

На правах рукописи

ДЕЛЕГАН ЯНИНА АДАЛЬБЕРТОВНА

**ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ
УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ**

03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2016

Работа выполнена в Пушкинском государственном естественно-научном институте (ПушГЕНИ), на базе лаборатории биологии плазмид Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН, г. Пушкино).

Научный руководитель:

Филонов Андрей Евгеньевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН, доцент ПушГЕНИ

Официальные оппоненты:

Градова Нина Борисовна, доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, г. Москва

Захарченко Наталья Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пушкино

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), г. Пермь

Защита диссертации состоится «01» декабря 2016 г. в 14 часов 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290 Московская область, г. Пушкино, Проспект науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН.

Автореферат размещён на сайте <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан « » 2016г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Кулаковская

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

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 экосистем возможно, однако скорость этого процесса слишком мала и несопоставима с темпами антропогенного загрязнения.

Среди известных методов восстановления нефтезагрязненных грунтов и водных систем наиболее безопасным для окружающей среды является биоремедиация – применение микроорганизмов для утилизации углеводородов. Биоремедиация может быть основана как на стимуляции аборигенной микрофлоры, так и на внесении на загрязненный участок биопрепаратов с подобранными штаммами микроорганизмов.

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 поиск оптимального подхода для решения проблемы нефтяного загрязнения в жарком климате в настоящее время продолжается. В России к регионам с жарким климатом могут быть отнесены Краснодарский и Ставропольский край, Ростовская и Астраханская области. Высокими температурами в летние сезоны отличаются также территории Казахстана и Азербайджана.

Ремедиационные технологии очистки грунтов и водных систем от нефти в жарком аридном климате следует разрабатывать с учетом особенностей такого климата, а именно резких суточных перепадов температур, высоких темпов испарения воды и, как следствие, засоленности и низкой влажности грунта. Эффективность утилизации нефти большинством известных микроорганизмов-деструкторов в таких условиях существенно снижается. Для деструкции нефти в жарком аридном климате перспективным является применение термотолерантных микроорганизмов, для которых такой климат с температурами до 50°C не является стрессовым. Разработка и применение биопрепаратов на основе консорциумов термотолерантных бактерий может стать перспективным решением проблемы нефтяного загрязнения в жарком аридном климате.

При составлении бактериальных консорциумов для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком аридном климате важными параметрами являются способность бактерий утилизировать углеводороды в присутствии соли в среде, катаболическая активность штаммов и их совместимость (Shkidchenko & Akhmetov, 2013), диапазон концентраций загрязнителя и минимально допустимая влажность грунта. Выполненные в ходе данной работы исследования направлены на разработку консорциума термотолерантных бактерий, способных эффективно утилизировать нефть в

грунтах и водных системах в условиях повышенных температур, засоленности, а также при низкой влажности грунта.

Цель и задачи исследования

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* 1В, 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 Nah^+ рекомбинанты штамма *R. erythropolis* Par7).

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 утилизируют 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 утилизирует 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, Obergurgl – 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 Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 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 Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 21-25 апреля 2014; Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014», Тула, 2-3 октября 2014; 6th 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, 14 тезисов, подана 1 заявка на получение патента РФ на изобретение.

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. 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 (Минск, Беларусь).

Среды культивирования. В качестве минеральной среды для культивирования термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов использовали среду Эванса (Evans et al., 1970), в качестве полноценной – среду Лурия-Бертани (ЛБ) (Bertani, 1951).

Культивирование бактерий выполняли в колбах Эрленмейера со 100 мл жидкой среды Эванса и 2% (об/об) источника углерода (нефти, дизельного топлива или гексадекана). Колбы инокулировали клеточной суспензией с посевной дозой 10⁵-10⁶ КОЕ/мл. Затем колбы помещали в термостатируемую качалку (150-180 об/мин), микроорганизмы культивировали при температурах 24, 45, 50°C в течение 3-20 суток в зависимости от цели эксперимента.

Тотальную ДНК бактерий выделяли по протоколу Ausubel et al., 2003.

Очистку ПЦР-продуктов выполняли по протоколу Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymoresearch, USA, 2016).

Проверку стабильности генетических элементов, ответственных за окисление углеводов, и соответствующего признака выполняли путем множественных (до 20) пересевов в неселективных условиях. Наличие/отсутствие генов деструкции углеводов в элиминантах проверяли методом ПЦР.

Электрофорез проводили в горизонтальном агарозном геле по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).

Индекс эмульгирования (E_{24}) определяли по методике (Cooper and Goldenberg, 1987).

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

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 из равного объема пробы. Органический слой отбирали, растворитель удаляли на ротормном испарителе (35°C, 0.2 атм).

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 обнаружения гликолипидов пластины обрабатывали сначала нафтольным реагентом (0.5 г α -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 изучения **деструкции нефти консорциумом в грунте** в стерильный песок вносили NaCl до конечной концентрации 3%, нефть (2%), стерильную жидкую минеральную среду (10%) и бактерии до конечной концентрации 1×10^4 КОЕ/г песка. Эксперимент проводили как с монокультурами, так и с консорциумом штаммов. Для получения консорциума монокультуры выращивали отдельно, затем готовили суспензии монокультур с концентрацией клеток 1×10^4 КОЕ/г и смешивали их в равных соотношениях. Системы рыхлили каждые 3-4 дня. Эксперимент выполняли как при 24°C, так и при 45°C.

Для определения **остаточного содержания углеводов** в пробах использовали метод ИК-спектрофотометрии. Подготовку грунтовых и водных образцов и измерение в них содержания углеводов выполняли в соответствии с протоколами «Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом» (ГОСТ Р 8.563-96) и «Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектрофотометрии» (МУК 4.1.1956-05). Содержание углеводов в экстракте определяли с помощью анализатора нефтепродуктов АН-2 (Россия).

Оценка стабильности консорциума термотолерантных штаммов. Колбы Эрленмейера, содержащие 100 мл среды Эванса, 3% соли и 2% нефти, инокулировали клеточными суспензиями штаммов *Gordonia* sp. 1D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *R. erythropolis* Par7. Посевная доза консорциума составляла 1×10^5 КОЕ/мл. Культивирование выполняли при температурах 24°C

и 45°C в течение 25 суток. Каждые 40 часов отбирали пробы смешанной культуры, выполняли серию разведений и высевали на чашки с агаризованной средой ЛБ для подсчета численности клеток каждого штамма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов и определение их основных ростовых параметров

В условиях жаркого аридного климата с резкими суточными перепадами температур наиболее перспективными агентами ремедиации являются термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы.

Термотолерантные бактерии выделяли из образцов грунта и воды, отобранных в регионах с различными климатическими условиями. Было выделено 86 штаммов-нефтедеструкторов. При селекции путем культивирования при 45°C из них было отобрано 13 термотолерантных культур (Табл. 1), еще 5 термотолерантных штаммов получены из коллекции кафедры микробиологии Белорусского государственного университета (БГУ).

Была сформирована рабочая коллекция штаммов, обладающих необходимой для дальнейшего исследования способностью утилизировать углеводороды при повышенных (до 50°C) температурах. Штаммы утилизировали нефть, а также отдельные её компоненты (линейные и разветвленные алканы, ПАУ) и дизельное топливо.

Таблица 1. Термотолерантные штаммы, выделенные в ходе работы

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

В ходе данной работы автором были сформулированы характеристики термотолерантных бактерий, позволяющие выделить их как промежуточную группу в температурной классификации микроорганизмов, и определены основные отличия термотолерантных культур от мезофильных. В качестве критерия для отнесения бактерий к термотолерантным использовали данные зависимости численности жизнеспособных клеток и удельной скорости роста культур от температуры. Путем исследования зависимости удельной скорости роста от температуры было выявлено, что оптимальный рост термотолерантных бактерий осуществляется при температурах 35-37°C (Рис. 1-Б). Полученные

значения верхней (53°C) и нижней (18°C) границ диапазона роста штаммов показывают, что в условиях нефтезагрязненных полупустынь с резкими суточными перепадами температур термотолерантные бактерии могут быть перспективными деструкторами нефти как при повышенных, так и при умеренных температурах.

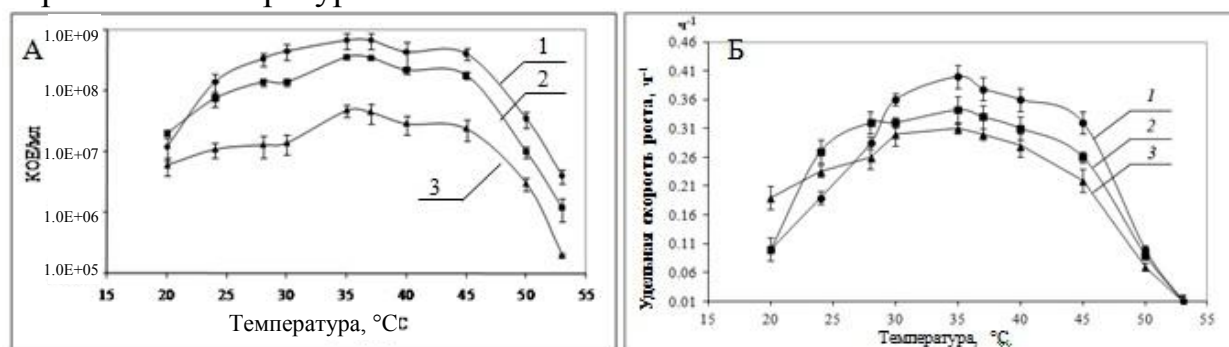


Рис. 1. Зависимости (А) численности жизнеспособных клеток, достигнутой к началу стационарной фазы роста (КОЕ/мл), и (Б) удельной скорости роста (μ , ч^{-1}) термотолерантных штаммов 1D (1), Par7 (2) и 4D (3) от температуры ($^{\circ}\text{C}$).

Как видно из полученных данных (Рис. 1), изучаемые бактерии имеют иные (35-37°C), чем у большинства мезофильных (25-30°C), оптимум и диапазон роста. При температурах 40-45°C параметры роста штаммов (численность клеток к началу стационарной фазы и удельная скорость роста) незначительно отличались от оптимальных.

2. Идентификация и филогенетическая характеристика термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов

Секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК и анализ полученных последовательностей показали, что выделенные в данной работе 13 термотолерантных штаммов являются представителями родов *Gordonia* (штаммы 1B, 1D и 1G), *Rhodococcus* (4D, 6E, Par2, Par5, Par6, Par7, Par10, Par14, Par18) и *Paenibacillus* (12B).

Для определения видового статуса термотолерантных штаммов использовали филогенетические маркеры (гены *gyrB* и *alkB*), а также способность расти на маркерных субстратах (нафталине, пиридине). После определения нуклеотидных последовательностей указанных генов у исследуемых штаммов выполняли выравнивание с аналогичными последовательностями родственных штаммов и строили филогенетические деревья по методам Neighbor Joining (NJ) и Maximum Parsimony (MP).

Для определения видового статуса штаммов рода *Gordonia* в качестве филогенетического маркера использовали ген *alkB*, кодирующий мембранную алкан монооксигеназу FADS-семейства. Ранее (Shen et al., 2010) 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*. На

основании анализа последовательности гена *alkB* штамм 1В был определен как *G. amicalis*. Однако, штаммы *Gordonia* sp. 1D и 1G не образовывали на филогенетическом дереве (рис. 2) кластера с каким-либо типовым штаммом рода *Gordonia*. Вероятно, эти штаммы представляют новый вид в составе данного рода.

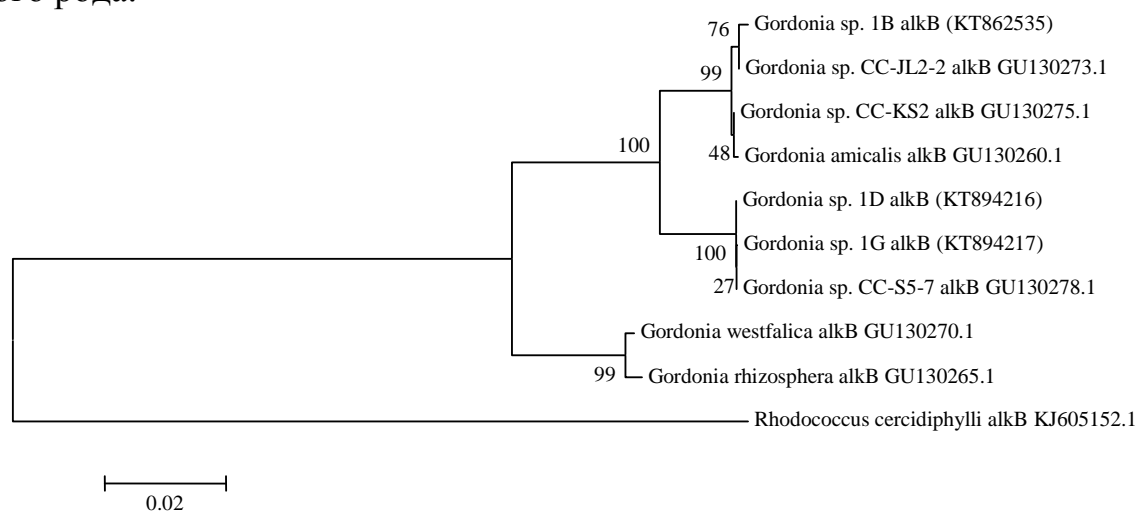


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов рода *Gordonia*, построенное по методу Neighbor joining на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *alkB*.

В данной работе впервые показано, что среди представителей вида *Gordonia amicalis* могут встречаться штаммы, способные расти и утилизировать углеводороды при температурах до 50°C.

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* выделенных нами термотолерантных родококков (штаммы Par2, Par5, Par6, Par7, Par10, Par14, Par18) указывали на то, что последовательности этих генов гомологичны (от 94.0% до 99.7% идентичных п.н.) последовательности *gyrB* типового штамма *R. erythropolis*. 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*.

Последовательности генов 16S рРНК штаммов L5A-BSU и AL-18 были близки к последовательностям этого гена у типового штамма *R. pyridinivorans*. Кроме того, штаммы утилизировали пиридин, что позволило определить их как представителей *R. pyridinivorans* на основании способности к росту на маркерном субстрате. Таким образом, по результатам филогенетического анализа установлено таксономическое положение используемых в работе термотолерантных штаммов. Таксономическое разнообразие термотолерантных бактерий, выделенных из проб грунта и воды с территории России, Казахстана и Беларуси, представлено актиномицетами (филум *Actinobacteria*), однако найдены также представители родов *Paenibacillus* (филум *Firmicutes*) и *Deinococcus* (филум *Deinococcus Thermus*).

3. Анализ способности термотолерантных культур утилизировать углеводороды различной структуры

У штаммов, используемых в работе, анализировали способность утилизировать нефть, дизельное топливо, а также различные индивидуальные углеводороды (алканы линейного и разветвленного строения, ПАУ) как при умеренной (24°C), так и повышенной (45°C) температурах.

Штамм *Paenibacillus* sp. 12В утилизировал нафталин, фенантрен и антрацен, но не флуорен. В целом, данный штамм, выделенный из пробы бурового раствора в Казахстане, отличался способностью расти на ПАУ, некоторых алканах и дизельном топливе. Способность штамма к росту на ПАУ и алканах ранее была описана Даане с соавт. (Daane et al., 2002).

Выделенные нами штаммы *Rhodococcus* отличались слабой способностью к деструкции ПАУ. Штаммы 6Е и Par6 утилизировали только фенантрен, Par2 – только антрацен.

Штаммы *R. pyridinivorans* L5A-BSU и AL18, полученные из коллекции кафедры микробиологии БГУ, являлись перспективными деструкторами ПАУ. Штаммы активно росли на полиароматических соединениях с числом колец до 4.

Использовать гептаметилнонан в качестве источника углерода были способны только 6Е, Par5 и Par6. Способность к деструкции разветвленных алканов ранее отмечали Такеи с соавт. (Takei et al., 2008) у штамма *Rhodococcus* sp. TMP2, который окислял пристан при 20°C, однако при 30°C деградации этого соединения не наблюдалось.

Штаммы *Gordonia* являются известными мезофильными деструкторами алканов (Arenskotter et al., 2004; Xye et al., 2003; Hao et al., 2008). Выделенные нами штаммы *G. amicalis* 1В, *Gordonia* spp. 1D и 1G утилизировали алканы (C₈-C₂₀) и дизельное топливо как при 24°C, так и при 45°C. Выделенные нами гординии окисляли алканы от октана, 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.

Полученные в ходе работы данные по штаммам *Rhodococcus* дополняют уже имеющуюся информацию об их способности расти при повышенных температурах (Sorkhoh et al., 1990; Abu-Ruwaida et al., 1991). Мы впервые наблюдали деструкцию углеводородов штаммами *R. erythropolis* при повышенной (45°C) температуре.

Термотолерантные бактерии, используемые в работе, были способны утилизировать углеводороды (дизельное топливо) при содержании 3-10% соли (NaCl) в среде культивирования (Табл. 2).

Таблица 2. Субстратная специфичность и максимальная концентрация соли при культивировании термотолерантных бактерий, используемых в работе

Штамм	Характеристика штамма	
	Окисляемые субстраты	Максимальная концентрация соли, %
<i>Gordonia amicalis</i> 1B	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	10
<i>Gordonia</i> sp. 1D	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	10
<i>Gordonia</i> sp. 1G	Oct+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	7
<i>Rhodococcus</i> sp. 4D	Dec+, Hde+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU	Nah+, Phn+, Ant+, Pyr+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	7
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AL-18	Nah+, Phn+, Ant+, Pyr+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	7
<i>Deinococcus</i> sp. A2-6	Dec+, Hde+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus</i> sp. 8A-3A	Nah+, Phn+, Dec+, Hde+, Dsf+	7
<i>Rhodococcus</i> sp. 5A	Phn+, Ant+, Dec+, Hde+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus</i> sp. 6E	Nah+, Phn+, Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par2	Ant+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	3
<i>Rhodococcus</i> sp. Par5	Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+	3
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	Non+, Dec+, Hde+, Hmn+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	Phn+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	7
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par10	Phn+, Non+, Dec+, Hde+, Dsf+	5
<i>Rhodococcus</i> sp. Par14	Hde+, Dsf+	3
<i>Rhodococcus</i> sp. Par18	Phn+, Dec+, Hde+, Dsf+	5

Используемые в таблице сокращения: Nah – нафталин, Phen – фенантрен, Ant – антрацен, Pyr – пирен, Oct – октан, Non – нонан, Dec – декан, Hde – гексадекан, Dsf – дизельное топливо, Hmn – гептаметилнонан

Таким образом, в ходе работы выявлено, что исследуемые термотолерантные штаммы обладают способностью утилизировать нефть, дизельное топливо и отдельные углеводороды (линейные и разветвленные алканы, ПАУ), в том числе в присутствии в среде культивирования соли (в концентрации до 10%). Это позволяет рассматривать изучаемые штаммы как перспективные деструкторы нефти и нефтепродуктов в условиях жаркого аридного климата.

4. Изучение способности штаммов продуцировать поверхностно-активные вещества

Большинство используемых в работе термотолерантных штаммов были классифицированы 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 исследуемых термотолерантных родококков наблюдали при культивировании штаммов в жидкой среде Эванса с

добавлением глюкозы, гексадекана или дизельного топлива в качестве источника углерода и энергии.

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 микроорганизмов 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, 1991). В основном эти микроорганизмы продуцируют в культуральную среду липиды трегалозы, однако есть сведения о продукции родококками свободных жирных кислот (Peng et al., 2007). Измерение поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта штаммов, выращенных на минеральной среде с гексадеканом, показало, что изучаемые термотолерантные родококки не продуцируют ПАВ в среду культивирования. Однако суспензия клеток исследуемых родококков способна эмульгировать углеводороды (гексадекан, дизельное топливо).

У штаммов *G. amicalis* 1B, *Gordonia* sp. 1D и 1G наблюдали продукцию внеклеточных биоПАВ. При культивировании этих штаммов на минеральной среде с добавлением гексадекана и дизельного топлива при 24°C и 45°C отмечали снижение поверхностного натяжения культуральной жидкости относительно ПН контроля (жидкой среды Эванса – 72 мН/м). Поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта гордоний, культивированных при 24°C и 45°C, снижалось до 45-50 мН/м.

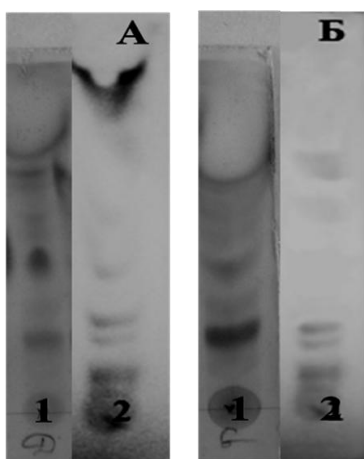


Рис. 3. Хроматограммы гликолипидных смесей, продуцируемых штаммами *Gordonia* sp. 1D (А) и 1G (Б) при культивировании при температурах 24°C (1) и 45°C (2). Система для элюирования – хлороформ:метанол:вода 65:15:2.

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 CC-JG39, исследуемый в этой статье, продуцировал поверхностно-активные соединения при культивировании на минеральной среде с дизельным топливом в диапазоне температур 15-45°C.

Посредством окрашивания специфическими реагентами на хроматографических пластинах было установлено, что штаммы *G. amicalis* 1B, *Gordonia* sp. 1D и 1G продуцируют смеси гликолипидов. При сравнении сурфактантов, продуцируемых штаммами *Gordonia* при различных температурах выявили, что гликолипидные смеси, полученные после культивирования бактерий при 24°C и 45°C, отличаются по составу (Рис. 3), следовательно, температура влияет на продукцию гликолипидов термотолерантными штаммами *Gordonia*. Тем не менее, значения поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта, полученные при 24°C и 45°C, не различаются. Таким образом, можно заключить, что температура культивирования 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.

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

Анализ 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 внимание уделяется мезофильным штаммам-нефтедеструкторам (Бабаев с соавт., 2009; Казиева, Мелякина, 2014; Аюпова с соавт., 2014; Мухамбетов с соавт., 2013; Раманкулов с соавт, патент KZ29967, 2014; Раманкулов с соавт., патент KZ29948, 2015). Такие разработки не рассчитаны на применение в жарком аридном климате, особенностями которого являются резкие перепады температур, высокие (до 50°C) температуры воздуха и грунта в дневное время суток, а также, вследствие испарения воды, низкая влажность грунтов и высокое содержание в них солей.

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

5.1. 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 среде Эванса с нефтью (2%) 14 суток при температурах 24°C и 45°C. По окончании эксперимента оценивали степень бактериальной деструкции нефти. Наиболее активно процесс деструкции нефти осуществлялся штаммами *Gordonia* sp. 1D (55% и 25% при 24°C и 45°C соответственно), *R. pyridinivorans* L5A-BSU (19% и 27%) и *Rhodococcus erythropolis* Par7 (24% и 20%) за вычетом ее абиотической

убыли. Абиотические потери нефти при 24°C и 45°C составили 6% и 11%, соответственно (Рис. 4).

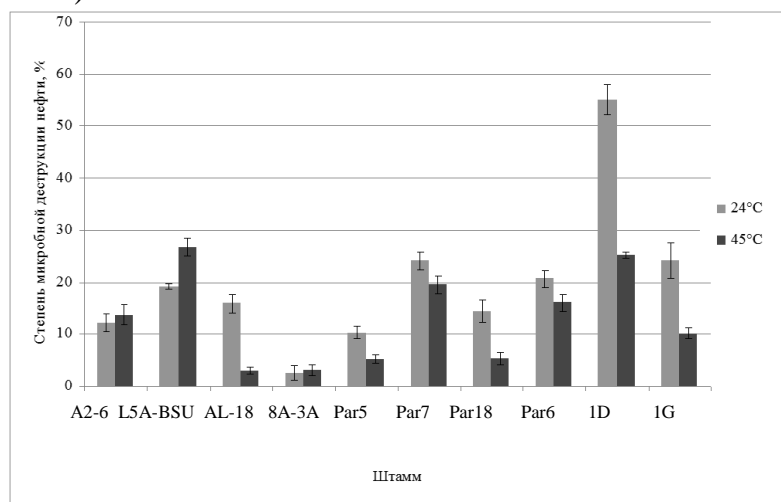


Рис. 4. Степень деструкции (%) нефти термотолерантными бактериями в жидкой среде Эванса за 14 суток. Штаммы: Par2, Par7 – *R. erythropolis*; Par5, Par6 – *Rhodococcus* sp.; 1D – *Gordonia* sp., 1G – *Gordonia* sp., A2-6 – *Deinococcus* sp.; L5A-BSU, AL-18 – *R. pyridinivorans*, 8A-3A – *Rhodococcus* sp.

В результате были отобраны наиболее 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 оценена способность этих штаммов к росту и утилизации нефти при концентрациях нефти в среде культивирования до 20%.

Отобранные 6 штаммов росли в среде с нефтью в концентрации до 10%. При 20% нефти слабый рост наблюдали у штаммов *Gordonia* sp. 1D и *Deinococcus* sp. A2-6. Таким образом, разрабатываемый консорциум термотолерантных штаммов будет эффективен в присутствии нефти в среде до 10%, однако жизнеспособность штаммов сохраняется при концентрации нефти 15%. На основании данных о субстратной специфичности штаммов, их галотолерантности и способности продуцировать биоПАВ из отобранных 6 штаммов было составлено 4 различных бактериальных консорциума (Табл. 3). Консорциумы составляли так, 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 (Табл. 3), а также штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU, деструктор полиароматических соединений.

Таблица 3. Варианты консорциумов термотолерантных бактерий

Консорциум А	Консорциум Б	Консорциум В	Консорциум Г
<i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp. 1G <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6 <i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 <i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 <i>Gordonia</i> sp.1D

Для изучения деструкции нефти и сравнения эффективности консорциумы бактерий культивировали в жидкой минеральной среде с 2% нефти и 3% соли в течение 14 суток. Деградацивную активность консорциумов оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде. Абиотические потери нефти в эксперименте составили 5% и 12% при 24°C и 45°C соответственно. Наибольшую степень деструкции нефти наблюдали в системе с консорциумом В (Рис. 5).

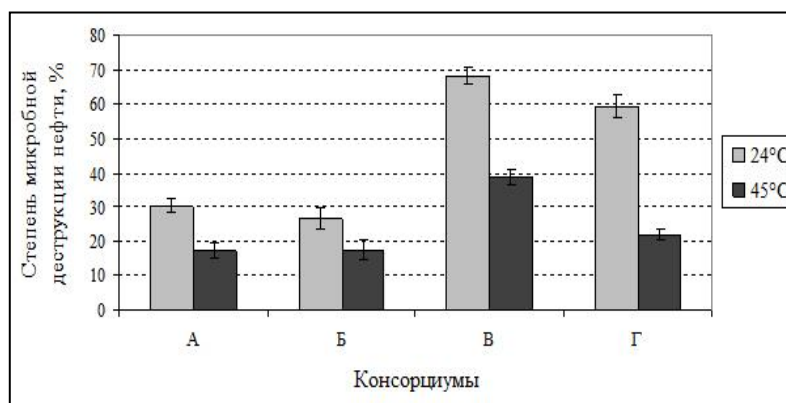


Рис. 5. Степень деструкции (%) нефти консорциумами термотолерантных бактерий в жидкой среде Эванса за 14 суток при 24°C и 45°C. Консорциумы А, Б, В, Г обозначены в соответствии с табл. 3.

Консорциум В утилизировал 69% нефти при 24°C и 40% нефти при 45°C (Рис. 5). Консорциум утилизировал нефти больше, чем каждый из входящих в него штаммов отдельно (Рис. 4). 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). Этот консорциум был отобран для дальнейшего исследования.

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

Для сравнения эффективности консорциума В и монокультур в грунте в условиях жаркого аридного климата были смоделированы песчаные системы со следующими условиями: нефти – 2%, морской соли – 3%, влажности – 10%. Инокулят вносили до конечной концентрации 10⁴ КОЕ/г грунта. Эксперимент проводили в течение 21 суток как при 24°C, так и при 45°C.

Абиотическая убыль нефти через 21 сутки при температурах 24°C и 45°C составила 20% и 33%, соответственно. Степень деструкции нефти

консорциумом В в грунте составила 70 и 59% нефти за вычетом абиотической убыли (при температурах 24°C и 45°C соответственно) (Рис. 6).

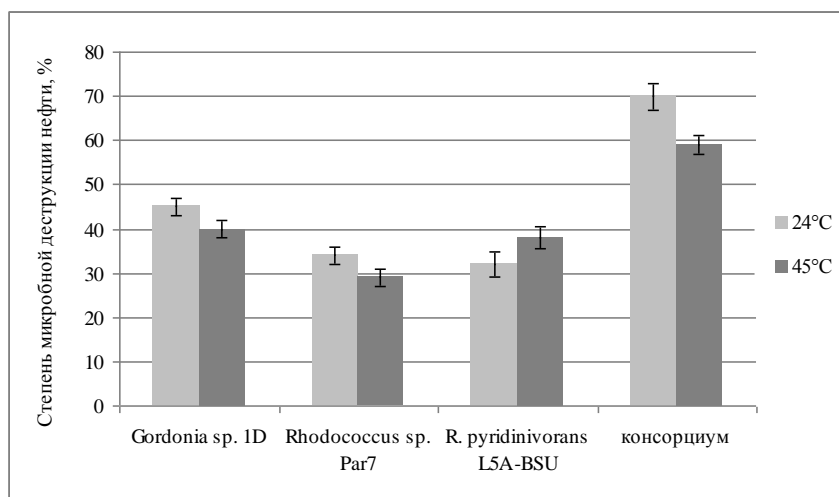


Рис. 6. Степень деструкции нефти штаммами 1D, Par7, L5A-BSU и консорциумом трех штаммов в грунте с 2% нефти, 3% соли и влажностью 10% при 24°C и 45°C. Время эксперимента – 21 сутки.

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

5.3. 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 при умеренной (24°C) 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 1×10^5 КОЕ/мл. Штаммы консорциума вносили в соотношении 1:1:1.

Штаммы, внесенные в систему с одинаковой исходной численностью, демонстрировали различные скорости роста в смешанной культуре (Рис. 7 А, Б). Так, при 24°C у штамма L5A-BSU экспоненциальная фаза начиналась через 80 часов, а у Par7 – через 120 часов роста. Экспоненциальный рост родококков прекращался практически одновременно, между 200 и 240 часами культивирования, после чего в ходе эксперимента наблюдали периоды стабилизации и постепенного падения численности (Рис. 7 А).

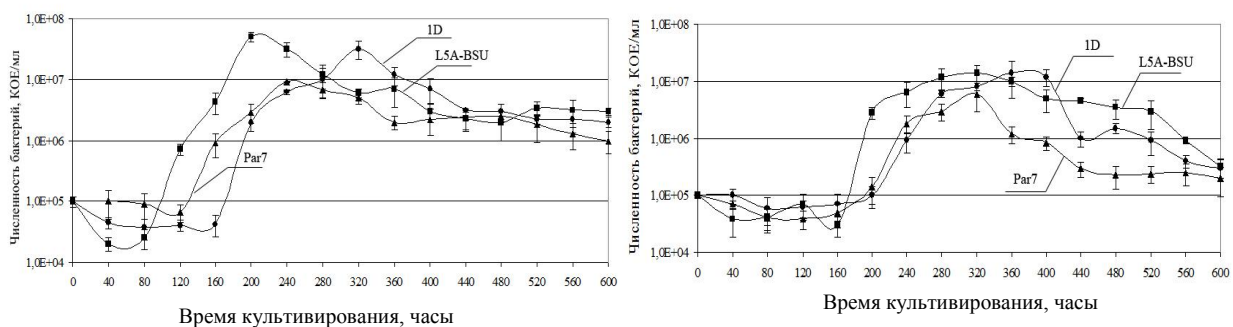


Рис. 7. Кривые роста штаммов *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 и *Rhodococcus pyridinivorans* L5A-BSU в смешанной культуре при температуре А) 24°C, Б) 45°C. Графики зависимости численности бактерий от времени представлены в полулогарифмических координатах

На момент окончания эксперимента при 24°C численность штаммов в консорциуме была примерно одинаковой и составляла 3×10^6 КОЕ/мл для штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU, 1×10^6 КОЕ/мл для штамма *R. erythropolis* Par7 и 2×10^6 КОЕ/мл для штамма *Gordonia* sp. 1D (Рис. 7 А). На 25 сутки роста при 45°C численность штаммов консорциума Par7, 1D и L5A-BSU составляла 2×10^5 , 3×10^5 , 3.2×10^5 КОЕ/мл, соответственно (Рис. 7 Б). Можно заключить, что в процессе роста смешанной культуры каждый штамм проходит фазы роста, характерные для периодической культуры, и достигает максимальной численности жизнеспособных клеток в поздней экспоненциальной фазе, после чего численность консорциума стабилизируется.

6. Генетические особенности термотолерантных углеводородокисляющих актиномицетов

В работе исследованы генетические особенности термотолерантных штаммов – наиболее эффективных деструкторов углеводов, входящих в состав консорциума. Были получены и проанализированы нуклеотидные последовательности ключевых генов деструкции алканов у штамма *Gordonia* sp. 1D и генов деструкции ПАУ (нафталина) у штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU.

У термотолерантных гордоний были обнаружены гены, кодирующие ферменты двух различных алкан гидроксилаз – CYP153 и негемовой гидроксилазы FADS-семейства *alkB* (Рис. 8 А, Б). 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 C₆ до C₁₀ (или от C₈ до C₁₂) (van Beilen et al., 2006; Scheps et al., 2011; Nie et al., 2013; Bihari et al., 2010; Bihari et al., 2011), а *AlkB* – алканы от C₁₂ до C₂₀.

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.

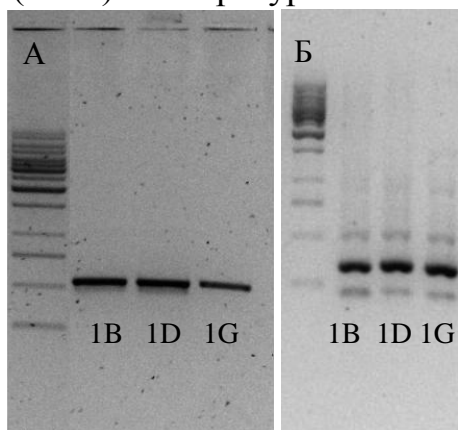


Рис. 8. Электрофореграмма ампликонов фрагментов алкан гидроксилаз *alkB* (А) и *CYP153* (Б) штаммов *Gordonia* (масса продуктов 550 и 330 п.н. соответственно)

Выявлено, что штамм *R. pyridinivorans* L5A-BSU обладает характерным для родококков набором генов деструкции нафталина *nar*, ранее обнаруженном в других родококках (Kulakov et al., 2005; Di Gennaro et al., 2010). У штамма L5A-BSU отмечали нестабильность генов *nar* и признака деструкции нафталина. Тем не менее, 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*. 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 в процессе горизонтального переноса приобретены в составе МГЭ (возможно, транспозоноподобной структуры) от *R. opacus*.

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 транспозоноподобная структура, которая в селективных условиях стабильно наследуется даже при повышенных (до 50°C) температурах, что дает штамму возможность эффективно утилизировать полиароматические компоненты нефти.

7. Депонирование штаммов, подготовка заявки на патент РФ

7.1. Депонирование культур термотолерантных актиномицетов

В соответствии с принятыми регулирующими нормативами оформления патентов нами 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 номера: *Gordonia* sp. 1D - ВКМ Ac2720D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 – ВКМ Ac2722D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU - ВКМ Ac2721D.

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.

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 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 публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Титок М.А., Филонов А.Е. Разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком климате // Биотехнология. – 2016. - №1. – С. 53-64.
2. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Акимов В.Н., Титок М.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы, выделенные из проб грунта и воды географически удаленных регионов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. - № 4. – С. 1–9.
3. Petrikov K., Delegan Ya., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of Pseudomonas and Rhodococcus oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure // Process Biochemistry. – 2013. – Vol. 48. – P. 931-935.
4. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М.И., Титок М.А., Филонов А.Е. Термотолерантные актиномицеты как агенты ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях жаркого аридного климата // Известия Тульского государственного университета Естественные науки. – 2015. – № 4. – С. 248–258.
5. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М.И., Филонов А.Е. Физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика термотолерантных бактерий-деструкторов нефти, выделенных из образцов грунта и воды с территории Антарктиды, Казахстана и России // Актуальная биотехнология. – 2014. - №3 (10). - С. 107-108.
6. Делеган Я.А., Филонов А.Е. Физиологическая и таксономическая характеристика термотолерантных нефтеокисляющих бактерий рода *Gordonia*, выделенных из пробы грунта с территории Московского нефтеперерабатывающего завода (Капотня, г. Москва) // МНО «Inter Medical», Биологические науки. – 2014. - №4. – С. 45-48.

Заявка на патент

7. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Чернявская М.И., Титок М.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата. Заявка на патент РФ №2015143402. Приоритет 13.10.2015.

Тезисы

8. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Акимов В.Н., Титок М.А., Филонов А.Е. Ассоциация термотолерантных нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных грунтов в условиях жаркого климата // IX Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Минск, 7-11 сентября 2015. С. 177-178.
9. Delegan Y., Vetrova A., Akimov V., Titok M., Filonov A. Isolation and characterization of thermotolerant petroleumoxidizing bacteria from geographically remote regions // FEMS-1950 Environmental microbiology – 2. FEMS Congress, Maastricht, 7-11 June 2015.
10. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М.И., Филонов А.Е. Физиолого-биохимический и генетический анализ термотолерантных штаммов-деструкторов нефти, выделенных из образцов грунта и воды с территории России, Казахстана и Антарктиды. Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2014». Материалы конференции, Тула, 2-3 октября 2014. С. 43.
11. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Гафаров А.Б., Филонов А.Е. Физиологическая и метаболическая характеристика термотолерантных нефтеокисляющих бактерий-продуцентов биоПАВ, выделенных из грунтовых и водных образцов России, Казахстана и Антарктиды. 18 международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Тезисы. Пушино, 21-25 апреля 2014. С. 201.

12. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А. Анализ свойств углеводородоокисляющих термотолерантных бактерий, выделенных из образцов грунта России, Казахстана и Антарктиды. XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014». Тезисы докладов, Москва, 7-11 апреля 2014. С. 205-206.
13. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е. Изучение физиолого-биохимических свойств термотолерантных нефтеокисляющих бактерий, выделенных из географически удаленных регионов. Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни». Материалы конференции. Москва, 18-20 марта 2014. С. 423-424.
14. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е. Термотолерантные бактерии-деструкторы нефти, продуцирующие биоэмульгаторы. IX Молодежная школа-конференция с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии". Тезисы. Москва, 21-23 октября 2013. С. 71-73.
15. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е. Выделение и характеристика эффективных термотолерантных бактерий-нефтедеструкторов, продуцирующих биоэмульгаторы. Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2013». Материалы конференции, Тула, 1-2 октября 2013. С. 27.
16. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Гафаров А.Б., Петриков К.В., Боронин А.М. Термотолерантные углеводородоокисляющие микроорганизмы: изучение физиолого-биохимических свойств. 17 Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Сборник тезисов. С. 13-14.
17. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А. Характеристика физиолого-биохимических свойств термотолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов, выделенных из географически удаленных биотопов. XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». Тезисы докладов, Москва, 8-13 апреля 2013. С. 192-193.
18. Делеган Я.А., Пунтус И.Ф., Петриков К.В., Филонов А.Е. Выделение и изучение структуры биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами–нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. VIII Молодежная школа-конференция с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии". Тезисы. 29-31 октября 2012. С. 121-122.
19. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е. Выделение термотолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов из географически удаленных биотопов. Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2012». Материалы конференции, Тула, 12 сентября, 15 октября 2012. С. 30.
20. Петриков К.В., Делеган Я.А., Филонов А.Е. Микробные биосурфактанты для биоремедиации грунтов, загрязненных углеводородами нефти. Всероссийская конференция с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2012». Материалы конференции, Тула, 12 сентября, 15 октября 2012. С. 33.
21. Puntus I., Akhmetov L., Petrikov K., Delegan Ya., Ross D., Surin A., Filonov A. Surface activity of cold-adapted oil degrading microorganisms of the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. Contaminants in Freezing Ground (CFG8): 8th International Conference. Abstracts, Obergurgl – Tyrol, 22-26 April 2012. Innsbruck, Austria. P. 63.