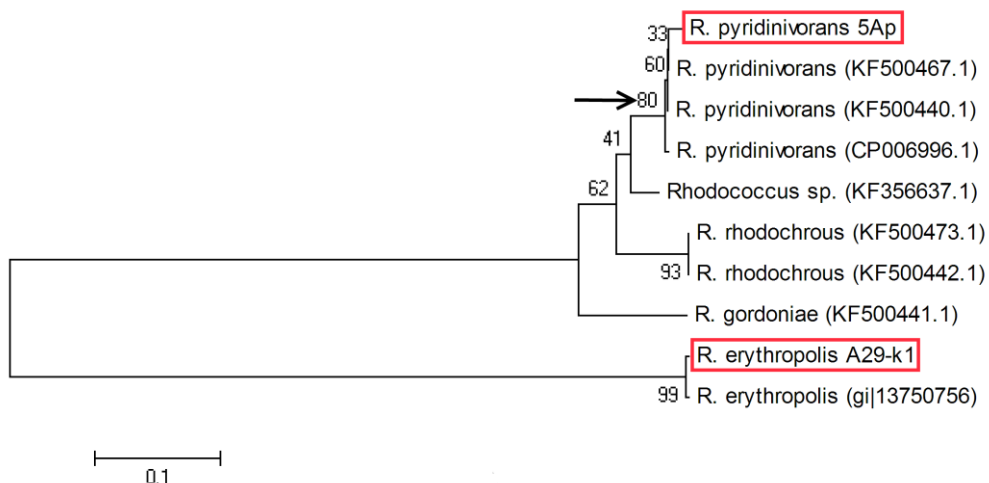
Таблица 4. - Эффективность деградации нефти бактериями-деструкторами

Вносимые бактерии	Эффективность деградации нефти при различных температурах, в %			
	В жидкой среде Эванса*		В песчаной почве**	
	24 °С	45 °С	24 °С	45 °С
<i>G. amicalis</i> ВКМ Ас-2720 Д	58,0±3,9	20,1±1,9	52,5±7,1	40,9±2,7
<i>R. erythropolis</i> ВКМ Ас-2722 Д	15,7±1,9	13,8±1,9	33,8±2,7	31,2±4,9
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ар	26,5±3,0	<b>32,1±4,9</b>	36,5±4,0	<b>44,5±3,6</b>
<b>Консорциум</b>	<b>68,0±4,6</b>	<b>38,0±3,8</b>	<b>70,0±7,1</b>	<b>59,0±4,0</b>
* - с добавлением 3 % NaCl в течение 14 сут;				
** - с добавлением 3 % NaCl в течение 21 сут.				

Примечание - Нефть добавляли в концентрации 2 %.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ ДЕГРАДИРОВАТЬ ОТДЕЛЬНЫЕ УГЛЕВОДОРОДЫ НЕФТИ

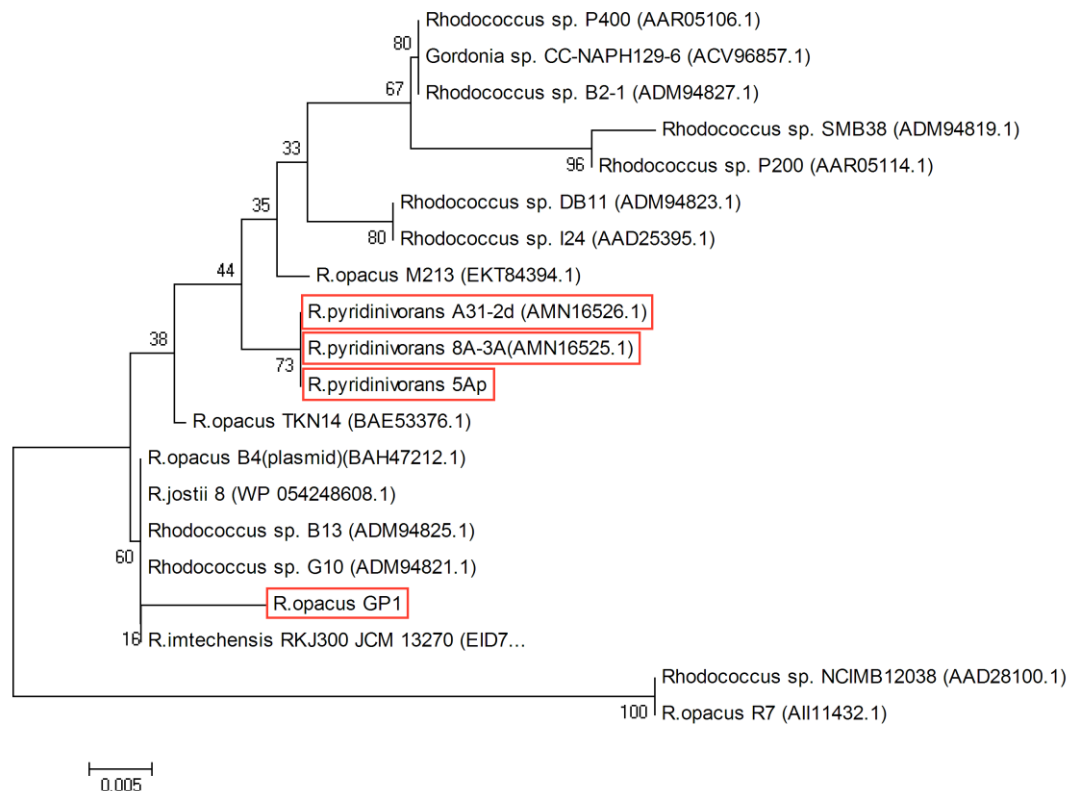
С использованием ПЦР и сиквенс-анализа охарактеризованы гены, кодирующие алкан-1-монооксигеназы в клетках десяти штаммов бактерий-деструкторов. Установлено, что у бактерий *R. pyridinivorans* данные детерминанты характеризовались специфичными нуклеотидными последовательностями, что позволяет их использовать в качестве диагностических маркеров при идентификации (рисунок 2).



Рамкой отмечены изученные штаммы, стрелкой – значение бутстрепа для детерминант *R. pyridinivorans*.  
Рисунок 2. – Филогенетическое древо генов *alkB*

Гены, определяющие деградацию нафталина, выявлены у восьми исследованных штаммов. Для бактерий *R. pyridinivorans* впервые описана способность деградировать нафталин. Показано, что гены, определяющие «верхний» и «нижний» пути деградации ПАУ у данных микроорганизмов, локализованы в составе конъюгативной плазмиды (установлено на основании спонтанной утраты признака утилизации нафталина при культивировании бактерий в неселективной среде, способности Nah<sup>+</sup>-маркера передаваться путем конъюгации с частотой 10<sup>-6</sup> в изогенной системе скрещиваний и, наконец, на основании анализа полногеномного секвенирования).

На основании гомологии нуклеотидных последовательностей генов *narAa*, *narB*, а также аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков, нафталинутилизирующие бактерии *R. pyridinivorans* и *R. opacus* были отнесены к первой филогенетической группе (Kulakov et al., 2005) (рисунок 3).



Рамкой отмечено положение исследованных бактерий.

Рисунок 3. – Филогенетическое древо аминокислотных последовательностей функциональных доменов большой субъединицы нафталиндиоксигеназы *NarAa*

## АНАЛИЗ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ *R. PYRIDINIVORANS 5Ap*

Анализ полной нуклеотидной последовательности генома бактерий *R. pyridinivorans 5Ap* позволил установить, что генетический аппарат данных микроорганизмов представлен хромосомой размером 5 220 443 п.н. и внехромосомными генетическими элементами (три плазмиды, две из которых конъюгативные). В хромосоме выявлено 5 053 открытые рамки считывания, способные кодировать полипептиды, 53 гена тРНК и 12 – рРНК. Отличительной особенностью генома данных микроорганизмов является наличие 4 уникальных профагов и большого количества известных и уникальных мобильных генетических элементов (обнаружено 44 открытые рамки считывания, кодирующие транспозазы и интегразы). В зависимости от выполняемых метаболических функций хромосомные гены (32 % детерминант генома) были объединены в группы (всего 26 групп) и подгруппы (всего 378 подгрупп) (анализ проводили с помощью программы RAST). Наибольшее число исследованных детерминант определяли про-



цессы общего клеточного метаболизма (синтез аминокислот и их производных, углеводов, витаминов, кофакторов, простетических групп и пигментов, белков, жирных кислот и липидов) (рисунок 4).



Рисунок 4. – Функциональная организация генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

В результате первичного анализа в геноме выявлены гены, определяющие биodeградацию дибензофурана, дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его более токсичного производного 1,1'-дихлор-2,2-бис(п-хлорфенил)этилена (ДДЭ), эфиров фталевой кислоты, хлорированных производных бензола, фенола, циклогексана и некоторые др.

Одна из выявленных конъюгативных плазмид содержала гены, определяющие деградацию эфиров фталевой кислоты. Система инициации репликации данной плазмиды (организация *rep*-гена) характерна для многих внехромосомных генетических элементов бактерий рода *Rhodococcus*. Гены, определяющие «верхний» и «нижний» пути деградации нафталина были обнаружены в составе фраг-



ментов плазмидного происхождения. При этом среди генов «нижнего» пути были идентифицированы гены, кодирующие катехол-2,3-диоксигеназу и гентизат-1,2-диоксигеназу, что определяет возможность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать нафталин через катехол и/или гентизат. Анализ генома бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap позволил выявить уникальный внехромосомный генетический элемент, в состав которого входили детерминанты, определяющие систему рестрикции-модификации нового типа, синтез сидерофоров и транспортно-эффлюкс-системы, аминокислотные последовательности которых проявляли низкую гомологию с известными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

Таким образом, в ходе выполнения работы были охарактеризованы нефтеокисляющие бактерии различных климатических зон (Беларусь, Ливия, Ирак и Антарктида), пригодные для биоремедиации загрязненных территорий в стрессовых условиях. На основании полученных результатов можно сделать следующие **выводы**:

1. Из 51 образца почвы и грунта, изолированных на территории Ливии, Ирака и Антарктиды, с использованием метода накопительных культур отобрано 15 штаммов - деструкторов нефти и 2 штамма облигатных алканотрофов. Среди 110 углеводородутилизирующих бактерий (выделены ранее из почв Беларуси) выявлено 2 штамма, способных утилизировать нефть [1-3, 8-9];

2. Образцы почвы и грунта, содержащие отобранные нефтеокисляющие бактерии, характеризовались определенным составом аэробных культивируемых микроорганизмов. В частности, в образце почвы L5A, изолированном на территории Ливии, выявлено 20 разных морфотипов, представленных грамположительными (7 штаммов) и грамотрицательными (13 штаммов) бактериями, большинство из которых (15 штаммов) деградировали нефть и отдельные углеводороды. Штаммы, не обладавшие деградативными свойствами (всего 5 штаммов), способны участвовать в метаболизме углеводов и белков, а также в круговороте углерода, азота и серы. Большинство изолированных бактерий характеризовались широким спектром ферментативных активностей [3, 8];

3. Установлен таксономический статус 19 штаммов бактерий – деструкторов нефти (14 штаммов определены до вида, 5 штаммов – до рода). Из образцов, отобранных на территории всех климатических зон, изолированы генетически однородные бактерии *R. pyridinivorans* (6 штаммов), способные утилизировать нафталин и отличающиеся некоторыми физиолого-биохимическими свойствами (диапазоном pH среды, спектром утилизируемых субстратов, эффективностью деградации нефти). В образцах антарктического грунта выявлены генетически и физиологически разнородные штаммы *R. erythropolis* и облигатно алканотрофные

бактерии *Alkanindiges* sp. Из образцов, отобранных в регионах с жарким климатом, изолированы штаммы спорообразующих бактерий *B. flexus* и *B. licheniformis*, обладающие практически неограниченными адаптивными возможностями (рост при температуре от 18 до 55 °С, pH среды от 4 до 12, 10 % NaCl), а также бактерии *Dietzia* sp., устойчивые к NaCl в концентрации 10 %, и *P. stutzeri*, растущие при 42 °С. В образцах из регионов с повышенной радиацией (Антарктида, Ливия) выявлены *A. radioresistens* и *Deinococcus* sp., устойчивые к ультрафиолетовому облучению [4-5, 9-11, 14-17];

4. Установлено, что штамм *R. pyridinivorans* 5Ap, изолированный из песчаной почвы Ливии, характеризовался самым широким спектром утилизируемых субстратов (21 субстрат из 22 исследованных) и наиболее эффективно деградировал нефть (4 %) при умеренной и повышенной температуре (утилизировал более 55 % нефти за 14 сут). Консорциум (*G. amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* 5Ap), содержащий данный штамм, обеспечивал деградацию нефти (2 %) в песчаной почве с низкой влажностью (10 %) и повышенной концентрацией NaCl (3 %) с эффективностью 70 % и 59 % при умеренной (24 °С) и повышенной (45 °С) температуре, соответственно (за 21 сутки), что позволяет использовать его в качестве основы биопрепарата для удаления нефтяных загрязнений в регионах с жарким засушливым климатом, в условиях повышенной концентрации соли. Подобного типа препараты отсутствуют на рынке [6, 17];

5. Показано, что штамм *R. erythropolis* A2-h2, выделенный из образца антарктического грунта, способный утилизировать 13 углеводородных субстратов (из 22 исследованных), эффективно деградировал нефть (4 %) при температуре 4 °С (за 30 сут утилизировал около 50 % нефти). Выявлены узкоспециализированные бактерии-деструкторы, использующие в качестве источников углерода только короткоцепочечные (штамм *Deinococcus* sp. A2-6) или длинноцепочечные (штаммы *Dietzia* sp.10-15, *Alkanindiges* sp. A36-1 и A36-3) алканы. Для штамма *R. erythropolis* A29-k1 показана способность эффективно продуцировать (0,8 мл/л) внеклеточные трегалолипиды двух типов ( $R_f=0,46$  и  $0,54$ ) [5, 11, 15-17];

6. Установлено, что гены деградации нафталина бактерий *R. pyridinivorans* локализованы на конъюгативной плазмиде. Способность утилизировать нафталин и фенантрен утрачивалась при культивировании бактерий *R. pyridinivorans* в не-селективных условиях. Признак утилизации нафталина передавался путем конъюгации в изогенной системе скрещиваний (исходная плазмида и плазмида, меченная маркером канамицинрезистентности, передавались с частотой  $10^{-6}$ ). На основании полногеномного секвенирования выявлена внехромосомная локализация детерминант, определяющих синтез катехол-2,3-диоксигеназы и гентизат-1,2-диоксигеназы, что свидетельствует о возможности бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать нафталин через катехол и/или гентизат [7, 12-13];

7. Сиквенс-анализ детерминант *narAa*, *narB* и *alkB* позволил отнести бактерий *R. pyridinivorans* (штаммы AL18, 5Ap, 7A-3A-2, 8A-3A, 15-4A, A31-2d) и *R. opacus* (штамм GP1) к первой филогенетической группе нафталинутилизирующих родококков и показал возможность использования гена *alkB* в качестве маркера для идентификации бактерий *R. pyridinivorans* (позволяет отличить их от филогенетически близких *R. rhodochrous*) [12];

8. На основании полногеномного секвенирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap установлено, что геном данных микроорганизмов представлен хромосомой размером около 5 220,4 т.п.н. и внехромосомными генетическими элементами (две конъюгативные плазмиды и одна уникальная неконъюгативная плазида, определяющая синтез сидерофоров и систему рестрикции-модификации нового типа). Отличительной особенностью генома данных микроорганизмов являлось наличие 44 мобильных генетических элементов, в том числе уникальных, и четырех профагов, один из которых находился в интактном состоянии. В геноме выявлены гены, определяющие биodeградацию дибензофурана, хлорированных производных бензола, фенола, циклогексана, дихлордифенилтрихлорметилметана (ДДТ) и его более токсичного производного 1,1'-дихлор-2,2-бис(п-хлорфенил)этилена (ДДЭ), эфиров фталевой кислоты и др. [12].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Изолированные нефтеокисляющие штаммы могут использоваться для деградации нефти и ее компонентов. Выделенные и охарактеризованные бактерии-деструкторы с уникальными физиолого-биохимическими свойствами (депонированы в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси) могут использоваться в качестве основы биопрепаратов для очистки окружающей среды от опасных поллютантов в условиях, далеких от физиологической нормы (повышенная и пониженная температура, высокая радиация, высокая осмолярность, кислая и щелочная среда). Показана возможность использования консорциума (*R. pyridinivorans* 5Ap, *G. amicalis* ВКМ Ас-2720 Д и *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д) для ремедиации загрязненных нефтью территорий в условиях жаркого климата (Заявка на патент РФ №2015143402).

Отобранные бактерии-деструкторы используются при проведении лабораторных занятий к курсу «Экологическая микробиология» (для студентов 3 курса специальности 1-31 01 03 «Микробиология») (Акт №0304/478 от 20.10.2016). Полученные данные включены в лекционный курс «Внехромосомные генетические структуры бактерий» (для студентов 4 курса специальности 1-31 01 03 «Микробиология», специализация «Молекулярная микробиология») (Акт №0304/477 от 20.10.2016).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

### Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Чернявская, М.И.** Первичная характеристика бактерий-деструкторов нефти / **М.И. Чернявская**, А.А. Эльгамуди, М.А. Титок // Вестн. БГУ. Сер.2 – 2012. - №3. – С. 44-49.
2. Микробиологические исследования в районе участка Вечерний оазиса Холмы Тала (Восточная Антарктида) / В. Е. Мямин, Л. В. Никитина, **М. И. Чернявская**, А. А. Занюк, М. А. Титок, С. К. Лозюк, А. В. Сидоренко, Л. Н. Валентович, А. В. Долгих // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2014. – Т. 9, Ч. 2. – С. 58-67.
3. **Чернявская, М. И.** Метаболический потенциал микроорганизмов, выделенных из загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв / **М. И. Чернявская**, М. В. Козлова, М. А. Титок // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2014. – № 3. – С. 33-37.
4. Биодegradативный потенциал и видовой состав бактерий из фонда специализированной коллекции микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / А. В. Сидоренко, **М. И. Чернявская**, Е. М. Глушень, А. С. Самсонова, М. А. Титок, Г. И. Новик, С. П. Синеокий // «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник научных трудов. - Минск: «Беларуская навука», 2015. – Т. 7. – С. 91-101.
5. Бактерии-деструкторы нефти из образцов антарктического грунта / **М. И. Чернявская**, А. А. Занюк, А. В. Сидоренко, Г. И. Новик, М. А. Титок // «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник научных трудов. - Минск: «Беларуская навука», 2015. – Т. 7. – С. 458-471.
6. Термотолерантные актиномицеты как агенты ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях жаркого аридного климата / Я. А. Делеган, А. А. Ветрова, **М. И. Чернявская**, М. А. Титок, А. Е. Филонов // Известия ТулГУ. Естественные науки. - 2015. - Вып. 4. - С. 248-258.
7. **Чернявская, М. И.** Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus* / **М. И. Чернявская** // Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11. – С. 191-198.

### Статьи в материалах конференций и конгрессов:

8. Козлова, М. В. Характеристика бактерий, выделенных из почвы, загрязненной нефтепродуктами / М. В. Козлова, **М. И. Чернявская** // Сборник работ 71-й науч. конф. студентов и аспирантов Белорус. гос. ун-та, Минск, 18–21

мая 2014 г.: в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т ; отв. за вып. А. В. Матюшко. - Минск, 2014. - Ч. 1. – С. 280-284.

9. Выделение бактерий-деструкторов нефти из образцов антарктического грунта / **М. И. Чернявская**, А. А. Занюк, В. Е. Мямин, М. А. Титок // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций : материалы I Междунар. науч.-практ. конф., Нарочь, 26-29 мая 2014 г. / НАН Беларуси, Республиканский центр полярных исследований, Белорус. гос. ун-т ; отв. за вып.: О. И. Бородин, В. Е. Мямин. – Минск, 2014. – С. 256-260.

10. Использование методов геносистематики для идентификации микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / А. В. Сидоренко, **М. И. Чернявская**, М. А. Титок, А. С. Самсонова, Г. И. Новик, С. П. Синеокий // Биотехнология: реальность и перспективы: материалы междунар. науч.-практ. конф., Саратов, 1–3 декабря 2014 г. / Саратов. гос. аграрн. ун-т ; редкол.: Б. И. Древко, Л. В. Карпунина, А. А. Щербаков. – Саратов, 2014. - С. 265–268.

11. Характеристика бактерий – деструкторов углеводов из образцов антарктического грунта / **М. И. Чернявская**, А. А. Букляревич, Я. А. Делеган, А. Е. Филонов, В. Е. Мямин, Ю. Г. Гигиняк, М. А. Титок // Природная среда Антарктики: Современное состояние изученности : материалы II Междунар. науч.-практ. конф., Нарочь, 18-21 мая 2016 г. / НАН Беларуси ; ред. совет.: В. Е. Мямин [и др.] – Минск, 2016. – С. 360-364.

12. **Чернявская, М. И.** Анализ генома бактерий – деструкторов нефти *Rhodococcus pyridinivorans* / **М. И. Чернявская**, Л. Н. Валентович, М. А. Титок // Достижения и проблемы современной науки : материалы XIII Междунар. науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 7 октября 2016 г. / Научный журнал «Globus». - С-П., 2016. – С. 6-9.

#### Тезисы:

13. Деградационные свойства природных бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* AL18 / **М. И. Чернявская**, М. В. Козлова, Н. Е. Сацункевич, А. А. Сечеников // Ломоносов-2013 : тез. докл. XX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология», Москва, 8–13 апреля 2013 г. / МГУ им. М.В.Ломоносова, биол. ф-т ; отв. ред.: Е. Н. Темерова; сост.: Г. В. Кочетова. – Москва, 2013. – С. 219.

14. **Charniauskaya, M. I.** Diversity of oil degrading bacteria from geographically distant regions [Electronic resource] // **М. I. Charniauskaya**, М. А. Titok // 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, Maastricht, June 7-11, 2015 / FEMS. - Maastricht, 2015. – P. 1338. - Mode of access: <http://fems-microbiology.kenes.com/Documents/FEMS%20abstracts.pdf>. – Date of access: 20.09.2015.

15. **Чарняўская, М. І.** Ідэнтыфікацыя вуглевадародакісляючых бактэрыяў з геаграфічна аддаленых рэгіёнаў / **М. І. Чарняўская**, М. А. Ціток // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. IX Междунар. науч. конф., Минск, 7-11 сент. 2015 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси ; отв. за вып.: А. В. Сидоренко. – Минск, 2015. - С. 59-60.

16. Видовое разнообразие и биодegradативный потенциал специализированной коллекции микроорганизмов – деструкторов ксенобиотиков / А. В. Сидоренко, **М. И. Чернявская**, М. А. Титок, Е. М. Глушень, А. С. Самсонова, Г. И. Новик, С. П. Синеокий // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. IX Междунар. науч. конф., Минск, 7-11 сент. 2015 г. / Институт микробиологии НАН Беларуси ; отв. за вып.: А. В. Сидоренко. – Минск, 2015. - С. 49-51.

17. Видовое разнообразие деструкторов нефти из географически удаленных регионов / **М. И. Чернявская**, Я. А. Делеган, А. Е. Филонов, М. А. Титок // «Биология – наука XXI века» : сборник тезисов 20-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 18-22 апреля 2016 г. / Пущинский научный центр РАН, Межфакультетский НОЦ МГУ. – Пущино, 2016. – С. 57-58.

## РЭЗІЮМЭ

Чарняўская Марыя Іванаўна

ПАРАЎНАЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА ВУГЛЕВАДАРОДАКІСЛЯЮЧЫХ  
БАКТЭРЫЙ РОЗНЫХ КЛІМАТЫЧНЫХ ЗОН

**Ключавыя словы:** нафта, вуглеводароды, бактэрыі-дэструктары, гены біядэградацыі, геном.

**Мэта даследавання:** адабраць эфектыўныя вуглеводародакісляючыя штамы бактэрыі, прыдатныя для біярэмедыяцыі забруджаных тэрыторый у экстрэмальных умовах знешняга асяроддзя.

**Метады даследавання:** мікрабіялагічныя, фізіёлага-біяхімічныя, генетычныя, малекулярна-біялагічныя, фізічныя.

**Выкарыстаная апаратура:** спектрафатометр Metertech SP-8001 (Тайвань), флуарэсцэнтны спектрафатометр Cary Eclipse (Agilent Technologies, ЗША), аналізатар нафтапрадуктаў АН-2 (Нафтахімаўтаматыка, РФ), аўтаматычны секвенатар 4300 DNA Analyzer (Li-COR, ЗША) і інш.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** адабраныя нафтаакісляючыя бактэрыі, устойлівыя да стрэсавых фактараў асяроддзя, могуць выкарыстоўвацца для ачысткі забруджаных вуглеводародамі тэрыторый ва ўмовах далёкіх ад фізіялагічнай нормы. Штам-дэструктар *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, які эфектыўна дэградуе нафту пры высокіх тэмпературных рэжымах (да 45 °С), прыдатны для біярэмедыяцыі забруджаных тэрыторый з гарачым кліматам, у тым ліку ў складзе кансорцыюма (*Gordonia amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* 5Ap) для ачысткі засаленых пясчаных глебаў з нізкай вільготнасцю. Генетычны апарат найбольш актыўнага штама-дэструктара *R. pyridinivorans* 5Ap прадстаўлены храмасомай памерам 5 220,4 т.п.н. (утрымлівае 5 053 адкрытыя рамкі счытвання, што дэтэрмінуюць сінтэз поліпептыдаў, у тым ліку, тых, якія вызначаюць дэградацыю шырокага спектра ксенабіётыкаў; 53 гены тРНК і 12 - рРНК) і мабільнымі генетычнымі элементамі (тры плазміды, 44 транспазоны і чатыры унікальныя прафагі).

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** Выдзеленыя і ахарактарызаваныя нафтаакісляючыя бактэрыі могуць выкарыстоўвацца ў выглядзе асобных штамаў і ў складзе кансорцыюмаў для ачысткі тэрыторый ад вуглеводародаў пры розных кліматычных умовах. Адабраныя бактэрыі-дэструктары выкарыстоўваюцца пры правядзенні лабараторных заняткаў да курса “Экалагічная мікрабіялогія” (для студэнтаў 3 курса спецыяльнасці 1-31 01 03 “Мікрабіялогія”) на кафедры мікрабіялогіі БДУ. Атрыманыя дадзеныя ўключаныя ў курс лекцый “Пазахрамасомныя генетычныя структуры бактэрыі” (для студэнтаў 4 курса спецыяльнасці 1-31 01 03 “Мікрабіялогія”, спецыялізацыі “Малекулярная мікрабіялогія”).

**Вобласці выкарыстання:** мікрабіялогія, экалогія, ачыстка навакольнага асяроддзя.

## РЕЗЮМЕ

### Чернявская Мария Ивановна СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

**Ключевые слова:** нефть, углеводороды, бактерии-деструкторы, гены биодegradации, геном.

**Цель исследования:** отобрать эффективные углеводородокисляющие штаммы бактерий, пригодные для биоремедиации загрязненных территорий в экстремальных условиях внешней среды.

**Методы исследования:** микробиологические, физиолого-биохимические, генетические, молекулярно-биологические, физические.

**Использованная аппаратура:** спектрофотометр Metertech SP-8001 (Тайвань), флюоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Agilent Technologies, США), анализатор нефтепродуктов АН-2 (Нефтехимавтоматика, РФ), автоматический секвенатор 4300 DNA Analyzer (Li-COR, США) и др.

**Полученные результаты и их новизна:** отобранные нефтеокисляющие бактерии, устойчивые к стрессовым факторам среды, могут использоваться для очистки загрязненных углеводородами территорий в условиях далеких от физиологической нормы. Штамм *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, эффективно деградирующий нефть при высоких температурных режимах (до 45 °С), пригоден для биоремедиации загрязненных территорий с жарким климатом, в том числе в составе консорциума (*Gordonia amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *R. erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* 5Ap) для очистки засоленных песчаных почв с низкой влажностью. Генетический аппарат наиболее активного штамма-деструктора *R. pyridinivorans* 5Ap представлен хромосомой размером 5 220,4 т.п.н. (содержит 5 053 открытые рамки считывания, детерминирующие синтез полипептидов, в том числе, определяющих деградацию широкого спектра ксенобиотиков; 53 гена тРНК и 12 – рРНК) и мобильными генетическими элементами (три плазмиды, 44 транспозона и четыре уникальных профага).

**Рекомендации по использованию:** Выделенные и охарактеризованные нефтеокисляющие бактерии могут использоваться в виде отдельных штаммов и в составе консорциумов для очистки территорий от углеводородов при различных климатических условиях. Отобранные бактерии-деструкторы используются при проведении лабораторных занятий к курсу «Экологическая микробиология» (для студентов 3 курса специальности 1-31 01 03 «Микробиология») на кафедре микробиологии БГУ. Полученные данные включены в лекционный курс «Внехромосомные генетические структуры бактерий» (для студентов 4 курса специальности 1-31 01 03 «Микробиология», специализация «Молекулярная микробиология»).

**Области применения:** микробиология, экология, очистка окружающей среды.



**ABSTRACT**  
**Maryia Charniauskaya**  
**COMPARATIVE CHARACTERIZATION**  
**OF HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA**  
**OF DIFFERENT CLIMATIC ZONES**

**Key words:** oil, hydrocarbons, oil-degrading bacteria, biodegradation genes, genome.

**Aim of investigation:** to select the effective hydrocarbon-degrading bacterial strains suitable for bioremediation of polluted sites in extreme environmental conditions.

**Methods of investigation:** microbiological, physiological and biochemical, genetic, molecular biological, physical.

**Research equipment:** spectrophotometer Metertech SP-8001 (Taiwan), fluorescence spectrophotometer Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA), analyzer of petroleum products AN-2 (Neftekhimavtomatika, Russia), sequencer 4300 DNA Analyzer (Li-COR, USA) etc.

**Obtained results and their novelty.** The selected oil-degrading bacteria which are resistant to environmental stress can be used for hydrocarbon-polluted sites decontamination in the conditions far from physiological norms. The strain *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap able to degrade oil at high temperatures (up to 45 °C) effectively is suitable for bioremediation of polluted sites in hot climatic conditions, including as a part of community (*Gordonia amicalis* VKM Ac-2720 D, *R. erythropolis* VKM Ac-2722 D, *R. pyridinivorans* 5Ap) designed for decontamination of saline sandy soils with low humidity. The genome of the most effective oil-degrading strain *R. pyridinivorans* 5Ap consists of 5,220.4 kb chromosome (contains 5 053 open reading frames determining synthesis of polypeptide, including pathways of broad range of xenobiotics degradation; 53 tRNA and 12 rRNA genes) and mobile genetic elements (tree plasmids, 44 transposones, four unique prophages).

**Recommendation for application:** Isolated and characterized strains can be used as individual strains and as parts of communities for hydrocarbon-polluted areas decontamination in various climatic conditions. Selected oil-degrading bacteria are used in the laboratory course “Ecological microbiology” (for 3<sup>rd</sup> year students of specialty 1-31 01 03 “Microbiology”) at the Department of Microbiology of BSU. Accepted data are included into lecture course “Extrachromosomal genetics structures of bacteria” (for 4<sup>th</sup> year students of specialty 1-31 01 03 “Microbiology”, specialization “Molecular microbiology”)

**Application areas:** microbiology, ecology, environmental decontamination.

---

Подписано в печать 25.11.2016 Формат 60x84<sub>1/16</sub> Бумага офсетная  
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4  
Тираж 60 экз. Заказ № 2277

ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2  
Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66

E-mail: [pravo-v@tut.by](mailto:pravo-v@tut.by); [pravo642@gmail.com](mailto:pravo642@gmail.com) Отпечатано на издательской системе  
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»

Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное  
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.  
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185