

Министерство образования и науки Российской Федерации

УДК 579.6; 579,222

ГРНТИ 87.03.15; 34.27.17

Инв. №

УТВЕРЖДЕНО:
Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет"
От имени Руководителя организации _____ / Федорук М.П. / М.П.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

о выполнении 4 этапа Государственного контракта
№ 16.740.11.0681 от 07 июня 2011 г. и Дополнению от 01 сентября 2011 г. № 1

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет"
Программа (мероприятие): Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.3.1 Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.
Проект: Разработка комплексной композиции на основе микроорганизмов для утилизации нефтесодержащих техногенных отходов (нефтепродуктов)
Руководитель проекта: _____ /Мокиева Анна Владимировна (подпись)

**Новосибирск
2012 г.**

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

по Государственному контракту 16.740.11.0681 от 07 июня 2011 на выполнение поисковых научно-исследовательских работ для государственных нужд

Организация-Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Руководитель темы:

кандидат биологических наук, научный сотрудник

подпись, дата

Мокиева А. В.

Исполнители темы:

без ученой степени, звание не указано

подпись, дата

Дюкалова М. Б.

без ученой степени, звание не указано

подпись, дата

Дронова С. А.

кандидат биологических наук, научный сотрудник

подпись, дата

Емельянова Е. К.

Реферат

Отчет 47 с., 2 ч., 7 рис., 4 табл., 80 источн., 1 прил.

микроорганизмы-деструкторы, нефть, нефтепродукты, биодеграляция, биоремедиация, ассоциация.

В отчете представлены результаты исследований, выполненных по 4 этапу Государственного контракта № 16.740.11.0681 "Разработка комплексной композиции на основе микроорганизмов для утилизации нефтесодержащих техногенных отходов (нефтепродуктов)" (шифр "2011-1.3.1-220-010") от 07 июня 2011 по направлению "Проведение научных исследований молодыми кандидатами наук в следующих областях:- мониторинг и прогнозирование состояния атмосферы и гидросферы; - оценка ресурсов и прогнозирование состояния литосферы и биосферы; - переработка и утилизация техногенных образований и отходов; - снижение риска и уменьшение последствий природных и техногенных катастроф; - экологически безопасные разработки месторождений и добычи полезных ископаемых;- экологически безопасные ресурсосберегающие производства и переработки сельскохозяйственного сырья и продуктов питания" в рамках мероприятия 1.3.1 "Проведение научных исследований молодыми учеными - кандидатами наук.", мероприятия 1.3 "Проведение научных исследований

молодыми учеными - кандидатами наук и целевыми аспирантами

в научно-образовательных центрах", направления 1 "Стимулирование закрепления молодежи в сфере науки, образования и высоких технологий." федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы.

Цель работы - Разработать микробиологические композиции и технологию их применения для очистки загрязненных нефтепродуктами (дизельное топливо, минеральное масло, ароматические углеводороды, сырая нефть) территорий и сточных вод, а также ликвидации аварийных разливов нефтепродуктов. Объектами применения разработанной технологии будут являться территории АЗС, топливных баз, нефтехранилища, автотранспортных предприятий, СТО, автомоек, автостоянок.

В работе использованы методы культивирования микроорганизмов в жидкой минеральной среде, на плотных питательных средах, приготовление питательных сред, стерилизация, хранение микроорганизмов. Методом хроматомасс-спектрометрии определяли содержание насыщенных и ароматических углеводов. Метод жидкостной хроматографии использовали для определения содержания ароматических углеводов в остаточной нефти. Для определения скорости деструкции измеряли массовые концентрации нефтепродуктов концентратомером КН-2м.

Все работы с микроорганизмами проводили в ламинарных боксах 2 класса чистоты. Культивирование микроорганизмов осуществлялось в колбах на качалках. Нарращивание биомассы на плотных средах на чашках Петри проводили в термостатах. Для хранения образцов использовали низкотемпературный холодильник. При приготовлении сред использовались аналитические весы, рН метр, шейкер. Среды стерилизовали в автоклаве, стеклянную посуду стерилизовали в сухожаровом шкафу. Содержание ароматических углеводов определяли хроматографом. Массовые концентрации нефтепродуктов в исследуемых образцах вычисляли на концентратомере КН-2м.

Поиск подходящих микроорганизмов нефтедеструкторов был проведен из образцов почвы, воды, собранных с территорий АЗС, автотранспортных предприятий, СТО, автомоек, автостоянок. На основе выделенных микробных изолятов (проявляющих нефтеутилизирующие свойства) была создана коллекция, включающая в себя штаммы бактерий, представителей родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* (всего 64 штамма).

Согласно таким критериям, как высокая нефтеокисляющая активность, устойчивость к солям тяжелых металлов, непатогенность и нетоксичность штамма для человека и животных оптимальными для дальнейших исследований являлись штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6.

Оценена динамика роста выбранных штаммов на различных источниках углерода. Рост на среде с бензолом продемонстрировали 3 из 6 выбранных культур (*Rhodococcus* ssp TE3, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6), на среде с бензином - 2 культуры (*Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4), с дизельным топливом — 4 культуры (*Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP9).

Штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6

эффективно окисляют ароматические и нециклические компоненты. Особенно важной является их способность к росту на ароматических углеводородах, таких как толуол, бензол и ксилол, которые в естественных условиях и при биоремедиации разлагаются сложнее всего.

Оптимум роста во время утилизации большинства источников углерода для штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6 позволяет применять эти культуры в щелочных условиях среды.

Штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6, наиболее перспективные для биотехнологических разработок по нефтеутилизирующей способности, являются психротолерантными и солеустойчивыми. Это предполагает возможность их использования в засоленных природных субстратах при пониженных температурах.

Для создания ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов были выбраны штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9.

Было установлено, что бактерии-нефтедеструкторы, выбранные для консорциума, не проявляют антагонизма по отношению друг к другу и эндогенной микробиоте. Следовательно, при внесении больших количеств биомассы ассоциации штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9 не будет наблюдаться угнетения местной микробиоты и вытеснения старых видов микроорганизмов.

При применении ассоциации штаммов-деструкторов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9 биodeградация нефти проходит полнее и за меньшие сроки.

Преимуществом предлагаемого консорциума штаммов микроорганизмов является способность расти на обедненной питательной среде, а также высокая скорость окисления нефти и нефтепродуктов, что позволяет эффективно использовать его при биологической очистке почв, почвогрунтов и вод, загрязненных нефтепродуктами.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Разработка композиции микроорганизмов-нефтедеструкторов	9
1. Подбор штаммов для композиции	9
2. Изучение свойств композиции	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	35

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки представляет особую опасность, что связано с большими масштабами добычи, транспортировки, переработки энергоносителей и несовершенством технологических процессов. Потери нефти только в России достигают 50 млн. тонн в год, из них более трети - за счет аварийных ситуаций; при переработке нефти ежегодно образуется 700 тыс. тонн отходов (Плотникова Е.Г. и др., 2005). Углеводороды нефти приводят в негодность огромные массивы сельскохозяйственных почв вследствие уменьшения их плодородия и негативных изменений в почвенном биоценозе, являются основными загрязнителями внутренних водоемов и морей, создавая различные формы загрязнения - плавающие на воде нефтяные пятна, осевшие на дно тяжелые фракции, что значительно нарушает жизнедеятельность аэробной биоты (Кобзев, 2002). Компоненты тяжелых фракций нефти (нафталин, фенантрен) и в особенности их метаболиты, диол- и эпоксипроизводные, представляют собой высокоактивные соединения, являющиеся канцерогенами и мутагенами, т.к. способны образовывать ковалентные связи с ДНК (Park, 2004). Именно поэтому нефть и нефтепродукты относятся к приоритетным загрязнителям биосферы (Другов, 2000).

Процесс естественного восстановления загрязненных нефтью почв длителен и ставит вопрос о создании и внедрении современных технологий рекультивации нарушенных территорий. Механические и физические методы не могут обеспечить полное удаление нефти из загрязненного грунта, а процесс естественного разложения чрезвычайно длителен. Разложение нефти в почве – процесс биогеохимический, в котором основную роль играет функциональная активность комплекса почвенных микроорганизмов.

Поэтому, наиболее перспективным способом очистки почвы от нефтепродуктов различного характера, состава и состояния является рекультивация земель, в основе которой способность микробиологического самоочищения грунтов.

Ускорить очистку почв с помощью нефтеокисляющих микроорганизмов возможно несколькими способами: активизацией метаболической активности естественного микробиоценоза путем изменения водно-воздушных условий биотопа (агротехнические приемы); подготовкой и внесением активных нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненные грунты; внесением специально подобранных активных нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненные грунты.

Способность использовать нефть в качестве источника энергии присуща не единичным специализированным формам, а многим грибам и бактериям. Такие микроорганизмы распространены очень широко и могут быть выделены практически из любой почвы. Применение микробных биопрепаратов для ликвидации нефтезагрязнений окружающей среды является известным приемом, описанным многими исследователями (Логинов О.Н. и др., 2004).

Нефть представляет собой сложную смесь углеводородов, кислородных, сернистых и азотистых соединений. В ее составе обнаруживается свыше 1000 индивидуальных органических веществ. Легкие фракции обладают наибольшей токсичностью по отношению к живым организмам, но влияние их достаточно кратковременно вследствие быстрого испарения, биodeградации, рассеивания. Тяжелые фракции менее токсичны, но они значительно ухудшают свойства почв, затрудняя водо- и газообмен. Эти компоненты очень устойчивы и могут сохраняться в земле продолжительное время.

В связи с тем, что в состав нефти входит большое количество различных химических соединений, один штамм не способен обладать всем спектром ферментов, необходимых для биodeградации этих компонентов. Внесение нескольких штаммов в загрязненный субстрат, отличающихся по спектру потребляемых веществ, позволяет утилизировать нефть более эффективно.

Целью четвертого этапа работы являлось разработка композиции микроорганизмов-нефтедеструкторов: подбор оптимального состава микроорганизмов, исключающего антагонистические отношения в композиционной массе; изучение свойств композиции: ростовые свойства, отсутствие угнетения местной микробиоты, общий спектр утилизации нефтепродуктов.

Задачи четвертого этапа проекта (август - сентябрь 2012 года):

- Подбор штаммов для композиции;
- Изучение свойств композиции.

РАЗРАБОТКА КОМПОЗИЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ- НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ

1. Подбор штаммов для композиции

Нефть представляет собой сложную смесь трудно утилизируемых в природе компонентов. 70 - 90 % от всех веществ нефти составляют углеводороды трех классов: парафиновые, нафтеновые, ароматические (Панченко и др., 2003). Чем меньше молекулярный вес компонентов нефти, тем выше скорость ее распространения в окружающей среде. Токсичные бензиново-керосиновые фракции и ароматические соединения, хорошо растворяясь в воде, способны мигрировать на значительные расстояния в горизонтальной плоскости и глубоко распространяются по почвенному профилю. Моноядерные углеводороды - бензол и его гомологи оказывают более быстрое токсическое воздействие на организмы, чем полиароматические углеводороды, так как крупные молекулы полиароматических углеводородов медленнее проникают через мембраны клеток (Ягафарова, 2001).

Для современной цивилизации вполне привычными стали экологические катастрофы, связанные с разливами нефтепродуктов. Загрязнение такого рода негативно воздействуют на почвенный слой, поверхностные и подземные воды, геологическую среду. Немалая доля таких происшествий связана с авариями на нефтехранилищах и их ненадлежащей эксплуатацией. При этом даже после прекращения действия таких нефтехранилищ они на долгие годы остаются источниками загрязнений. По степени отрицательного влияния на экосистемы нефть, нефтепродукты и нефтесодержащие промышленные отходы, в том числе пластиковый и полиэтиленовый мусор, занимают второе место после радиоактивного загрязнения. Несовершенство технологий добычи, транспортировки, переработки и хранения нефти приводит к ее значительным потерям, которые достигают 50 млн. тонн в год, то есть 2% от общей добычи. Так, 20 апреля 2010 г. на буровой платформе Deepwater Horizon нефтегазовой компании British Petroleum в Мексиканском заливе произошел неконтролируемый выброс нефти с глубины 1500 метров. Оценки масштабов выброса нефти различны: от 5 до 60 тыс. баррелей в день. Объем разлива нефти, произошедшего в результате аварии на танкере Эксон Вальдез, которая ранее считалась наиболее разрушительной из морских катастроф, составил около 260 тыс. баррелей нефти.

Благодаря высокой адсорбирующей способности почвы, нефтепродукты сохраняются в ней длительное время, вызывая необратимые изменения: образования

битуминозных солончаков, гудронизацию, цементацию (Восстановление нефтезагрязненных..., 1988). Добыча и транспортировка нефти и нефтепродуктов сопровождается загрязнением окружающей среды, что приводит к нарушению аэрации, гидрологического режима и микрорельефа верхних горизонтов почвы, снижению ее плодородия на обширных территориях, угнетению растительного покрова, увеличению техногенных площадей и, как следствие, изменению биологического разнообразия природных ландшафтов (Биологическая рекультивация..., 1992).

Проблема загрязнения окружающей среды нефтепродуктами наиболее характерна для областей так или иначе связанных с нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленностью, но в последнее время данная проблема стала настоящим «бичом» для всех крупных городов.

С неуклонным ростом плотности автотранспорта на территории городов увеличивается число заправочных станций и обслуживающих пунктов, а это, в свою очередь, создает пожаро- и экологически опасную ситуацию, повышает вероятность возникновения разливов нефтепродуктов, приводит к неизбежному загрязнению атмосферы, почв, грунтов, поверхностных и подземных вод нефтепродуктами, что и является основной экологической проблемой. В настоящее время эти загрязненные территории не подвергаются обработке.

Загрязняющие вещества на АЗС могут поступать в геологическую среду в результате утечек из резервуаров, арматуры, трубопроводов и от проливов топлива во время заправки автомобилей и закачки в резервуары. Определенную роль в формировании загрязнения почвогрунтов играют выпадения из атмосферы и движение автотранспорта по территории АЗС.

В связи с этим, остро стоит вопрос разработки экологически безопасных и экономически обоснованных мероприятий, направленных на интенсификацию процессов биологической очистки и восстановления плодородия земель.

При масштабных загрязнениях природных сред нефтепродуктами, наряду с механическими рекультивациями, рекомендуется производить доочистку загрязненных территорий при помощи биопрепаратов на основе аборигенной микрофлоры, являющейся экологически безопасной по санитарно-эпидемиологическим нормативам и наиболее конкурентоспособной в плане очистки загрязненных территорий нефтепродуктами. Их использование позволит улучшить экологическую обстановку без нарушения природных условий.

Опыт рекультивации загрязненных нефтью земель во многих регионах России показал достаточно высокую эффективность очистки при использовании бактериальных

препаратов. В то же время, известно, что препараты, хорошо зарекомендовавшие себя в определенной обстановке, не всегда дают высокий ожидаемый результат при использовании в других регионах. Причиной этого являются конкретные почвенно-эдафические факторы района проведения работ, а также конкуренция со стороны аборигенной микрофлоры.

Основная роль в биодеструкции нефтезагрязнений принадлежит микроорганизмам.

Существует два принципиальных подхода к биодegradации нефтяных углеводородов в естественной среде:

1) стимуляция природной нефтеокисляющей микробиоты путем создания оптимальных условий для ее развития (внесение азотно-фосфорных удобрений, аэрация и т.п.);

2) введение в загрязненную экосистему активных углеводородокисляющих микроорганизмов.

В результате биологической обработки нефтяного загрязнения биопрепаратами в окружающей среде остаются легко разлагающийся бактериальный белок, не требующий последующей утилизации, и нетоксичные продукты разложения нефти. Продукты жизнедеятельности бактерий и сами отмирающие бактерии легко усваиваются аборигенной микрофлорой, давая основу для формирования гумуса (при использовании препарата для очистки почвы) или образуя донный ил (в случае применения на воде). Степень очистки зависит от исходной величины загрязнения, вида нефтепродукта.

Разработка новых биологических способов очистки на основе штаммов-нефтедеструкторов способна существенно интенсифицировать процессы восстановления природной среды.

В настоящее время известно более 100 видов микроорганизмов, принадлежащих к 40 родам эубактерий, дрожжей, грибов, способных к утилизации углеводородов (Van Beilen et al., 2003). Микроорганизмы-деструкторы углеводородов известны среди представителей родов бактерий:

- *Acetobacterium* (Watanabe et al., 2000, 2002),

- *Rhodococcus* (Коронелли и др., 1994; Ягафарова и др., 1998; Чугунов и др., 2000; Куюкина и др., 2006; Whyte et al., 1998; Sharma, Pant, 2000; Dean-Ross et al., 2001; Margesin et al., 2003b; Murygina et al., 2000, 2005),

- *Pseudomonas* (Britton, 1984; Aislabie, 2000; Hamme, Ward, 2001; Rahman et al., 2002a; Piskonen et al., 2005),

- *Azotobacter* (Коронелли и др., 1994; Градова и др., 2003),

- *Bacillus* (Britton, 1984; Rahman et al., 2002b; Pineda-Flores et al., 2004; Toledo et al., 2006),
- *Arthrobacter* (Логинов и др., 2004; Schwartz, Scow, 2001; Ionata et al., 2005),
- *Acinetobacter* (Коронелли и др., 1994; Чугунов и др., 2000; Аушева, 2007; Hanson et al., 1997; Gallego et al., 2001; Marchal et al., 2003),
- *Sphingomonas* (Aislabie, 2000; Baraniecki et al., 2002; Liu et al., 2004),
- *E.coli* (Diaz et al., 2001),
- *Enterobacter* (Toledo et al., 2006),
- *Cytophaga* (Хомякова и др., 2003),
- *Corynebacterium* (Ferrari et al., 1998; Rahman et al., 2002a; Pineda-Flores et al., 2004),
- *Mycobacterium* (Marchal et al., 2003; Miller et al., 2004),
- *Flavobacterium* (Ferrari et al., 1998; Rahman et al., 2002a),
- *Geobacillus* (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003),
- *Zooglea* (Watanabe et al., 2000, 2002),
- *Achromobacter, Alcanivorax* (Smits et al., 2002),
- *Alcaligenes, Brevibacterium, Bukholderia, Gordonia* (Jirasripongpun, 2002),
- *Nocardia, Thermoleophilum* (Van Beilen et al., 2003).

Окислители n-алканов с длиной углеродной цепи от 10 до 16 известны среди представителей дрожжей:

- *Candida maltosa, Candida tropicalis, Yarrowia lipolytica* (Суржко и др., 1995; Кузнецов, 1997; Cirigliano, Carman, 1985; Zinjarde et al., 1997, 2002a; Gaylarde et al., 1999; Zvyagilskaya et al., 2001; Van Beilen et al., 2003),
- *Torulopsis bombicola, Torulopsis gropengiesseri* (Cooper, Paddock, 1984; Van Beilen et al., 2003),
- *Debaromyces hansenii* (Yadav et al., 1999; Gaylarde et al., 1999, Jirasripongpun, 2002),
- *Schwanniomyces* (Звягинцев и др., 2005),
- *Cryptococcus* (Margezin et al., 2003a),
- *Hansenula* (Gaylarde et al., 1999),
- *Pichia, Rhodotorula* (Bento, 2001),
- *Saccharomyces* (Gaylarde et al., 1999),
- *Sporobolomyces, Trichosporon* (Van Beilen et al., 2003).

В экспериментах S.S. Zinjarde штаммы дрожжей были выделены из нефтезагрязненного ила и являлись основными деструкторами алифатической составляющей нефти (Zinjarde et al, 2002b).

Дрожжами с наибольшей скоростью обычно утилизируются н-алканы C₁₁ – C₁₄, среднее положение занимают н-алканы C₁₅ – C₁₈ и медленнее других усваиваются н-алканы C₂₃ – C₂₄. Алканы C₆ – C₉ не только плохо используются дрожжами, но часто токсичны для них.

Известны микромицеты – деструкторы нефти:

- *Aspergillus* (Gaylarde et al., 1999; Ferrarietal, 1998),
- *Cladosporium, Corollasporium, Cinnunghamella, Dendryphiella, Fusarium* (Ferrari et al., 1998),
- *Gliocladium, Lulworthia, Penicillium* (Britton, 1984; Gaylarde et al., 1999; Ferrari et al., 1998),
- *Variocosporina, Verticillium, Alternaria* (Gaylarde et al., 1999; Bento, Gaylarde et al., 2001).

Известны деструкторы среди цианобактерий:

- *Agmenellumquadruplicatum* (утилизировали фенантрен в качестве субстрата) (Narro et al., 1992; Cerniglia et al., 1980),
- *Anabaena, Oscillatoria* (Cohen, 2002; Cerniglia et al., 1980; Al-Hasan et al., 1994, 2001),
- *Mcrocoleus* (утилизировал алканы) (Sánchez, 2005; Raghukumar et al., 2001),
- *Phormidium faveolarum* (утилизировал алканы и ароматические углеводороды) (Cerniglia et al., 1980; Al-Hasan et al., 1998; Raghukumar et al., 2001),
- *Aphanocapsa* (Raghukumar et al., 2001),
- *Protiitheca* (утилизировал сырую нефть) (Walker et al, 1975),
- *Nostoc* (утилизировал нафталин) (Cerniglia, 2002).

Данные о том, что цианобактерии способны утилизировать углеводороды получены в исследованиях ряда авторов (Cerniglia et al., 1979; Raghukumar et al., 2001; Todd et al., 2002; Sanchez et al., 2005, 2006; Chaillan et al., 2006), но некоторые ученые отмечают, что цианобактериальные маты содержат также бактериальные и грибные штаммы, которые способны к деструкции углеводородов. Кроме того, по мнению некоторых авторов, цианобактерии могут аккумулировать, но не способны включать углеводороды в метаболизм (Al-Hasan et al., 2001). Однако, полисахариды, продуцируемые цианобактериями, способствуют образованию эмульсии нефти в воде, что является первым шагом к биодеструкции нефти (Cohen, 2002).

Ведущая роль в разложении нефтекомпонентов принадлежит микроорганизмам-нефтедеструкторам родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, широко распространенным в биогеоценозах и отличающихся выраженной способностью к биodeградации

углеводород в связи с наличием у них широкого набора ферментных систем (Van Hamme, 2003; Compant, 2005). В хронически загрязненных экосистемах безусловным доминантом являются родококки. Углеводородоокисляющие дрожжи и мицелиальные грибы в загрязненных водных экосистемах занимают второстепенное место (Коронелли, 1996).

Одной из задач четвертого этапа проекта был выбор оптимального состава микроорганизмов для консорциума. Для решения этого вопроса был проведен поиск подходящих микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Образцы собирались с территорий производственных площадок, топливных баз, автотранспортных предприятий, АЗС, СТО, автомоек и автостоянок.

Первичный отбор штаммов осуществлялся по результатам посева колб с селективной средой, содержащей нефть, на агаризованные среды. Затем выделенные культуры помещали индивидуально в пробирки с жидкой средой, содержащей нефть. Первичная биодegradация нефти в пробирках оценивалась по следующим параметрам: разбиванию поверхностной пленки нефти, помутнению питательной среды за счет роста биомассы, образованию однородной эмульсии нефти в среде, газообразованию.

Микроорганизмы, обладающие способностью к активному росту на селективных питательных средах с нефтью, были выделены в чистые культуры. Природные изоляты, которые наиболее эффективно утилизировали нефть по результатам визуального контроля, были идентифицированы по биохимическим и физиологическим признакам.

На основе выделенных микробных изолятов создана коллекция, включающая в себя штаммы бактерий, представителей родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* (всего 64 штамма).

При выборе штамма для разработки препарата обычно следует учитывать такие критерии, как высокая нефтеокисляющая активность, устойчивость к солям тяжелых металлов, непатогенность и нетоксичность штамма для человека и животных (Коронелли, 1996). В связи с тем, что технологии микробиологической очистки загрязненных почв предусматривают аэробные условия, необходимо вести выбор микроорганизма-деструктора среди аэробных и факультативно-анаэробных штаммов. Кроме того, клетки штамма должны обладать высокой жизнестойкостью, чтобы быть способными к росту и утилизации нефтепродукта в условиях широкого диапазона температур, pH среды, влажности, нехватки питательных элементов (Стабникова и др., 1995).

Физиолого-биохимические признаки штаммов-деструкторов рода *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6 были изучены подробно, поскольку благодаря высокой

утилизирующей активности они представляются нам наиболее перспективными для создания ассоциации микроорганизмов.

Rhodococcus ssp TE3 - грамположительные прямые, изогнутые палочки, часто встречаются V-формы. Клетки размером $(0,7-0,80) \times (0,8-2,5)$ мкм, старые культуры распадаются на кокковые формы. Культура неподвижна, кислотонеустойчива. Клетки подвижные, спор не образуют. На мясопептонном агаре через 48 часов дает мелкие, выпуклые, круглые с ровным краем колонии розового цвета по консистенции палочки пастообразные, непрозрачные, блестящие, легко снимаются с агара. При росте на агаризованной среде штамм образует круглые колонии с блестящей или матовой поверхностью, от молочно-белого, сероватого до бежевого или розоватого цвета. В мясопептонном бульоне растет в виде осадка на дне и пленки на поверхности.

По физиологической характеристике *Rhodococcus* ssp TE3 - факультативный аэроб, растет в температурном диапазоне от 10°C до 30°C оптимум 20°C (рис. 1).

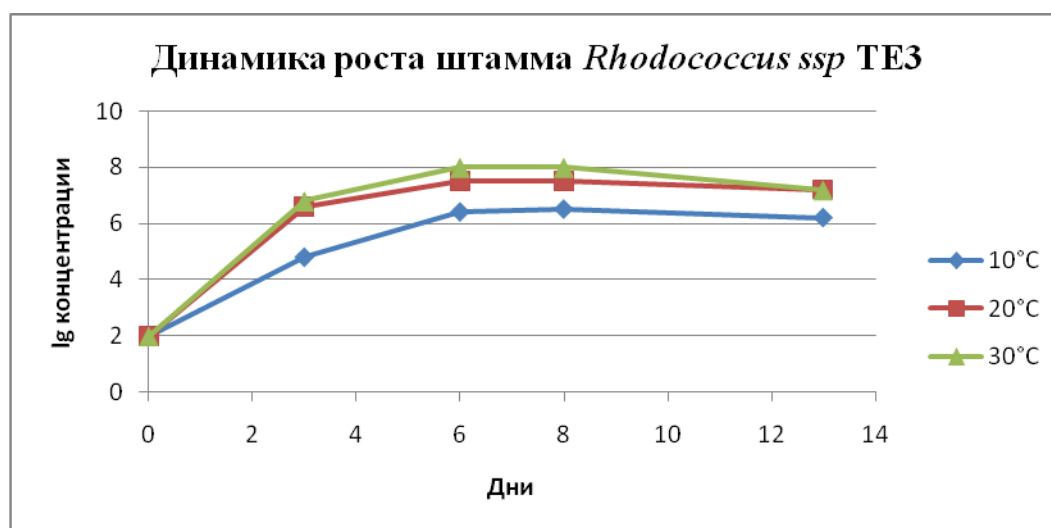


Рис. 1. Динамика роста штамма *Rhodococcus* ssp TE3 при температуре 10°C, 20°C, 30°C.

Rhodococcus ssp TE3 углеводы не окисляет и не сбраживает, кроме глюкозы и манита. Отношение к источникам азота: нитраты не восстанавливает, денитрификация отсутствует, фенилаланин не дезаменирует, протолитической активностью не обладает. Бактерия оксидазоотрицательная, каталазоположительная, обладает уреазной активностью. В дополнительных факторах роста не нуждается.

Штамм *Enterobacter* ssp. NW4 на плотных питательных средах образует белесые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем; клетки штамма

представляют собою граммотрицательные, подвижные палочки, размером 0.8 x 1,7–2 мкм. Штамм *Enterobacter* ssp NW4 является аэробом, растет в диапазоне температур от 4-6 до 35°C; не гидролизует крахмал, казеин, не обладает протеолитической активностью, каталазоположительный, сбраживает глюкозу, лактозу, маннит, мальтозу, сахарозу, сорбит с газообразованием, не разжижает желатин. Обладает цитратной активностью, растет на РПА с концентрацией NaCl 5 %; не обладает гемолитическими свойствами.

Штамм *Acinetobacter* ssp NW9 на плотных питательных средах образует белесые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем; клетки штамма представляют собою граммотрицательные укороченные палочки, размером 1 x 1.2 – 1.5 мкм. Штамм *Acinetobacter* ssp NW9 является аэробом, растет в диапазоне температур от 4-6 до 30°C (рис. 2); не гидролизует крахмал, не разжижает желатин, не образует ацетон, не утилизирует глюкозу, галактозу, ксилозу, рамнозу, дульцит, маннит, мальтозу, арабинозу, сахарозу, сорбит, инозит, лактозу.

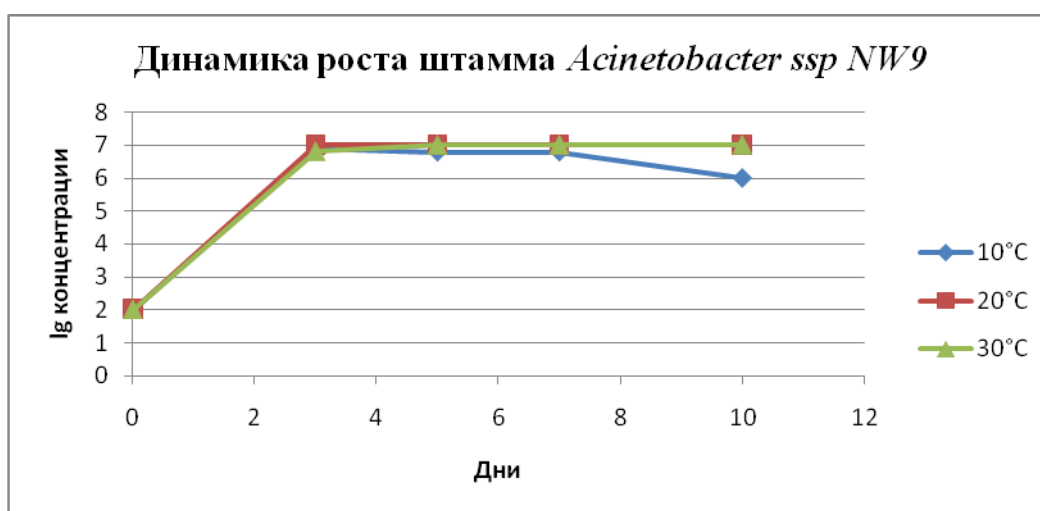


Рис. 2. Динамика роста штамма *Acinetobacter* ssp NW9 при температуре 10°C, 20°C, 30°C.

Обладает цитратной, каталитической, фибринолитической активностью, не обладает липазной, плазмокоагулазной, оксидазной, лецитиназной, уреазной, казеинолитической активностью на молочном агаре, гемолитическими свойствами.

Штамм *Pseudomonas* ssp CP6 на плотных питательных средах образует белесые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем; клетки штамма представляют собою граммотрицательные укороченные палочки по 1-2 и в коротких цепочках, размером 0.9 – 1.0 x 1,5 – 1.8 мкм. Штамм *Pseudomonas* ssp CP6 является аэробом, растет в диапазоне температур от 4-6 до 35°C; не гидролизует крахмал, не

разжижает желатин, не образует ацетоин, не утилизирует глюкозу, лактозу, галактозу, ксилозу, рамнозу, дульцит, маннит, мальтозу, арабинозу, сахарозу, сорбит, инозит. Обладает каталитической, оксидазной активностью, казеинолитической на молочном агаре, не обладает цитратной, лецитиназной, липазной, уреазной активностью, гемолитическими, фибринолитическими, плазмокоагулазными свойствами.

Штамм *Pseudomonas* ssp CP9 на плотных питательных средах образует белесые, полупрозрачные, блестящие, гладкие колонии с ровным краем; клетки штамма представляют собою грамотрицательные укороченные палочки, размером 0.9 – 1.0 x 1,5 – 1.8 мкм. Штамм *Pseudomonas* ssp CP9 является аэробом, растет в диапазоне температур от 4-6 до 35°C; не гидролизует крахмал, не разжижает желатин, не образует ацетоин, не утилизирует глюкозу, лактозу, галактозу, ксилозу, рамнозу, дульцит, маннит, мальтозу, арабинозу, сахарозу, сорбит, инозит. Обладает цитратной, оксидазной активностью, не обладает каталазной, казеинолитической на молочном агаре, лецитиназной, липазной, уреазной активностью, гемолитическими, фибринолитическими, плазмокоагулазными свойствами.

Крайне важным критерием применимости нефтеокисляющих бактерий для биоочистки загрязненных территорий является безопасность для человека и животных. На лабораторных животных были изучены показатели вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности шести наиболее активных бактериальных штаммов. Установлено, что все эти природные штаммы отвечают требованиям, предъявляемым к микроорганизмам 4-го класса опасности.

Для выбора штаммов-деструкторов для композиции, для оценки спектра деструкции и дальнейшей разработки ассоциации для сибирского региона был проведен газохроматографический анализ нефти после утилизации штаммами *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp MP6, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9.

Все выбранные штаммы показали сходную картину газохроматографического анализа нефти (рис. 3.)

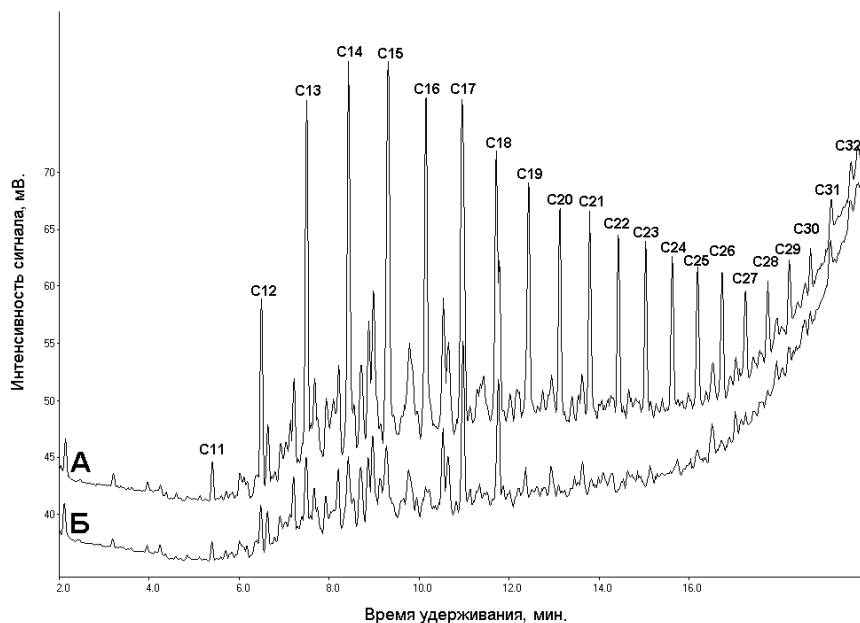


Рис. 3. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта нефти без добавления деструкторов (А) и после биодеструкции штаммом *Enterobacter ssp* NW4 (Б) в течение 14 суток инкубирования при температуре 4°C и рН среды 7.0.

Наибольший процент потерь, равный 70-90%, наблюдается у низкомолекулярных фракций, в то время как остальные фракции имеют потери от 40 до 60%. Также стоит отметить, что разветвленные углеводороды утилизируются данными бактериями хуже, чем нормальные.

Следует выделить штамм *Rhodococcus ssp* TE3. После биодеградации штаммом *Rhodococcus ssp* TE3 в течение 14 сут при температуре 20 - 23°C тяжелые углеводороды C₂₁-C₃₈ утилизированы полностью, что подчеркивает уникальность штамма.

В разных условиях эксперимента (добавление в питательную среду соли, изменение рН, температуры, нефть из разных месторождений) скорость утилизации нефти штаммами *Rhodococcus ssp* TE3, *Enterobacter ssp* NW4, *Acinetobacter ssp* NW9, *Pseudomonas ssp* CP6, *Pseudomonas ssp* CP9, *Pseudomonas ssp* MP6 оставалась высокой (табл. 1).

Таблица 1. Степень деструкции нефти микроорганизмами в разных условиях.

Образец	Степень деструкции нефти, %					
	pH 5	pH 9	NaCl 5%	NaCl 10%	20°C	4°C
<i>Rhodococcus</i> ssp TE3	86	75	70	65	86	75
<i>Enterobacter</i> ssp NW4	87	75	78	73	92	86
<i>Acinetobacter</i> ssp NW9	85	74	70	65	87	71
<i>Pseudomonas</i> ssp CP6	85	76	73	64	87	76
<i>Pseudomonas</i> ssp CP9	81	67	73	61	79	61
<i>Pseudomonas</i> ssp MP6	73	61	71	61	81	72

Так же была оценена динамика роста выбранных штаммов на различных источниках углерода, которую оценивали нефелометрически по изменению оптической плотности суспензии микроорганизмов (фотоколориметрирование при длине волны 590 нм) в процессе культивирования в жидкой селективной питательной среде 8Е (г/л): ((NH₄)₂HPO₄ – 1,5 г/л; KH₂PO₄ – 0,7 г/л; MgSO₄ x 7H₂O – 0,8 г/л; NaCl – 0,5 г/л; pH 7.2) (на качалке при 220 об/мин), с добавлением в качестве источника углерода различных углеводов (табл. 2).

Таблица 2. Показатели роста некоторых углеводородокисляющих культур на среде с различными источниками углерода.

Культура	0 сутки, %	2 сутки, %				4 сутки, %			
		Бензин	Бензол	Дизельное топливо	нефть	Бензин	Бензол	Дизельное топливо	нефть
<i>Rhodococcus</i> ssp TE3	100	118	138	274	121	600	132	400	426
<i>Enterobacter</i> ssp NW4	100	57	55	300	403	119	66	241	632
<i>Acinetobacter</i> ssp NW9	100	64	116	122	198	98	121	139	371
<i>Pseudomonas</i> ssp CP6	100	80	107	87	238	87	121	85	288
<i>Pseudomonas</i> ssp CP9	100	50	46	112	201	55	45	135	236
<i>Pseudomonas</i> ssp MP3	100	36	68	57	125	26	51	50	131

Рост на среде с бензолом продемонстрировали 3 из 6 культур, на среде с бензином - 2 культуры, с дизельным топливом — 4 культуры. На среде с нефтью росли все выделенные культуры. 4 культуры характеризовались способностью расти на средах с

добавлением в качестве источника углерода 3 различных углеводородов (бензин, дизельное топливо и нефть).

Особо следует отметить штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, которые эффективно окисляют ароматические и нециклические компоненты. Особенно важной является способность к росту на ароматических углеводородах, таких как толуол, бензол и ксилол, которые в естественных условиях и при биоремедиации разлагаются сложнее всего.

Оптимум роста во время утилизации большинства источников углерода, для штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6 находится в пределах значений pH 9-12, что позволяет применять эти культуры в щелочных условиях среды.

Важно, что штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6, наиболее перспективные для биотехнологических разработок по нефтеутилизирующей способности, являются, согласно полученным данным, психротолерантными и солеустойчивыми. Это предполагает возможность их использования в засоленных природных субстратах при пониженных температурах.

2. Изучение свойств композиции

Чувствительность компонентов нефти к химическим и биологическим агентам различна. Парафиново-нафтеновая фракция устойчива к химическим воздействиям, но легко поддается ферментативному окислению (Чугунов и др., 2000; Хомякова и др., 2003). Легкие n-алканы утилизируются микроорганизмами с заметно большей скоростью, чем изоалканы (Чугунов и др., 2000).

Циклопарафины и ароматические углеводороды, напротив, более чувствительны к химическому окислению, чем к биологическому (Коронелли, 1996; Marchal et al., 2003).

Трудно утилизируемыми субстратами для микроорганизмов являются тяжелые фракции нефти, такие как мазут и его компоненты: бензольные смолы, масла, асфальтены (Белоусова и др., 2002). Эти компоненты малодоступны микроорганизмам, процесс их метаболизма идет очень медленно, иногда десятки лет. В целом при окислительной деградации нефти в почвах, независимо от того, происходит механическое вымывание загрязняющих веществ или нет, идет накопление смолисто-асфальтеновых веществ. Разрушение и вынос компонентов углеводородных фракций происходят гораздо быстрее.

Таким образом, углеводороды разрушаются микроорганизмами избирательно в следующей убывающей последовательности: n-алканы – разветвленные алканы – ароматические углеводороды – циклические углеводороды (Cohen, 2002).

Биологическая деструкция заключается в постепенном превращении парафинистых нефтей в циклопарафиновые в силу избирательного потребления микроорганизмами углеводородов ряда метана. В процессе биodeградации происходит повышение плотности нефтей и увеличение доли смолистых соединений. Это увеличение происходит не только за счет уменьшения доли других компонентов и более высокой устойчивости смол, но и за счет их новообразования в процессе трансформации нефти. За счет остаточного накопления увеличивается концентрация нафтеновых и ароматических углеводородов (Петров, 1984). Одним из показателей биологического окисления нефти является относительное увеличение количества изопреноидных структур - пристана и фитана.

Наиболее быстро снижается содержание углеводородов с меньшим количеством ядер в структуре: нафталинов, бензфлуоренов, фенантронов, хризенов. Медленнее всего происходит снижение пиренов, которые являются, по видимому, наиболее устойчивыми среди углеводородов данного класса.

Способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные эмульгирующие агенты является ключевой в биodeградации углеводородов нефти. Биоэмульгаторы, выделяемые микроорганизмами, содержат в своем составе анионные амфифильные (растворяющиеся и в воде, и в жирах) полисахариды, липополисахариды, протеины, липопротеины, биополимеры, способствующие стабилизации эмульсии в воде (Rosenberg, 1999; Ron, Rosenberg, 2001).

Биологический метод очистки от нефтяных загрязнений основан на внесении препаратов, представляющих собой биомассу микроорганизмов, использующих нефтяные углеводороды в качестве источника энергии и трансформирующие их в органическое вещество собственной биомассы.

Использование биопрепаратов, созданных на основе ассоциаций культур-нефтедеструкторов, способных окислять широкий спектр углеводородов нефти – от длинноцепочечных алканов до полиароматических соединений, позволяет рекультивировать нефтезагрязненные территории. Биопрепараты предназначены для очистки от нефти и нефтепродуктов, для восстановления функций самоочищения почвы и водоёмов, очистки сточных вод промышленных предприятий, очистки стоков автомоек, СТО, АЗС, территорий предприятий нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности, депарафинизации скважин, технических резервуаров.

Большой популярностью пользуются микробные препараты, предлагаемые в широком ассортименте биотехнологическими компаниями Европы, США и Японии. Однако, как свидетельствует практика, применение заполнивших российский рынок зарубежных бакпрепаратов, разработанных для районов, по климатическим и экологическим условиям резко отличающихся от регионов России, оказывается малоэффективным.

Среди отечественных препаратов наибольшую известность получили «Деворойл», «Ленойл», «Путидойл», «Белвитамил», «Нафтокс», «Биоприн». Эти препараты разрешены к применению Государственным Комитетом санитарно-эпидемиологического надзора при Президенте РФ и экспертной комиссией главного управления государственной экологической экспертизы Минприроды России.

Однако, несмотря на широкий спектр предлагаемых продуктов, ведется постоянный поиск новых микроорганизмов-нефтедеструкторов и их ассоциаций и изучение их свойств с целью повышения эффективности очистки нефтезагрязнённых территорий.

В состав ряда препаратов входят монокультуры (Путидойл, Экойл, Дестройл и др.) или ассоциации с двумя и более чем двадцатью видами различных нефтеокисляющих микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей (Деворойл, Simbinal, Родоторин) (табл. 3).

В последнее время все чаще используют биопрепараты, состоящие из 2 и более штаммов, поскольку интродукция монокультуры углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненную среду не может полностью решить проблему очистки. Нефть – сложный многокомпонентный субстрат, содержащий несколько сотен различных химических соединений (Барышникова и др., 2001), и один штамм не способен обладать всем спектром ферментов, необходимых для биodeградации. Использование же нескольких штаммов, отличающихся по спектру потребляемых субстратов, сопровождается полной деструкцией нефти (Кобзев и др., 2001) В условиях природного микробоценоза наблюдается одновременная ассимиляция разных фракций нефти различными группами микроорганизмов (Шкидченко, Аринбасаров, 2001).

При совместном использовании нескольких штаммов-деструкторов в консорциуме их нефтеутилизирующий эффект усиливается. Причинами этого являются:

- разное приоритетное использование составляющих компонентов нефти различными штаммами;
- разная скорость роста микроорганизмов;
- продуцируемые штаммом метаболиты, которые могут являться факторами роста для других штаммов консорциума.

Таблица 3. Применяемые для биоремедиации коммерческие препараты на основе нефтеокисляющих микроорганизмов.

Препарат для биоремедиации	Входящие в состав препарата микроорганизмы
Деградойл	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Путидойл	<i>Pseudomonas putida</i> на модифицированном торфе
Экойл	<i>Pseudomonas sp.</i>
Эконадин	<i>P. fluorescens</i> на сфагнувом торфе
Дестройл	<i>Acinetobacter sp.</i>
Деворойл	<i>Rhodococcus sp.</i> (два вида), <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida sp.</i>
БАК	<i>Rhodococcus sp.</i> (несколько штаммов)
Десна	<i>Bacillus megaterium</i>
Бациспецин	<i>Bacillus sp.</i>
Simbinal	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Arthrobacter globiformis</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Flavobacterium tirrenicum</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicilium frequentans</i>
Родоторин	комплекс грибов и бактерий на сорбентах – капроне и полистироле

При этом необязательно чтобы консорциум состоял только из нефтедеструкторов. Возможно, наиболее эффективным будет взаимодействие нескольких активных нефтедеструкторов, ориентированных на разные фракции нефти, и нескольких гетеротрофных микроорганизмов, не обладающих углеводородокисляющей способностью, но способных ассимилировать продукты промежуточного окисления углеводородов, часто токсичных для углеводородокисляющих организмов. Проблема создания подобных консорциумов состоит в том, что очень сложно оценить потенциал углеводородокисляющих ферментных систем, а также трофические связи внутри сообщества. Необходимо отметить, что создание универсального биопрепарата (консорциума микроорганизмов, спроектированного специально для задач биоремедиации) невозможно по ряду причин:

- нефти разных месторождений отличаются друг от друга по фракционному и композиционному составу;
- в практике биоремедиации приходится сталкиваться не только с нефтяными загрязнениями, но и с загрязнениями нефтепродуктами, которые резко отличаются по химическим свойствам от исходной нефти;
- районы добычи, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов значительно отличаются друг от друга по природно-климатическим и гидротермическим условиям.

Кроме биологического компонента в состав биопрепаратов обычно входят сорбенты, консерваторы, стабилизаторы (сахароза, борная кислота, бензойная кислота, бензоилгрюн (малахитовый зеленый), полиэтиленгликоль) активаторы роста и азотно-фосфорно-калиевая минеральная составляющая, необходимая для осуществления биоремедиационных процессов. Для борьбы с нефтяными пленками и нефтеразливами в труднодоступных для механизмов местах применяются различные сорбенты органического, минерального происхождения или на основе полимеров. Несмотря на получение первичного экологического эффекта: разрыв сплошного пленочного загрязнения, сорбция растворенных и эмульгированных нефтей, они имеют и существенный недостаток - требуют сбора и утилизации, которые не всегда на практике осуществимы.

Такие добавки, как дрожжевой автолизат и биотрин, воздействуют непосредственно на клетки бактерий-деструкторов выполняя роль факторов роста. Вещества, обладающие поверхностной активностью, действуют на нефтяной слой, диспергируя его в водной среде. Известно, что эмульгирование нефти и нефтепродуктов в водной среде интенсифицирует их биодеструкцию (Ягафарова и др., 2002). Условия применения большинства биопрепаратов требуют организации доступа кислорода в почву, поддержания влажности грунта не ниже 40% регулярным дождеванием и переворачиванием. Рабочий pH биопрепаратов обычно от 5 до 9, рабочая температура от +10 до +40° С. При понижении температуры окружающего воздуха до +5° С рост бактерий замедляется, вплоть до полной остановки биологической активности. При последующем повышении температуры микроорганизмы вновь начинают размножаться.

Природное микробное сообщество почвы, включающее большое количество бактерий-деструкторов, при небольших дозах загрязнения справляется с разложением нефтяных углеводородов, поэтому рациональнее создавать подходящие условия для деятельности аборигенных бактерий, чем интродуцировать новые виды. Однако, в случае северных экосистем с обедненным видовым разнообразием и лимитирующими количествами

питательных веществ, целесообразнее использование биопрепаратов. Внесение адаптированных микроорганизмов, разрушающих нефтепродукты, также рекомендуется в случае, если физико-химические характеристики места загрязнения делают невозможным рост естественной микробиоты (высокие концентрации тяжелых металлов, засоленность почвы, экстремальные значения pH и др.).

В результате работы были выбраны штаммы, которые отличались наибольшей скоростью и эффективностью процесса утилизации нефти. Это были штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp MP6, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9.

При интродукции микроорганизмов в загрязненные объекты одной из основных проблем является поиск отдельных активных монокультур или ассоциаций, обеспечивающих наибольшую степень утилизации органических загрязнителей. С другой стороны, необходимо учитывать сложные конкурентные отношения интродуцированных деструкторов с аборигенными микроорганизмами.

Все выбранные штаммы тестированы на антагонизм друг к другу. Типичная картина эксперимента представлена на рисунке 4.

В результате этих лабораторных исследований было установлено, что бактерии, выбранные для консорциума, не проявляют антагонистических свойств по отношению друг к другу.

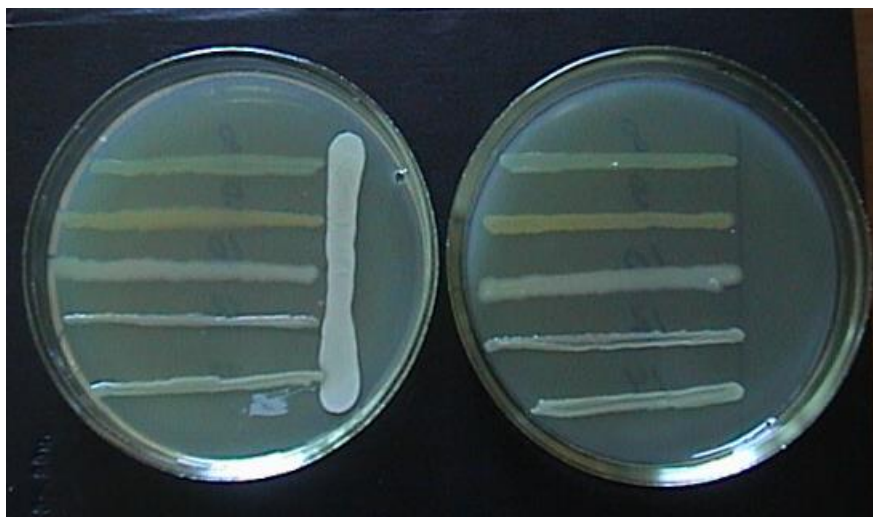


Рис. 4. Эксперимент на антагонизм культур микроорганизмов.

Лучшие результаты по деструкции нефти и нефтепродуктов были показаны у штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, которые были объединены в микробную ассоциацию.

По отношению к штаммам ассоциации в качестве тест-штаммов исследовано пятьдесят почвенных бактериальных изолятов, относящихся к разным таксономическим группам.

Наличие антагонизма к эндогенной микробиоте почв у этих штаммов не отмечено. Следовательно, при внесении больших количеств биомассы ассоциации штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9 не будет наблюдаться угнетения местной микробиоты и вытеснения старых видов микроорганизмов.

Полученная ассоциация из 3 штаммов была изучена на способность к деструкции нефти при низких положительных температурах (рис. 5-7, табл. 4).

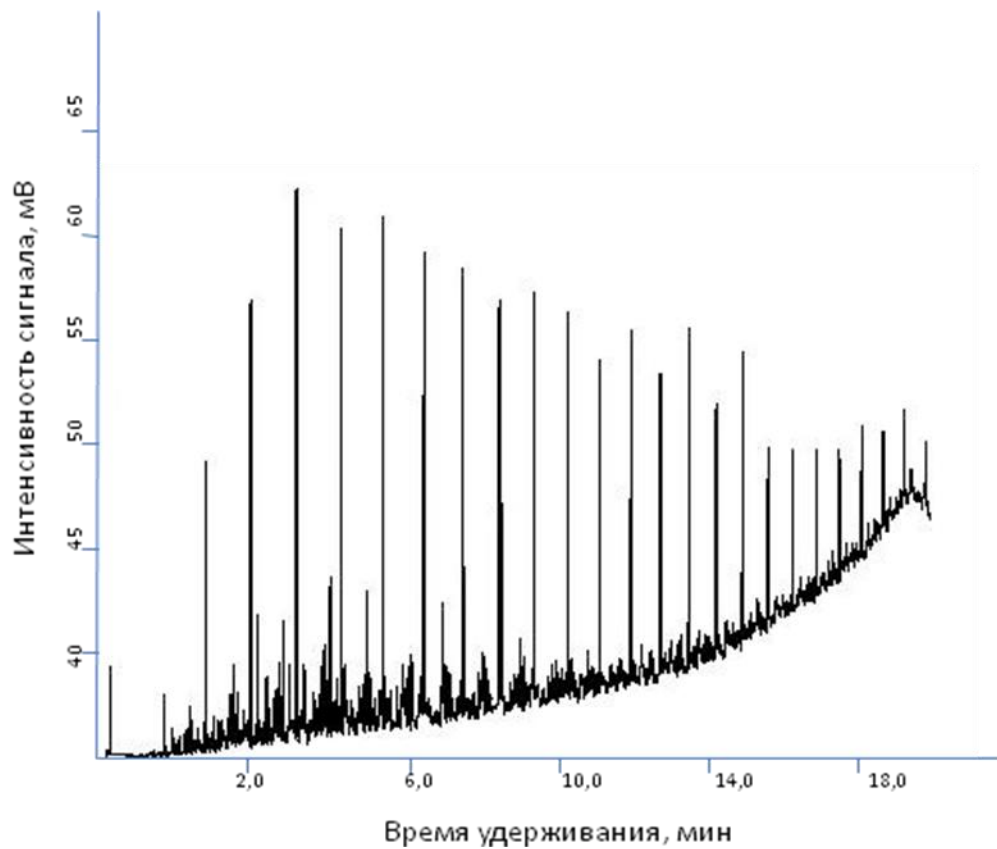


Рис. 5. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта нефти без добавления деструкторов в течение 14 суток инкубирования при температуре 10°C и pH среды 5.0.

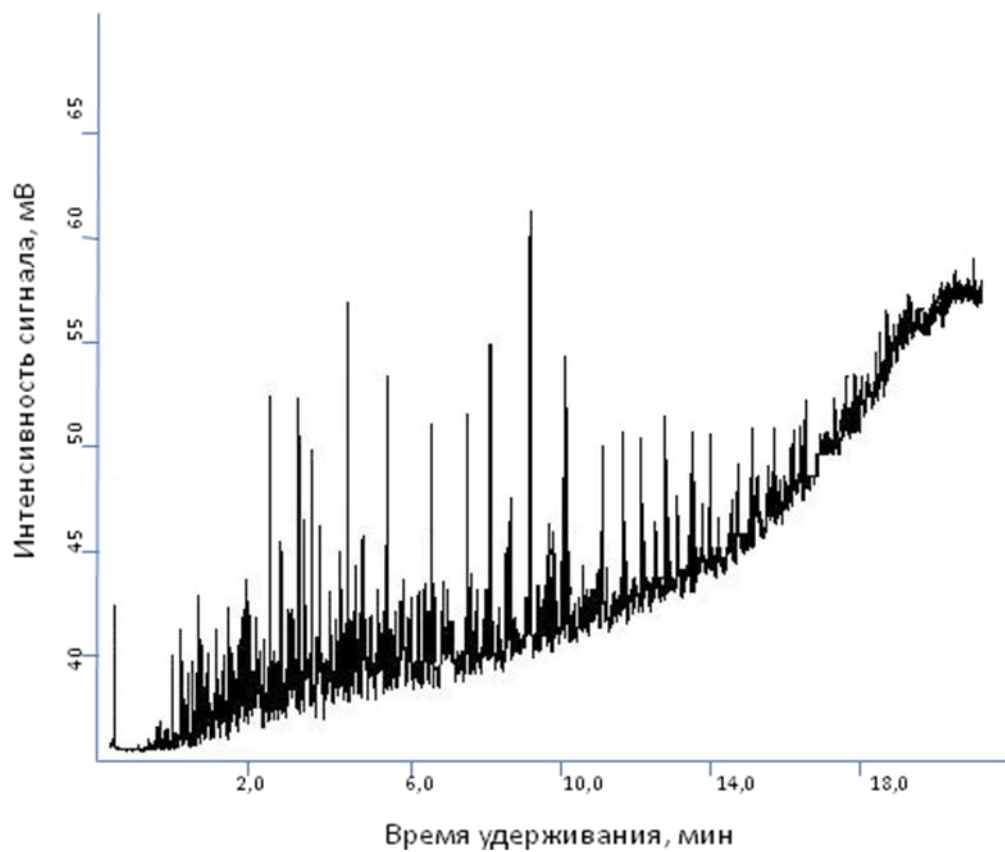


Рис. 6. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта нефти после биодеструкции штаммом *Acinetobacter* ssp NW9 в течение 14 суток инкубирования при температуре 10°C и рН среды 5.0.

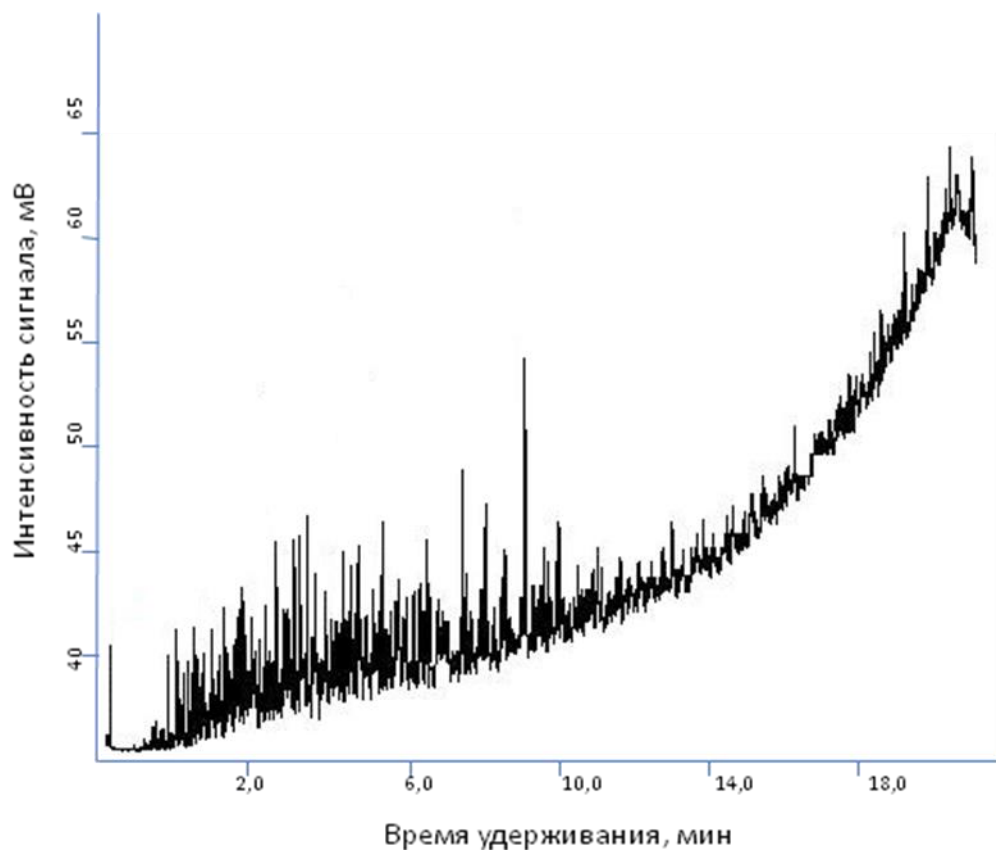


Рис. 7. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта после биодеструкции ассоциацией штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9 в течение 14 суток инкубирования при температуре 10°C и pH среды 5.0.

Таблица 4. Газохроматографический анализ нефти после биодеструкции штаммом *Acinetobacter* ssp NW9 и ассоциацией штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9.

	Время удержания, мин.	Интенсивность сигнала в % от контроля (штамм <i>Acinetobacter</i> ssp NW9)	Интенсивность сигнала в % от контроля (ассоциация штаммов)	Вещество
1	3.701	86.81	74.81	Диэтиловый эфир угольной кислоты
2	11.400	73.77	53.77	Декан C ₁₀ H ₂₂
3	17.244	31.48	21.58	Ундекан C ₁₁ H ₂₄
4	23.677	32.99	12.99	Додекан C ₁₂ H ₂₆
5	24.564	118.88	101.458	2,6-Диметил-ундекан C ₁₃ H ₂₈
7	30.154	41.36	21.86	Тридекан C ₁₃ H ₂₈
9	36.458	17.51	8.26	Тетрадекан C ₁₄ H ₃₀
11	42.491	63.74	33.45	Пентадекан C ₁₅ H ₃₂
12	48.238	23.60	14.38	Гексадекан C ₁₆ H ₃₄
14	53.709	37.44	11.43	Гептадекан C ₁₇ H ₃₆
16	58.932	24.78	17.59	Октадекан C ₁₈ H ₃₈
17	59.369	103.65	123.84	2,6,10,14-Тетраметилгексадекан C ₂₀ H ₄₂
18	63.895	32.57	12.87	Нонадекан C ₁₉ H ₄₀
19	68.657	13.67	9.38	Эйкозан C ₂₀ H ₄₂
20	73.209	17.49	8.26	Генэйкозан C ₂₁ H ₄₄
21	77.572	10.68	6.24	Докозан C ₂₂ H ₄₆
22	81.762	9.87	5.27	Трикозан C ₂₃ H ₄₈
23	85.790	3.64	1.14	Тетракозан C ₂₄ H ₅₀
24	89.677	4.21	0.68	Пентакозан C ₂₅ H ₅₂
25	93.407	4.17	0.47	Гексакозан C ₂₆ H ₅₄
26	97.002	3.27	0.47	Гептакозан C ₂₇ H ₅₆
27	100.484	5.21	0.58	Октакозан C ₂₈ H ₅₈
28	103.852	3.45	1.45	Нонакозан C ₂₉ H ₆₀
29	107.117	21.88	10.85	Триаконтан C ₃₀ H ₆₂
30	110.275	46.74	36.13	Гентриаконтан C ₃₁ H ₆₄
31	113.351	59.78	39.38	Дотриаконтан C ₃₂ H ₆₆
32	116.313	76.76	56.16	Тритриаконтан C ₃₃ H ₆₈

Были проведены сравнительные эксперименты при разных температурах для определения влияния температуры на скорость и степень деструкции нефтепродуктов ассоциацией штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9. Температура культивирования влияет только на скорость деструкции. При температуре +10 °С степень деструкции твердых алканов на 15-21 % ниже по сравнению со степенью деструкции при температуре +20 °С.

Преимуществом предлагаемого консорциума штаммов микроорганизмов является способность расти на обедненной питательной среде, а также высокая скорость окисления нефти и нефтепродуктов, что позволяет эффективно использовать его при биологической очистке почв, почвогрунтов и вод, загрязненных нефтепродуктами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Решение проблемы антропогенного загрязнения окружающей среды нефтью относится к первоочередным экологическим задачам. Поскольку объёмы добычи, транспортировки и переработки этого сырья очень велики, то и связанные с этим утечки, разливы при авариях имеют глобальный масштаб. В период с 1990 по 1999 года приблизительный объём нефтяных загрязнений одних только морских акваторий составил более 3 000 000 тонн. Несмотря на то, что нефть и её компоненты подвергаются естественному разложению, процесс самовосстановления загрязненной среды является очень длительным. Без проведения широкомасштабных и эффективных мероприятий по ликвидации последствий попадания нефти и нефтепродуктов в окружающую среду, количество загрязнённых территорий будет неуклонно расти. Такие распространённые методы, как механический сбор, отжим и выжигание нефти, вывоз и захоронение загрязнённой почвы, не только являются неэффективными, но и могут нанести дополнительный вред окружающей среде. Важными задачами являются разработка и усовершенствование высокоэффективных и безопасных способов очистки загрязнённых территорий в основе которых лежат процессы, происходящие при ауторемедиации.

Активность микроорганизмов является одним из главных факторов, способствующих, естественной очистке почв и водоёмов. Способность микроорганизмов, к деградации различных загрязнителей, в том числе и углеводов – основных компонентов нефти, известна давно и интенсивно изучается. Большое внимание уделяется процессам биологической ремедиации природных экосистем. Биоремедиация обеспечивает экономически выгодную, высокоспецифичную и экологически безопасную очистку, приводящую к уменьшению концентрации поллютантов.

Основную роль в ремедиации *in situ* играет биологический фактор – активность микроорганизмов, участвующих в процессах утилизации и трансформации углеводов нефти. Препятствиями для эффективной очистки окружающей среды являются низкая температура, повышенная концентрация соли, низкое содержание питательных веществ, отсутствие или низкая деградативная активность природных микробных популяций.

В связи с тем, что в состав нефти входит большое количество различных химических соединений, один штамм не способен обладать всем спектром ферментов, необходимых для биodeградации этих компонентов. Внесение нескольких штаммов в загрязненный субстрат, отличающихся по спектру потребляемых веществ, позволяет утилизировать нефть более эффективно. В условиях природного микробиоценоза наблюдается одновременная ассимиляция разных фракций нефти различными группами микроорганизмов. Это связано с разным приоритетным использованием составляющих

компонентов нефти различными штаммами, разной скоростью роста микроорганизмов, продуцируемыми метаболитами, которые могут являться факторами роста для других штаммов-деструкторов.

Одним из основных методов биоремедиации *in situ* (на месте загрязнения) является интродукция микроорганизмов в места загрязнения. Суть этого метода заключается во внесении в почву биопрепарата, включающего в себя биомассу жизнеспособных клеток одного или нескольких активных штаммов углеводородокисляющих бактерий. При этом в почве формируется конкурентоспособная ассоциация микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Поэтому четвертый этап работы был посвящен разработке композиции микроорганизмов-нефтедеструкторов. Для решения этой задачи был проведен подбор оптимального состава микроорганизмов, исключая антагонистические отношения в композиционной массе; изучены свойства композиции: ростовые свойства, отсутствие угнетения местной микробиоты, общий спектр утилизации нефтепродуктов.

Поиск подходящих микроорганизмов нефтедеструкторов был проведен из образцов почвы, воды, собранных с территорий АЗС, автотранспортных предприятий, СТО, автомоек, автостоянок.

На основе выделенных микробных изолятов (проявляющих нефтеутилизирующие свойства) была создана коллекция, включающая в себя штаммы бактерий, представителей родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* (всего 64 штамма).

Согласно таким критериям, как высокая нефтеокисляющая активность, устойчивость к солям тяжелых металлов, непатогенность и нетоксичность штамма для человека и животных оптимальным для дальнейших исследований являлись штаммы *Rhodococcus ssp* TE3, *Enterobacter ssp* NW4, *Acinetobacter ssp* NW9, *Pseudomonas ssp* CP6, *Pseudomonas ssp* CP9, *Pseudomonas ssp* MP6.

В разных условиях эксперимента (добавление в питательную среду соли, изменение pH, температуры, нефть из разных месторождений) утилизация n-алканов штаммами *Rhodococcus ssp* TE3, *Enterobacter ssp* NW4, *Acinetobacter ssp* NW9, *Pseudomonas ssp* CP6, *Pseudomonas ssp* CP9, *Pseudomonas ssp* MP6 оставалась высокой.

Оценена динамика роста выбранных штаммов на различных источниках углерода. Рост на среде с бензолом продемонстрировали 3 из 6 выбранных культур, на среде с бензином - 2 культуры, с дизельным топливом — 4 культуры. На среде с нефтью росли все выделенные культуры. 4 культуры характеризовались способностью расти на средах с

добавлением в качестве источника углерода 3 различных углеводородов (бензин, дизельное топливо и нефть).

Особо следует отметить штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, которые эффективно окисляют ароматические и нециклические компоненты. Особенно важной является способность к росту на ароматических углеводородах, таких как толуол, бензол и ксилол, которые в естественных условиях и при биоремедиации разлагаются сложнее всего.

Оптimum роста во время утилизации большинства источников углерода для штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6 находится в пределах значений pH 9-12, что позволяет применять эти культуры в щелочных условиях среды.

Важно, что штаммы *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9, *Pseudomonas* ssp CP6, *Pseudomonas* ssp CP9, *Pseudomonas* ssp MP6, наиболее перспективные для биотехнологических разработок по нефтеутилизирующей способности, являются, согласно полученным данным, психротолерантными и солеустойчивыми. Это предполагает возможность их использования в засоленных природных субстратах при пониженных температурах.

При разработке ассоциации микроорганизмов необходимо учитывать не только высокую степень утилизации органических загрязнителей, но и сложные конкурентные отношения интродуцированных деструкторов с аборигенными микроорганизмами.

В результате исследований было установлено, что бактерии-нефтедеструкторы, выбранные для консорциума, не проявляют антагонизма по отношению друг к другу и эндогенной микробиоте. Следовательно, при внесении больших количеств биомассы ассоциации штаммов *Rhodococcus* ssp TE3, *Enterobacter* ssp NW4, *Acinetobacter* ssp NW9 не будет наблюдаться угнетения местной микробиоты и вытеснения старых видов микроорганизмов.

Преимуществом предлагаемого консорциума штаммов микроорганизмов является способность расти на обедненной питательной среде, а также высокая скорость окисления нефти и нефтепродуктов, что позволяет эффективно использовать его при биологической очистке почв, почвогрунтов и вод, загрязненных нефтепродуктами.

Таким образом, задачи четвертого этапа проекта ГК № 16.740.11.0681 «Разработка комплексной композиции на основе микроорганизмов для утилизации нефтесодержащих техногенных отходов (нефтепродуктов)» выполнены в полном объеме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аушева Х.А. Разработка новой формы биопрепарата для очистки водных объектов от тонких нефтяных пленок: Автореферат дис. ... канд. техн. наук. - М., 2007. - 21 с.
2. Белоусова Н.И., Барышникова Л.М., Шкидченко А.Н. Отбор микроорганизмов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при пониженных температурах. // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – Т. 38. - № 5. - С. 513-517.
3. Биологическая рекультивация на Севере (вопросы теории и практики). Ред. Арчегова И.Б. Коми научный центр УрО РАН, Сыктывкар, 1992. - 104 с.
4. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Ред. Глазовская М.А. – М.: «Наука», 1988. – 239 с.
5. Градова Н.Б., Горнова И.Б., Эддауди Р., Салина Р.Н. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим. и микробиол. - 2003. - Т. 39. - №3. - С. 318-321.
6. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство. СПб. 2000. 248с.
7. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. М.: МГУ, 2005. – 445 с.
8. Кобзев Е.Н. Биодеструкция нефти и нефтепродуктов микробными ассоциациями в модельных системах. Дисс. канд. биол. наук. Оболенск. 2002. 179 с.
9. Консорциум дрожжей *Candida maltosa* для биодеградации нефтезагрязнений: пат. Рос. Федерация: 2114174 С1. Кузнецов П.А., Авчиева П.Б.; заявитель и патентообладатель Кузнецов П.А. 05.06.97. 4 с.
10. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде // Прикл. биохим. и микробиол. – 1996. - Т. 32. - №6. - С. 579 – 585.
11. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. - 1994. - Т. 63. - Вып. 5. - С. 917-923.
12. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Коростина О.А. Модель нефтеотмывания загрязненного почвогрунта под действием *Rhodococcus*-биосурфактанта // Российский журнал биомеханики. - 2006. - Т. 10. - № 1. - С. 59-67.

13. Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф., Четвериков С.П., Силищев Н.Н. Оценка эффективности нового биопрепарата «Ленойл» для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Биотехнология. - 2004. - № 1. - С. 77-82.
14. Панченко Л.В., Турковская О.В., Дубровская Е.В., Муратова А.Ю. Методические рекомендации по биорекультивации нефтезагрязненных земель. Изд-во Саратовского Ун-та. - 2003. – 28 с.
15. Петров Ал. А. Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. - 264 с Суржко и др., 1995;
16. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Демаков В.А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* деструктор полихлорированных бифенилов. Патент № 2262531. Опубликовано 20.10.2005 г.
17. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В. Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв. // Прикл. биохим. и микробиол. - 1995. - Том 31. - №5. - С. 534 - 539.
18. Суржко Л. Ф., Финкельштейн З. И., Баскунов Б. П., Янкевич М. И., Яковлев В. И., Головлева Л. А. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. - 1995. – Т. 64. - № 3. - С.393-398.
19. Хомякова Д. В., Ботвинко И. В., Нетрусов А. И. Выделение психроактивных углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим и микробиол. – 2003. - Т. 39. - № 6. - С. 661 – 664),
20. Чугунов В. А., Ермоленко З. М., Жиглецова С. К., Мартовецкая И. И., Миронова Р. И., Жиркова Н. А., Холоденко В. П., Ураков Н. Н. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикл. биохим и микробиол. - 2000. – Т. 36. - № 6. – С. 666-671
21. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 38. – № 5. – С. 509-512.
22. Ягафарова Г.Г. Экологическая биотехнология в нефтегазодобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности. - Учеб.пособие. – Уфа, 2001. - 213 с.
23. Ягафарова Г.Г., Хлесткин Р.Н., Ягафаров И.Р. Испытания биопрепарата “Родотрин” для ликвидации нефтяных загрязнений на территории Татарстана // Нефтепереработка и нефтехимия. –1998. - №7. – С. 45-47.
24. Aislabie J., Foght J., Saul D. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. // Polar. Biol. - 2000. - Vol. 23. - P. 183-188

25. Al-Hasan R.H., Al-Bader D.A., Sorkhoh N.A., Radwan S.S. Evidence for n-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf // *Marine Biology*. – 1998. – V. 91. – No 3. – P. 533–540.
26. Al-Hasan R.H., Khanafer M., Eliyas M., Radwan S.S. Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf // *J. Appl. Microbiol.* – 2001. – V. 91. – No 3. – P. 533-540.
27. Al-Hasan R.H., Sorkhoh N.A., Al-Bader D., Radwan S.S. Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf // *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1994. – V. 41. - No 5. – P. 615–619
28. Baraniecki C.A., Aislabie J., Foght M. Characterization of *Sphingomonas* Ant-17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil // *Microbial ecol.* – 2002. – V. 43. – No 1. – P. 44-54;
29. Bento F.M., Gaylarde C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2001. – V. 47. – No 2. – P. 107–112
30. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D. Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culturebased, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – No 10. – P. 6143–6151
31. Britton L.N. Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons. In: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Gibson D.T. (Ed.). Marcel Dekker, New York. – 1984. - P. 89-129
32. Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *Biodegradation*. – 2002. - V. 3. – No 2-3. – P. 351-368.
33. Cerniglia C.E., Baalen C.V., Gibson D.T. Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria sp.*, strain JCM // *J. Gen. Microbiol.* – 1980. – V. 116. – No 1. – P. 485–494.
34. Cerniglia C.E., Gibson D.T., Van Baalen C. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – V. 88. – No 1. – P. 50–58.
35. Chaillan F., Gugger M., Saliot A., Couté A., Oudot J. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat // *Chemosphere*. – 2006. - V. 62. – No 10. – P. 1574-1582.

36. Cirigliano M.C., Carman G.M. Purification and characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica* // J. Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – V. 50. – No 4. - P. 846-850.;
37. Cohen Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats // Int. Microbiol. – 2002. – V. 5. – No 4. – P. 189–193.
38. Compant S., Duffy B., Nowak J., etc. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V.71. № 9. P.4951-4959.
39. Cooper D.G., Paddock D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola* // J. Appl. Environ. Microbiol. - 1984. - V. 47. – No 1. - P. 173-176.
40. Dean-Ross D., Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species // FEMS Microbiol. Lett. - 2001. – V. 204. – No 1. - P. 205–211;
41. Diaz E., Ferrandez A., Prieto M.A., Garcia J.L. Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2001. – V. 65. – No. 4. - P. 523-569
42. Ferrari M.D., Neirotti E., Albornoz C. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in an aviation fuel handling system and its relationship with fuel fouling // Rev. Argent. Microbiol. – 1998. – V. 30. – No 3. – P. 105–114;
43. Gallego J.L., Loredó J., Llamas J.F., Vazquez F., Sanchez J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation // Biodegradation.- 2001. - V. 12. - No 5. – P. 325 – 335
44. Gaylarde C.C., Bento F.M., Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control // Rev. Microbiol. – 1999. – V. 30. – No 1. - P. 1–10,
45. Hamme J., Ward O. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas sp.* strain JA5-B45 and *Rhodococcus sp.* strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them // J. Appl. Environ. Microbiol. 2001. - Vol. 69. - No. 6. - P. 4874-4879;
46. Hanson K.G., Nigam A., Kapadia M., Desai A.J. News & Notes: Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter sp.* A3 // Curr. Microbiol. Issue. – 1997. - V. 35. - No 3. – P. 191 – 193;
47. Ionata E., De Blasio P., La Cara F. Microbiological degradation of pentane by immobilized cells of *Arthrobacter sp.* // Biodegradation. - 2005. - V. 16. – No 1. - P. 1–9

48. Jirasripongpun K. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil // *Letters in Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 35. No 4. – P. 296–300
49. Liu Y., Zhang J., Zhang Z. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Degrading *Sphingomonas* sp. Strain ZL5 // *Biodegradation.* – 2004. - V. 15. - No 3. – P. 205 – 212.
50. Marchal R., Penet S., Solano-Serena F., Vandecasteele J.P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation // *Oil & Gas Science and Technology.* – 2003. - V. 58. - No. 4. - P. 441-448
51. Margesin R., Labbé D., Schinner F., Greer C.W., Whyte L.G. Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2003 b. - Vol. 69. - No. 6. - P. 3085-3092. Margesin R., Gander S., Zacke G., Gounot A.M., Schinner F. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts // *Extremophiles.* – 2003 a. – V. 7. No 6. - P. 451-458.
52. Miller C.D., Hall K., Liang Y.N., Nieman K., Sorensen D., Issa B., Anderson A.J., Sims R.C. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degrading Mycobacterium Isolates from Soil // *Microbial Ecol.* – 2004. – Vol. 48. – No 2. – P. 230 – 238
53. Murygina V., Arinbasarov M., Kalyuzhnyi S. Bioremediation of oil polluted aquatories and soils with novel preparation “Rhoder”. // *Biodegradation.* – 2000. – Vol. 11. No 6. – P. 385-389.
54. Murygina V.P., Markarova M.Y., Kalyuzhyi S.V. Application of biopreparation “Rhoder” for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic // *Environ Int.* – 2005. – V. 31. – No 2. – P.163 -166.
55. Narro M.L., Cerniglia C.E., Van Baalen C., Gibson D.T. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58. – No 4. – P. 1351-1359.
56. Park W., Jeon C.O., Cadillo H., DeRito C., Madsen E.L. Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V.64. P.429-435.
57. Pineda-Flores G., Boll-Arguello G., Lira-Galeana C., Mesta-Howard A.M. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source // *Biodegradation.* -2004. - Vol. 15. – No 3. - P.145–551;

58. Piskonen R., Nyssonen M., Rajamaki T., Itavaara M. Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry // *Biodegradation*. - 2005. - Vol. 16. – No. 2. – P. 127–134,
59. Raghukumar C., Vipparthy V., David J.J., Chandramohan D. Degradation of crude oil by cyanobacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 57. – No 3. - P. 433–436.
60. Rahman K.S, Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. // *Bioresour. Technol.* – 2002 a. – Vol. 85. – No 3. – P. 257-261;
61. Rahman K.S., Rahman T., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils // *J. Basic Microbiol.* – 2002 b. - Vol. 42. - No 4. - P. 284-291;
62. Ron E., Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // *Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 3. – No 4. - P. 229–236
63. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – V. 52. – No 2. - P. 154–162;
64. Sanchez O., Diestra E., Esteve I., Mas J. Molecular Characterization of an Oil-Degrading Cyanobacterial Consortium // *Microbial Ecol.* - 2005. - V. 50. - No 4. – P. 580-588.
65. Sanchez O., Ferrera I., Vignes N., de Oteyza T.G., Grimalt J, Mas J. Role of cyanobacteria in oil biodegradation by microbial mats // *Int. Biodeterioration & Biodegradation*. - 2006. - V. 58. – No 3-4. - P. 186-195.
66. Schwartz E., Scow K.M. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil // *Biodegradation*. – 2001. - V. 12. – No 3. - P. 201–207
67. Sharma S.L., Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* // *Biodegradation* Issue. – 2000. - V. 11. - No. 5. - P. 289 – 294;
68. Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B. Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria // *J. Bacteriol.* – 2002. - V. 184. – No. 6. – P. 1733-1742;
69. Todd S.J., Cain R.B., Schmidt S. Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae // *Biodegradation*.- 2002. – V. 13. – No 4. - P. 229–238;
70. Toledo F.L., Calvo C., Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities // *Syst. and Appl. Microbiol.* – 2006 – Vol. 29. – No 3. - P. 244–252

71. Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment // Oil & Gas Science and Technology. - Rev. IFP. – 2003. - Vol. 58. - No. 4. – P. 427-440.
72. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol.67. № 4. P.503-549.
73. Walker J.D., Colwell R.R., Petrakis L. Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii* // Appl. Microbiol.. - 1975. – V. 30. No 1. – P. 79–81.
74. Watanabe K., Kodama Yu., Kaku N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity [Электронный ресурс] // BMC Microbiol. – 2002. – V. 2. - No 23. - Доступ: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/23>. Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W., Greer C.W. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus sp.* // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. - No. 7. – P. 2578-2584;
75. Watanabe K., Watanabe K., Kodama Y. Syutsubo K., Harayama S. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude-oil-storage cavities // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – No 11. – P. 4803-4809
76. Yadav J.S., Loper J.C. Multiple P450alk (cytochrome P450 alkane hydroxylase) genes from the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii* // GENE. - 1999. - V. – 226. – No 2. – P. 139-146
77. Zinjarde S.S., Pant A., Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 // J. Basic Microbiol. – 2002 a. – V. 42. – No 1. - P. 67-73;
78. Zinjarde S.S., Pant A.A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments // Marine Pollution Bulletin. – 2002 b. – V. 44. – No 2. - P. 118–121.
79. Zinjarde S.S., Savel C., Lachke A.H., Pant A. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit // Lett. Appl. Microbiol. – 1997. – V. 24. – No 2. - P. 117-121.
80. Zvyagil'skaya R., Andreishcheva E., Soares M.I.M., Khozin I., Berhe A., Persson B.L. Isolation and characterization of a novel leaf-inhabiting osmo-, salt-, and alkali-tolerant *Yarrowia lipolytica* yeast strain // J. Basic Microbiol. – 2001. - V. 41. - No 5. – P. 289-303.