

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
УФИМСКИЙ ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ –  
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Коршунова Татьяна Юрьевна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛИКВИДАЦИИ  
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)  
03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор  
Олег Николаевич Логинов,  
доктор биологических наук, профессор  
Александр Иванович Мелентьев

Уфа – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	10
ВВЕДЕНИЕ.....	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	21
ГЛАВА 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ПОЧВУ.....	21
1.1. Последствия загрязнения почвы нефтяными углеводородами.....	21
1.1.1. Изменение морфологии и физико-химических свойств почвы под действием нефти.....	21
1.1.2. Влияние нефтяного загрязнения на биологическое разнообразие в почвенной среде.....	24
1.1.3. Реакция растений на поступление нефти в почву.....	28
1.2. Рекультивация нефтезагрязненных почв.....	31
1.2.1. Технический этап рекультивации.....	33
1.2.2. Биологический этап рекультивации.....	35
1.2.2.1. Технологии биоремедиации нефтезагрязненной почвы... ..	37
1.2.2.2. Очистка нефтезагрязненной почвы с помощью биопрепаратов .....	38
1.2.2.3. Фиторемедиация.....	42
ГЛАВА 2. ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ВОДНУЮ СРЕДУ.....	46
2.1. Особенности нефтяного загрязнения воды.....	46
2.2. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на различные объекты гидросферы.....	48
2.3. Методы очистки водоемов от разливов нефти.....	53
2.4. Очистка водных объектов от нефти и нефтепродуктов с помощью микроорганизмов.....	56
ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД ОТ УГЛЕВОДОРОДОВ.....	61
ГЛАВА 4. ОТХОДЫ НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ И НЕФТЕПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ ИХ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ.....	68
4.1. Виды нефтесодержащих отходов.....	69
4.2. Методы переработки нефтешламов.....	71
4.3. Микробиологические методы обезвреживания нефтесодержащих отходов.....	73

ГЛАВА 5. МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ УГЛЕВОДОРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	77
5.1. Разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов...	77
5.2. Применение бактерий рода <i>Acinetobacter</i> для деструкции нефти и нефтепродуктов в почве и воде.....	79
5.3. Деградация углеводородсодержащих веществ бактериями рода <i>Ochrobactrum</i> .....	83
5.4. Очистка почвы и воды от нефти и нефтепродуктов с использованием бактерий рода <i>Pseudomonas</i> .....	88
ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С ЗАДАННЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ .....	93
6.1. Применение биосурфактантов и микроорганизмов, их продуцирующих, для очистки почвы и воды от углеводородного загрязнения.....	93
6.2. Азотфиксирующие микроорганизмы и их участие в процессах биоремедиации нефтезагрязненных объектов.....	99
6.3. Психротолерантные микроорганизмы для очистки экосистем от нефтяного загрязнения в условиях умеренного и холодного климата.....	103
6.4. Микробно-растительные ассоциации как перспективное направление экологической биотехнологии.....	108
<b>ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ</b>	
ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	119
7.1. Штаммы микроорганизмов.....	119
7.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов	119
7.3. Скрининг микроорганизмов-деструкторов углеводов...	120
7.4. Скрининг бактерий-антагонистов фитопатогенных грибов...	121
7.5. Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур.....	122
7.6. Идентификация штаммов микроорганизмов молекулярно-генетическими методами.....	123
7.6.1. Выделение ДНК.....	123
7.6.2. Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.....	123
7.6.3. Определение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего $\beta$ -субъединицу ДНК-гиразы ( <i>gyrB</i> ).....	124
7.6.4. Определение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы ( <i>rpoB</i> ).....	125
7.6.5. Определение нуклеотидной последовательности гена,	126

кодирующего $\sigma$ -субъединицу РНК-полимеразы ( <i>rpoD</i> ).....	
7.6.6. Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей генов.....	126
7.6.7. Построение дендрограмм филогенетического сходства.....	127
7.6.8. Определение содержания ГЦ-пар в молекуле ДНК.....	127
7.6.9. ДНК-ДНК-гибридизация.....	127
7.7. Идентификация штаммов микроорганизмов хемотаксономическими методами.....	129
7.7.1. Анализ жирных кислот клеточной стенки.....	129
7.7.2. Определение состава изопреноидных хинонов.....	130
7.7.3. Изучение профиля клеточных белков.....	130
7.8. Исследование окислительной активности.....	131
7.9. Определение способности к фиксации атмосферного азота..	132
7.9.1. Оценка нитрогеназной активности.....	132
7.9.2. Выявление потенциальной активности азотфиксации в почве.....	133
7.10. Исследование поверхностно-активных свойств.....	133
7.10.1. Поверхностное натяжение.....	134
7.10.2. Индекс эмульгирования.....	134
7.11. Изучение способности к синтезу фитогормональных веществ.....	135
7.12. Определение токсических свойств чистых культур микроорганизмов.....	135
7.13. Определение эффективности процесса биодеструкции нефти и нефтепродуктов .....	136
7.13.1. Измерение массовой концентрации нефтепродуктов в почве.....	136
7.13.2. Определение численности микроорганизмов основных эколого-трофических групп .....	136
7.13.3. Степень деструкции нефтепродуктов.....	136
7.14. Определение фитотоксичности отбеливающей глины.....	137
7.15. Лабораторные опыты по проверке эффективности применения изучаемых микроорганизмов для очистки от загрязнения нефтью и нефтепродуктами.....	137
7.15.1. Очистка сточной воды, содержащей нефтепродукты, с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	137

7.15.1.1. Исследование возможности роста консорциума микроорганизмов на отдельных компонентах загрязнителя, присутствующих в сточной воде .....	137
7.15.1.2. Изучение эффективности процесса очистки сточной воды.....	138
7.15.1.3. Измерение массовой концентрации нефтепродуктов в сточной воде.....	138
7.15.2. Биоремедиация грунтов, загрязненных нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	138
7.15.3. Очистка песка, загрязненного нефтью, штаммом <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> .....	139
7.15.4. Проверка способности комбинаций микроорганизмов с различной функциональной активностью к деструкции нефти и стимуляции роста и развития растений .....	140
7.16. Полевые испытания технологий очистки почв, грунтов, водной поверхности от нефтяного загрязнения, а также обезвреживания нефтесодержащих отходов.....	141
7.16.1. Обезвреживание нефтешлама с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2 .....	141
7.16.2. Очистка почвы от нефти в условиях низких положительных температур штаммом <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup>	142
7.16.3. Биорекультивация нефтезагрязненной отбеливающей глины с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> .....	142
7.16.4. Биорекультивация почвы после нефтяного разлива с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> .....	144
7.16.5. Очистка водной поверхности, загрязненной нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	145
7.17. Статистические методы обработки результатов исследований.....	145
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	
<b>ГЛАВА 8. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ BIOTEХНОЛОГИИ...</b>	<b>146</b>
8.1. Описание микроорганизмов консорциума.....	146
8.1.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов консорциума.....	146

8.1.2. Генотипическая характеристика штаммов, образующих консорциум.....	151
8.1.2.1. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.....	151
8.1.2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей гена <i>gyrB</i> ...	153
8.1.3. Хемотаксономические особенности микроорганизмов консорциума.....	157
8.1.3.1. Состав жирных кислот клеточной стенки.....	157
8.1.3.2. Белковые профили клеток микроорганизмов консорциума .....	162
8.2. Описание штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ 1.1.....	165
8.2.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства.....	165
8.2.2. Генотипическая характеристика штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ 1.1.....	167
8.2.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.....	167
8.2.2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей генов <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i> и <i>gyrB</i> .....	168
8.2.2.3. ДНК-ДНК-гибридизация.....	170
8.2.2.4. Содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК.....	170
8.2.3. Хемотаксономические особенности штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ 1.1.....	170
8.2.3.1. Анализ жирных кислот.....	170
8.2.3.2. Анализ хинонов.....	172
8.2.4. Описание вида <i>Pseudomonas turukhanskensis</i> sp. nov.....	172
8.3. Описание штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ-4.....	174
8.3.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства.....	174
8.3.2. Генотипическая характеристика штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ-4.....	175
8.3.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.....	175
8.3.2.2. Анализ нуклеотидной последовательности гена <i>gyrB</i> .....	177
8.3.2.3. ДНК-ДНК-гибридизация.....	178
8.3.2.4. Содержание ГЦ-пар.....	178
8.3.3. Хемотаксономические особенности штамма <i>Pseudomonas</i> sp. ИБ-4.....	178

8.3.3.1. Анализ жирных кислот.....	178
8.3.3.2. Анализ хинонов.....	179
8.3.3.3. Профиль клеточных белков.....	179
8.4. Профиль жирных кислот штамма <i>P. ehimensis</i> ИБ 739.....	182
ГЛАВА 9. СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗУЮЩИХ КОНСОРЦИУМ, А ТАКЖЕ ШТАММОВ <i>P.</i> <i>TURUKHANSKENSIS</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> И <i>P. KOREENSIS</i> ИБ-4.....	185
9.1. Окислительная активность консорциума, входящих в его состав микроорганизмов и штамма <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> ..	185
9.2. Нитрогеназная активность штаммов <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ- 5.3/2, <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> и <i>P. koreensis</i> ИБ-4.....	188
9.3. Потенциальная нитрогеназная активность почвы, инокулированной штаммом <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2 и <i>P.</i> <i>turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> .....	193
9.4. Способность штамма <i>P. koreensis</i> ИБ-4 к продукции фитогормонов.....	195
9.5. Поверхностно-активные свойства штамма <i>A. calcoeticus</i> ИБ ДТ-5.1/1.....	196
9.6. Фитотоксичность бактериальных штаммов.....	198
ГЛАВА 10. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ПРОВЕРКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗУЧЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТОВ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЯНЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ.....	200
10.1. Очистка сточной воды, содержащей углеводороды, с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoeticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	200
10.1.1. Исследование возможности роста консорциума микроорганизмов <i>A. calcoeticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2 на индивидуальных загрязняющих компонентах, присутствующих в сточной воде.....	201
10.1.2. Изучение эффективности процесса очистки сточной воды с помощью консорциума микроорганизмов.....	201
10.2. Биоремедиация нефтезагрязненных грунтов месторождений Жетыбай и Каламкас с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoeticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	203
10.3. Биоремедиация нефтезагрязненного песка штаммом <i>P.</i> <i>turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup> .....	205
10.4. Проверка возможности применения комбинаций бактерий с различной функциональной активностью для снижения содержания нефти в почве и активизации роста и развития	208

	растений.....	
ГЛАВА	11. ПОЛЕВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ПРОВЕРКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ, ГРУНТОВ, ВОДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ОТ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ, А ТАКЖЕ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ .....	216
	11.1. Обезвреживание нефтешлама с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2 .....	216
	11.2. Очистка почвы от нефти в условиях низких положительных температур штаммом <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	218
	11.3. Биологическая рекультивация отхода нефтехимического предприятия с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup> .....	221
	11.4. Биорекультивация почвы после нефтяного разлива с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма <i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup> .....	228
	11.5. Очистка водной поверхности болота, загрязненного нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 и <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2.....	233
ГЛАВА	12. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СЕРИИ «ЛЕНОЙЛ»®.....	236
	12.1. Описание биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.....	236
	12.2. Технические условия на биопрепараты-нефтедеструкторы серии «Ленойл»®.....	237
	12.3. Внутренние технологические регламенты промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.....	239
	12.4. Технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.....	241
ГЛАВА	13. ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СЕРИИ «ЛЕНОЙЛ»®.....	244
	13.1. Подготовительные мероприятия технологии применения биопрепарата-нефтедеструктора серии «Ленойл»®.....	246
	13.2. Приготовление рабочей суспензии биопрепарата.....	246
	13.3. Технические средства для реализации технологии применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.....	247
	13.4. Воздействие природно-климатических и почвенно-географических условий при использовании биопрепаратов	247



серии «Ленойл»® для биологической рекультивации почв, загрязненных нефтью.....	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	249
ВЫВОДЫ.....	255
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	258
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	259
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	369
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	430

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

УОМ – углеводородокисляющие микроорганизмы

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

СВ – сточные воды

МБР – мембранный биореактор

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

МАЛДИ-ВП – масс-спектрометрия – матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия

СХП – сухая препаративная форма биопрепарата

р. – род

КОЕ/г – колониеобразующих единиц в 1 г

КОЕ/мл – колониеобразующих единиц в 1 мл

E<sub>24</sub> – индекс эмульгирования за 24 ч

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

При современном уровне развития нефтяной промышленности невозможно полностью исключить ее негативное воздействие на экосистемы. Нефть и нефтепродукты признаны основными загрязнителями окружающей среды (Eurosoil, 2008; Robertson, Hansen, 2015), которые по величине своего вредного влияния находятся на втором месте после радиоактивного загрязнения (Экологические проблемы..., 2007) и представляют серьезную опасность для здоровья человека (Смирнова, Кузнецова, 2014; Xue et al., 2015; Cociârță et al., 2017; Varjani et al., 2018). В нашей стране проблема контаминация углеводородсодержащими веществами особенно актуальна для Западной Сибири, где расположено много нефтедобывающих предприятий и природно-климатические условия которой могут обеспечить лишь невысокую скорость процессов самоочищения нефтезагрязненных объектов (Алексеев и др., 2011; Корнейкова и др., 2011).

Крупнотоннажные отходы процессов добычи и нефтепереработки также являются одними из высокотоксичных загрязнителей окружающей среды. Они занимают обширные территории, уродуют ландшафт, служат источником вторичной контаминации почв, воздуха, поверхностных и подземных вод (Каталитические..., 2013; Литвинова, 2016; Соколов, 2017).

Наиболее экологически и экономически целесообразным способом очистки нефтезагрязненных объектов является применение биологических технологий, основанных на использовании углеводородокисляющих микроорганизмов (Хоменко, Ногина, 2015; Ichor et al., 2014; Ivshina et al., 2015; Hazen et al., 2016; Orellana et al., 2017; Xu, Zhou, 2017). Известно множество микроорганизмов различных родов, обладающих способностью к нефтедеструкции (Филонов, 2016; Плешакова и др., 2017; Bhattacharya et al., 2015; Ivshina et al., 2016; Salam, 2016; Koshlaf, Ball, 2017).

Для восполнения дефицита азота, возникающего при попадании нефти в почву, обычно используют большие дозы минеральных азотных удобрений, что является экономически невыгодным и экологически небезопасным (Шаронова и

др., 2009; Sutton et al., 2011). Между тем, в природных экосистемах накопление азота происходит за счет деятельности азотфиксирующих микроорганизмов, некоторые из которых способны не только к диазотрофии, но и к усвоению углеводов (Mazumdar et al., 2015; Pérez-Vargas et al., 2017). Поэтому работы по поиску и изучению свойств микроорганизмов-нефтедеструкторов и их способности к окислению различных углеводородных субстратов, а также созданию на их основе полифункциональных биопрепаратов не только для очистки, но и для восстановления окружающей среды, остаются актуальными. При этом возрастает значимость таксономических исследований, базирующихся на комплексном применении различной информации фенотипического, генотипического, филогенетического, хемотаксономического и экологического характера (Назина и др., 2015; Das et al., 2014; Zhu et al., 2015) и направленных на получение детальной характеристики микроорганизмов и четкую дифференциацию штаммов.

**Степень разработанности темы.** К настоящему времени уже разработано большое число биопрепаратов-нефтедеструкторов для очистки почвы и воды (Алексеев и др., 2008; Филонов и др., 2010а; Рогозина и др., 2014; Волков и др., 2015). Однако природно-климатические условия очищаемых территорий, а также качественный и количественный состав нефти и нефтепродуктов неодинаковы, что объясняет необходимость продолжения исследований по созданию биопрепаратов для очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения и разработке технологий их применения.

Несмотря на достигнутые успехи в развитии молекулярно-генетических и хемотаксономических подходов при идентификации микроорганизмов, базы данных по нуклеотидным последовательностям генов, жирным кислотам клеточной стенки и масс-спектрам клеточных белков в основном содержат данные по клинически значимым штаммам и все еще недостаточны для установления таксономической принадлежности большинства штаммов, перспективных в биотехнологическом плане.

**Цель исследования** - создание на основе новых микроорганизмов полифункциональных биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды

от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв в различных климатических условиях, а также разработка технологий их применения и производства в промышленных масштабах.

### **Задачи исследования**

1. Выделить из нефтезагрязненных почв микроорганизмы, способные к эффективному окислению углеводородов, в т.ч. при низкой положительной температуре.

2. Выделить из почв сельскохозяйственного назначения бактерии, продуцирующие вещества, стимулирующие рост и развитие растений.

3. Описать фенотипические, молекулярно-генетические и хемотаксономические особенности изолятов и определить их таксономическое положение согласно требованиям современной систематики прокариот.

4. Изучить свойства выделенных бактерий, позволяющие использовать их для очистки и восстановления экосистем от загрязнения нефтью и нефтепродуктами.

5. Установить возможность применения исследованных микроорганизмов для очистки почв и грунтов, загрязненных нефтью, а также обезвреживания нефтесодержащих отходов в лабораторных и полевых экспериментах в различных климатических условиях.

6. Проверить эффективность использования описанных микроорганизмов для очистки водных поверхностей и производственных сточных вод от нефти и нефтепродуктов.

7. Разработать на основе изученных микроорганизмов полифункциональные биопрепараты-нефтедеструкторы для очистки и восстановления загрязненных углеводородами объектов для различных климатических условий.

8. Разработать и утвердить в соответствии с действующим законодательством нормативно-техническую документацию на производство и технологию применения биопрепаратов-нефтедеструкторов.

### **Научная новизна**

Выделен новый нефтеокисляющий консорциум и установлена видовая принадлежность входящих в его состав штаммов – *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3/2.

Впервые из нефтезагрязненной почвы Туруханского района Красноярского края выделен штамм ИБ 1.1, разлагающий нефть, в т.ч. при низкой положительной температуре, который идентифицирован как представитель нового вида бактерий р. *Pseudomonas*. Описан и таксономически узаконен новый вид микроорганизмов *P. turukhanskensis*.

Выделен и идентифицирован новый штамм микроорганизмов *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, синтезирующий фитогормоны цитокининового ряда и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), а также фиксирующий в значительных количествах атмосферный азот.

Выявлено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> способны к окислению углеводородов до углекислого газа и воды, а также к diazotrophii, в т.ч. при низкой положительной температуре.

Установлено, что использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 эффективно для очистки почв, грунтов, водной поверхности и производственных сточных вод от нефтяного загрязнения, а также обезвреживания отходов нефтедобывающих и нефтеперерабатывающих предприятий.

Показана возможность рекультивации нефтесодержащих отходов, а также песка и почвы, загрязненных нефтью, штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, в т.ч. при низкой положительной температуре.

Предложен новый подход к ликвидации последствий нефтяных загрязнений биотехнологическими методами, основанный на использовании полифункциональных биопрепаратов, которые снижают содержание углеводов в рекультивируемых объектах и способствуют восстановлению почвы путем фиксации атмосферного азота и стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов.

Новизна исследований подтверждена 4 патентами РФ: на питательную среду для культивирования бактерий р. *Pseudomonas* (№ 2303061); на консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов (№ 2553540); на способ очистки почв от нефти в условиях низких положительных температур психротолерантными бактериями *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 (№ 2539148); на способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения (№ 2627598).

**Теоретическая значимость работы.** Результаты, полученные в процессе идентификации бактерий, выделенных в настоящем исследовании, и описания нового вида микроорганизмов, способствуют установлению видовой принадлежности других микроорганизмов за счет расширения баз данных по нуклеотидным последовательностям генов, кодирующих 16S рРНК,  $\beta$ -субъединицу ДНК-гиразы (*gyrB*),  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*),  $\sigma$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoD*), жирным кислотам клеточной стенки и клеточным белкам, а также имеют важное значение для фундаментальных исследований в различных областях науки (экология, генетика и эволюция микроорганизмов и пр.). Представленные в работе данные являются теоретической основой для дальнейших исследований в направлении расширения полифункциональности биопрепаратов для экобиотехнологии. Материалы диссертации используются при чтении лекций по программе профессиональной переподготовки профессорско-преподавательского состава биологического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» по направлению «Биотехнология».

**Практическая значимость.** Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на решение такой важной экологической и хозяйственной проблемы, как ликвидация последствий загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. На основе выделенных в ходе работы углеводородокисляющих микроорганизмов создана серия полифункциональных биопрепаратов под торговой маркой «Ленойл»®), предназначенных для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания твердых нефтесодержащих отходов, а также для восстановления почв в различных климатических условиях. Разработана и внедрена технология их производства, которое осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа). За период с июня 2012 г. получено более 384200 л жидких и 75210 кг сухих препаратов. Разработана технология применения биопрепаратов, которая успешно апробирована (в т.ч. в промышленных масштабах) в различных климатических условиях при обезвреживании твердых нефтесодержащих отходов в Оренбургской области и Республике Казахстан, а также для ликвидации последствий нефтяных разливов в Ханты-мансийском автономном округе-Югра (ХМАО-Югра) и Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) и очистки водной поверхности болота от нефти в ЯНАО.

Все бактериальные штаммы, выделенные и изученные в работе, депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ), а штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1, кроме того, размещен на хранение в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ).

**Методология и методы исследования.** Методология исследований выстроена исходя из цели и задач диссертационной работы. Предметом изучения являлись свойства новых природных штаммов бактерий, необходимые для их идентификации и применения в экологической биотехнологии; возможность использования исследованных микроорганизмов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтяного загрязнения; технологии получения и применения биопрепаратов на основе этих микроорганизмов. Научная литература, посвященная исследованиям в области идентификации бактерий и



изучения их свойств, была проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, хемотаксономические, биохимические, физические и статистические методы исследования, а также методы биотестирования.

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

1. Нефтеокисляющий консорциум, выделенный из почвы, загрязненной дизельным топливом, образован штаммами *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2. Выделенный из нефтезагрязненной почвы Красноярского края штамм ИБ 1.1, разлагающий нефть, является представителем нового вида микроорганизмов *P. turukhanskensis*. Штамм-антагонист фитопатогенных микромицетов ИБ-4, изолированный из пахотной почвы, относится к виду *P. koreensis*.

2. Консорциум и входящие в его состав штаммы *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 способны к окислению углеводов различных классов, нефти и нефтепродуктов до углекислого газа и воды. Штамм *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 обладает поверхностно-активными свойствами, а штамм *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 – нитрогеназной активностью. Бактерия *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> обладает окислительной и нитрогеназной активностью, в т.ч. и при низкой положительной температуре. Штамм *P. koreensis* ИБ-4 способен к продукции фитогормонов и фиксации атмосферного азота.

3. Внесение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> снижает содержание нефтепродуктов в загрязненных грунтах, почвах и твердых нефтесодержащих отходах и повышает в них численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп.

4. Использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 эффективно для очистки водной поверхности и производственных сточных вод от углеводородного загрязнения.

5. Интродукция различных комбинаций консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с бактериями *P. koreensis*

ИБ-4 и *Paenibacillus ehimensis* IB 739 способствует очистке почвы от нефти и стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов.

6. Разработанная технология производства дает возможность получать как жидкую, так и сухую форму биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®, а технология их применения позволяет очищать и восстанавливать сильнозагрязненные объекты окружающей среды и обезвреживать нефтесодержащие отходы.

### **Степень достоверности и апробация работы**

О достоверности результатов работы свидетельствует как достаточный объем проведенных исследований по идентификации и изучению свойств выделенных микроорганизмов, так и то, что для этого были использованы современные биохимические, молекулярно-генетические и хемотаксономические методы, а также применена статистическая обработка данных. Разработанные биопрепараты успешно прошли лабораторные и полевые испытания, в т.ч. в промышленных масштабах. Осуществляется промышленный выпуск и продажа разработанной продукции.

Основные результаты исследований были представлены на Международной научно-технической конференции «Нефтегазопереработка и нефтехимия – 2007» (г. Уфа, 2007), Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (г. Пущино, 2012), VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (г. Саратов, 2012), научно-практической конференции «Государственная политика в области охраны окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (г. Уфа, 2012), VIII и IX Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 2012, 2013), Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (г. Уфа, 2012), V и VIII Международной заочной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники» (г. Уфа, 2012, 2015), II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и

студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (ВТСНТ-2013) (г. Томск, 2013), Международной научной конференции «Экобиотех» (г. Уфа, 2013, 2015, 2017), III Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы нефтедобычи» (г. Уфа, 2013), Школе-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (г. Пущино, 2013), VII, VIII, IX Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (г. Уфа, 2013, 2014, 2015), VI Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2013» (г. Уфа, 2013), Международной заочной научно-практической конференции «Современные тенденции в образовании и науке» (г. Тамбов, 2014), IX Международной конференции аспирантов и студентов «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (г. Донецк, 2015), Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Уфа, 2018).

**Личный вклад автора** заключается в формулировании цели и задач исследования, решении поставленных задач, планировании экспериментов и их выполнении, обобщении результатов и использовании их на практике, разработке основных положений диссертации, выносимых на защиту и нормативно-технической документации на производство и применение биопрепаратов. Результаты диссертационной работы являются совокупностью многолетних научных исследований, проведенных в УИБ УФИЦ РАН лично автором и при его непосредственном участии в качестве ответственного исполнителя. Часть исследований выполнена в соавторстве с сотрудниками УИБ УФИЦ РАН д.б.н., проф. О.Н. Логиновым, д.б.н., проф. А.И. Мелентьевым, д.б.н. С.П. Четвериковым, к.б.н. М.Д. Бакаевой, к.б.н. Г.Ф. Рафиковой, аспирантами УИБ УФИЦ РАН С.Р. Мухаматдьяровой, Э.Г. Валиуллиным, Д.А. Шариповым, Л.Ф. Миннебаевым. Работы по описанию нового вида микроорганизмов проводились совместно с учеными из Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNASA-

CSIC и Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA (CSIC) (г. Саламанка, Испания) PhD. М.-Н. Ramírez-Bahena, PhD. J.M. Igual, PhD. A. Peix.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научным консультантам – заведующему лабораторией УИБ УФИЦ РАН, д.б.н., проф. О.Н. Логинову за идейное вдохновение, постоянное внимание и неоценимую поддержку и научному руководителю учреждения УИБ УФИЦ РАН, д.б.н., проф. А.И. Мелентьеву за ценные советы и рекомендации; ведущему научному сотруднику лаборатории биотехнологий УИБ УФИЦ РАН, д.б.н. С.П. Четверикову за научно-методическую помощь при постановке экспериментов и обсуждении результатов; аспирантам С.Р. Мухаматдьяровой, Э.Г. Валиуллину и Д.А. Шарипову за их участие в проведении полевых испытаний и первичной обработке полученных данных, а также всем сотрудникам лаборатории биотехнологий УИБ УФИЦ РАН за постоянное содействие и дружескую поддержку. Автор благодарит заведующего лабораторией ИБГ УФИЦ РАН, к.б.н. Р.Р. Гарафутдинова за помощь при изучении морфологии клеток на сканирующем зондовом микроскопе и заведующую лабораторией ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н. Е.А. Столярову за ее вклад при подготовке нормативно-технической документации на производство биопрепаратов, а также профессора Kwon S.W. из Корейской коллекции сельскохозяйственных культур за любезно предоставленный им штамм *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> (КАСС 10848).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 50 научных работ, в том числе 18 статей в журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК Минобрнауки РФ, и получено 4 патента РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 437 страницах, содержит 29 таблиц, 20 рисунков и 25 приложений. Список литературы включает 920 наименований, из них 432 на английском языке.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ГЛАВА 1. ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ПОЧВУ

Развитие современного общества и научно-технический прогресс непосредственным образом связаны с природопользованием. Нефтяная промышленность – крупнейший потребитель природных ресурсов, функционирование которого нарушает естественные экосистемы и оказывает отрицательное воздействие на окружающую среду в течение всего производственного цикла – от разведки месторождений, извлечения и транспортировки нефти до получения, хранения и потребления нефтепродуктов. Углеводороды, попадая в одну из природных сфер (воздушную, водную, почвенную), вовлекаются в общую миграцию веществ и, как правило, с течением времени распространяются в каждой из них. При этом сложнее всего подвергается восстановлению почва, поскольку она аккумулирует и закрепляет вещества, оказывающие токсическое действие на растительность, почвенных животных и многие группы микроорганизмов, в результате чего резко снижается или полностью утрачивается ее главное свойство – плодородие. Кроме того, эксплуатация месторождений, транспортировка и складирование отходов нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности приводит к изъятию из оборота и загрязнению огромных земельных площадей.

#### **1.1. Последствия загрязнения почвы нефтяными углеводородами**

##### **1.1.1. Изменение морфологии и физико-химических свойств почвы под действием нефти**

К настоящему времени накоплен огромный объем работ, посвященных различным аспектам трансформации почвенного покрова при попадании в него углеводородов. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами влияет на весь комплекс морфологических, физических, физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих ее плодородие и экологические функции. Степень этих изменений зависит от климата, ландшафта и рельефа местности, типа и

исходного состояния почвы, а также от состава, свойств, количества и продолжительности воздействия поллютанта. Кроме того, нефть является комплексным загрязнителем, эффект от которого определяется количеством, составом и свойствами ее как органических, так и неорганических составляющих (тяжелые металлы и их соли, соединения ртути, серы, урана и пр.).

После попадания нефти и нефтепродуктов в почву наблюдается более темное окрашивание верхних горизонтов, мозаичность изменений морфологического строения в результате неравномерного распределения нефти в толще почвы (Матвеева, Липатов, 2015; Середина и др., 2017; Rahman et al., 2010; Oluremi et al., 2015). Под действием загрязнения происходит трансформация гранулометрического состава – важнейшей генетической и агрономической характеристики почвы, влияющей на ее плодородие. Почвенные частицы покрываются нефтяной пленкой и происходит их агрегирование. Поровое пространство заполняется нефтепродуктами, которые вытесняют воздух и нарушают аэрацию. Создаются анаэробные условия, повышающие восстановленность почвы и снижающие ее окислительный потенциал, что может приводить к развитию процессов оглеения и даже поверхностному заболачиванию почв (Колесников и др., 2013а, 2013б, 2014; Oluremi et al., 2015). На формирование восстановительных условий также влияет увеличение содержания органического вещества (связанное с поступлением в почву компонентов нефти), при разложении которого расходуется кислород.

Уменьшение степени дисперсности меняет характер границ между горизонтами, некоторые из них могут даже полностью деградировать. В верхних слоях образуется битуминозная корка, препятствующая росту растений и просачиванию воды вглубь (Просянкин и др., 2012; Середина и др., 2017).

Гранулометрический состав определяет все физические показатели почвы: порозность (пористость), влагоемкость, водопроницаемость, аэрацию, теплоаккумуляцию и теплопроводность. Из-за агрегирования почвенных частиц под действием нефти и заполнения ею наиболее крупных пор эти свойства ухудшаются (Кутузова и др., 2014; Федотова, Мелкозеров, 2017; Abosedede, 2013;

Akinwumi et al., 2014; Jesna, Hari, 2015; Klamerus-Iwan et al., 2015; Hajabbasi, 2016; Iqbal et al., 2016; Ploje, Aniago, 2016; Abbasi Maedeh et al., 2017).

В результате загрязнения нефтью и нефтепродуктами изменяется содержание органического углерода, изменяется групповой и фракционный состав гумуса, количество и соотношение макро- и микроэлементов. Из-за сдвига соотношения C:N в сторону углерода нарушается азотный режим почв, благоприятный для нормального развития микроорганизмов и растений (Цомбуева, 2017; Marinescu et al., 2010, 2011; Richardson et al., 2015). Также меняется соотношение форм азота, снижается содержание подвижных форм калия и фосфора (Новоселова и др., 2014; Воеводина и др., 2015; Арзамазова и др., 2017; Цомбуева, 2017; Wang Y. et al., 2013; Liao Ch. et al., 2015; Richardson et al., 2015).

Хлоридно-натриевое засоление почв, сопровождающее нефтяное загрязнение, приводит к сложной перестройке почвенно-поглощающего комплекса (ППК), в котором ионы натрия начинают вытеснять кальций и магний, преобладающие в чистой почве. Это, зачастую, является пусковым механизмом развития процесса осолонцевания почв (Габбасова и др., 2013). В целом поглотительная способность почв снижается, что определяется не только уменьшением количества поглощенных катионов, но и утратой их способности обмениваться из-за обволакивания почвенных коллоидов нефтяной пленкой (Русанов, Шорина, 2009). Изменения в ППК вызывают сдвиг щелочно-кислотных условий, что вызывает подщелачивание исходно кислых и слабо-кислых почв (Воеводина и др., 2015; Wang Y. et al., 2013) или подкисление нейтральных почв (Сулейманов и др., 2008). Последнее, вероятно, объясняется повышением концентрации низкомолекулярных органических кислот, продуцируемых грибной микрофлорой, активно развивающейся в нефтезагрязненных почвах.

Выявлено неоднозначное воздействие нефти и нефтепродуктов на активность ферментов почвы, которые накапливаются в ней в результате жизнедеятельности микроорганизмов, мезофауны и корневой системы растений, а также после их отмирания. В зависимости от вида загрязнителя, типа почвы,

природных условий, группы почвенных ферментов, продолжительности загрязнения ферментативная активность может как усиливаться, так и ослабевать (Колесников и др., 2013а, 2013б, 2014; Кутузова и др., 2014; Новоселова и др., 2014; Овсянникова и др., 2014; Филатов и др., 2014; Каримуллин и др., 2016; Ковалева, Пукальчик, 2016; Фомина, 2016; Абдусаламова и др., 2017; Dindar et al., 2015; Klamerus-Iwan et al., 2015; Wang et al., 2017).

Вместе с нефтью в почвы попадают тяжелые металлы и металлоорганические комплексы, в т.ч. содержащие уран, что может привести к увеличению радиоактивного фона в загрязненных местах (Газалиев и др., 2014; Мустафин, Трифонов, 2017; Ezeldin et al., 2015).

### **1.1.2. Влияние нефтяного загрязнения на биологическое разнообразие в почвенной среде**

Биологическое разнообразие почвы зависит от состояния обитающих в ней сообществ микроорганизмов (бактерии, микроскопические грибы, водоросли) и беспозвоночных животных. Поступление нефти вызывает неоднозначные реакции этих групп объектов живой природы.

*Микробоценоз.* Важнейшим компонентом почвенных экосистем являются микроорганизмы, от деятельности которых во многом зависит способность нефтезагрязненных почв к самоочищению. Воздействие нефти на комплекс почвенных микроорганизмов противоречиво – она может стимулировать рост определенных видов и подавлять развитие других. Углеводороды способны влиять на микроорганизмы напрямую, оказывая токсическое действие (особенно ароматические), или опосредованно, через изменение физико-химических свойств почвы (уменьшение доступности элементов минерального питания, ухудшение водного и воздушного режимов и пр. (Новоселова и др., 2014; Воеводина и др., 2015; Abosedo, 2013; Liao et al., 2015a; Richardson et al., 2015). В результате поступления нефти изменяется общая численность и структура микробного сообщества, и его состав и степень разнообразия зависит как от вида, концентрации и длительности воздействия загрязнителя, так и от типа почвы и



состояния микробоценоза до начала попадания в него поллютаната (Назаров и др., 2010; Панов и др., 2013; Чугунова и др., 2014; Кириенко, Имранова, 2015; Liao et al., 2015a, 2015b; Silva-Castro et al., 2015; Hajabbasi, 2016; Liu et al., 2017). В целом, при небольших дозах уменьшается численность целлюлозолитических микроорганизмов и бактерий, использующих минеральные формы азота, и возрастает количество углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ), но также возможна стимуляция развития каждой составляющей микробного ценоза (Мазанко и др., 2014; Мязин, 2014; Кузнецова и др., 2017; Liao et al., 2015a, 2015b). При высоком содержании поллютанта снижается видовое разнообразие и плотность всех групп микроорганизмов. Чаще всего наблюдается следующая закономерность в развитии сообщества после поступления нефти: вначале происходит угнетение групп микроорганизмов, восприимчивых к загрязнению, и усиление деятельности УОМ, потом, по мере снижения содержания углеводородов в почве, активизация микроорганизмов, жизнедеятельность которые ранее была подавлена. Далее, с увеличением срока давности загрязнения и по мере снижения его концентрации начинается постепенное восстановление сообщества почвенных микроорганизмов, близкого к исходному (Назаров и др., 2010, Хазиев, 2012; Залилова и др., 2014; Мелехина и др., 2015; Журавлева и др., 2017; Liao et al., 2015a, 2015b; Sun et al., 2015).

Согласно данным исследований (Кирсанов и др., 2010; Лабутова и др., 2010; Ерофеевская, 2012), грибные сообщества оказались, в целом, более устойчивыми к воздействию нефтяного загрязнения, чем бактериальные. Однако, и для них характерны те же процессы – элиминация чувствительных видов и доминирование углеводородокисляющих групп; подавление роста, а также снижение разнообразия грибных комплексов по сравнению с фоновыми почвами при высоких концентрациях нефти и стимулирование развития при небольшой концентрации поллютанта (Корнейкова и др., 2011; Полонская и др., 2011; Ерофеевская, 2012). Наиболее распространенными в почвах, содержащих нефть и нефтепродукты, являются представители рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria* и *Trichoderma* (Киреева и др., 2009, 2010a;

Нечай, Орозалиева, 2010; Корнейкова и др., 2011; Полонская и др., 2011; Евдокимова и др., 2013; Бакаева и др., 2013, 2014а, 2014б; Кириенко, Имранова, 2015; Донерьян и др., 2016; Agu et al., 2014; Benal et al., 2014; Kidibule et al., 2014; Dawoodi et al., 2015; Mbachu et al., 2016). Отмечается тенденция к накоплению в нефтезагрязненных почвах фитопатогенных и потенциально опасных для человека и животных видов микромицетов (Рафикова, 2010; Ерофеевская, 2012; Корнейкова и др., 2012; Бакаева и др., 2014а; Кириенко, Имранова, 2015; Evdokimova et al., 2013).

Микроводоросли реагируют на нефтяное загрязнение, в общем случае так же, как и бактериальное и грибное сообщества, т.е. изменением структуры комплекса, которое выражается падением видового разнообразия и численности, а также сменой доминантов. Чем выше концентрация поллютаната, тем меньше количество и численность видов, представленных в альгоценозе, иногда даже наблюдается его полная деградация (Дубовик и др., 2014, 2015; Неделин, 2015). Самыми устойчивыми к загрязнению являются цианобактерии (*Cyanophyta*) pp. *Nostoc*, *Anabaena*, *Phormidium*, *Plectonema* и зеленые водоросли (*Chlorophyta*) p. *Chlorococcum* (Дорохова, 2011; Зимонина, 2012; Дубовик и др., 2014, 2015; Неделин, 2015; Перевалова, Смирнова, 2016; Шиев et al., 2011). Наиболее чувствительны к присутствию нефти желто-зеленые (*Xanthophyta*) и диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*), которые исчезают даже при слабом загрязнении. Поэтому появление их на нарушенном участке можно рассматривать как признак восстановления почвы (Уразбахтина, Шарипова, 2011; Дубовик и др., 2014, 2015).

*Беспозвоночные.* Педобионты (простейшие, черви, моллюски, насекомые), обладая более сложным строением и более развитыми органами чувств по сравнению с микроорганизмами и растениями, способны к широкому диапазону ответных реакций на действие нефти и нефтепродуктов, в т.ч. к быстрой миграции с загрязненной территории. Кроме трансформации видового состава и численности особей под влиянием различных доз поллютанта, в сообществах беспозвоночных происходит изменение половозрастной структуры и размера особей (Мордкович и др., 2014). Наиболее токсичны для педобионтов легкие и

летучие фракции нефти (Кибардин и др., 2008; Кузьмин, 2008).

Установлено, что инфузории обладают высокой чувствительностью даже к небольшим концентрациям нефти, что позволяет использовать их в качестве биоиндикаторов для определения степени загрязнения (Карташов, 2014; Залялетдинова и др., 2016; Залялетдинова, Карташов, 2016). В сообществе почвенных инфузорий вначале возникает падение численности всех видов из-за недостатка воздуха. Следующий этап адаптации к токсическому действию нефти характеризуется колебанием количества видов в зависимости от их устойчивости и расслоением структуры сообществ, которая также зависит от концентрации. Небольшое содержание поллютанта увеличивает численность, родовое и видовое разнообразие, а высокое оказывает угнетающее влияние, приводящее к снижению плотности популяции (Залялетдинова, Полякова, 2015; Кулюкина, Карташев, 2017).

Под влиянием хронического загрязнения в сообществах раковинных амеб (тестаций) возникают изменения, которые проходят следующие этапы: начальная стадия резистентности, в течение которой сохраняется исходный уровень численности особей; стадия колебательного снижения численности и видового разнообразия сообществ; депрессивная стадия цистирования и вымирания; восстановление – колебательное повышение численности выживших видов, увеличение видового разнообразия тестаций и построение новой структуры сообществ. Повышенные концентрации нефти удлиняют восстановительный период у простейших (Карташов, Смолина, 2011; Полякова и др., 2015).

Изучены адаптивные реакции дождевых червей при хроническом нефтезагрязнении: первый этап – частичная гибель и горизонтальная миграция из нарушенной области, второй – миграция из приграничных районов, третий – постепенное заселение участков, пропорциональное почвообразовательным восстановительным процессам. У особей, подвергшихся влиянию нефти и нефтепродуктов, независимо от дозы поллютанта, снижается число амебоцитов с нормальной формой ядер и увеличивается количество клеток с деформированными ядрами (Карташов, Смолина, 2011). При содержании нефти

более 2,5-5 г/кг происходит повреждение тканей, изменение физиологического состояния и поведенческих реакций (Кузьмин, 2008).

После обработки инфузорий, дафний, моллюсков и личинок комара нефтью, обнаружено наличие эффекта последействия и эффекта отдаленного действия, а также проявление компенсаторных реакций в условиях постоянного присутствия токсиканта, что свидетельствует от генетической опасности этого вещества для живых организмов (Петухова, 2007). В результате нефтяного загрязнения у дафний снижается жизнеспособность и двигательная активность (Петухова и др., 2017).

### **1.1.3. Реакция растений на поступление нефти в почву**

Установлено, что нефть и нефтепродукты неоднозначно влияют на растительные организмы. Этот процесс зависит от типа, концентрации, продолжительности воздействия загрязнителя, а также вида растений, почвенно-климатических условий и агрохимического фона. Невысокие концентрации могут даже стимулировать рост растений, увеличивая всхожесть, длину надземной и подземной части, биомассу, ассимиляционную поверхность и содержание хлорофилла в листьях (Глянцева, 2012; Зейферт, Гамерова, 2012; Полонский, Полонская, 2013; Усманов и др., 2015; Дубровская и др., 2016; Кольцова и др., 2016; Мязин, Редькина, 2016а; Дмитриева, Петухова, 2017; Osuagwu et al., 2013; Appah et al., 2014; Jafari et al., 2018; Zamani et al., 2018). Более высокое содержание поллютаната снижает скорости прорастания и количество семян, тормозит рост и смещает фазы развития растений (Глянцева, 2012; Лукина, Тупицина, 2014; Донец, Должанкина, 2014; Донец, 2015; Кольцова и др., 2015, 2016; Лабузова и др., 2016; Мязин, Редькина, 2016а; Дмитриева, Петухова, 2017; Nawrot-Paw, Wałowska, 2014; Iyagba, Offor, 2014; Baruah et al., 2014; Nwite, Alu, 2015; Rusin et al., 2015; Athar et al., 2016; Iqbal et al., 2016; Zamani et al., 2018).

Положительное влияние нефти может объясняться действием стимуляторов роста растений, содержащихся в ней, улучшением питания растений за счет разложения ее органических компонентов и уменьшением конкуренции между

ними из-за прореживания травостоя при поступлении в почву поллютаната (Шилова, 1988). Отрицательное воздействие нефти имеет как прямой, так и опосредованный характер. Прямое токсическое воздействие нефти проявляется в быстром разрушении тканей растений и зависит от ее фракционного состава, особенно от содержания ароматических углеводородов (Гринчишин, 2016). Отмечаются многочисленные изменения в морфологическом строении растений, выросших в грунтах, загрязненных углеводородами (Baruah et al., 2014; Dupuy et al., 2015; Athar et al., 2016; Kitamura, Maranhо, 2016). Отрицательный эффект в отношении семян связан со снижением их способности к прорастанию и тоже зависит от наличия аренов. По мнению (Кулагин и др., 2011), это связано с более высокой растворимостью данных соединений в почвенной воде, в результате чего они оказывают более сильное воздействие на семена растений.

Нефть может изменять среду обитания растений путем ухудшения воздухообмена, гидрофобизации почвенных частиц, увеличения глыбистости почвы и пр. (Полонский, Полонская, 2013; Hajabbasi et al., 2016) или провоцировать нарушения функционирования почвенного биоценоза, отрицательно сказывающиеся на растениях. Например, при нефтяном загрязнении отмечается возрастание количества почвенных грибов, продуцирующих токсины, которые угнетают и вызывают гибель растений (Колесников и др., 2007; Киреева и др., 2008; Рафикова, 2010).

Противоречивые данные об ответных реакциях растений на нефтяное загрязнение, полученные разными авторами, свидетельствуют о большей значимости опосредованного влияния (как стимулирующего, так и угнетающего), так как оно, в отличие от прямого действия, обусловлено множеством других экологических факторов и может значительно варьировать в зависимости от окружающих условий (Назаров, 2007).

Содержание и развитие растений в присутствии нефти и нефтепродуктов приводит к нарушению их морфо-физиологической и генетической стабильности. Это проявляется во всевозможных эффектах отдаленного действия и последствия, а также в различных компенсаторных реакциях в условиях

хронического загрязнения (Петухова, 2007; Петухова и др., 2014; Dupuy et al., 2015). Степень выраженности нарушений увеличивается при действии нефти с высоким содержанием ароматических углеводородов. Максимальный угнетающий эффект выявлен при учете показателей развития корневой системы (смена мочковатой корневой системы на стрежневую, редукция корневых волосков, утолщение эпидермы, возрастание числа ксилемных элементов и пр.) (Петухова, 2007; Кольцова и др., 2016; Kitamura, Maranhо, 2016). Согласно исследованиям (Осипова, Петухова, 2014; Петухова и др., 2017), нефть оказывает повреждающее действие и на клеточном уровне – у растений в условиях нефтезагрязнения зафиксировано увеличение содержания шиффовых оснований и уменьшение концентрации флавоноидов и фенольных соединений в клетках. Выявлено, что нефтяное загрязнение почв снижает количество пигментов в ассимилирующих органах растений, что приводит к падению активности процессов фотосинтеза и, как следствие, минимизации прироста органического вещества (Ланкин и др., 2014; Корчагина, 2015; Шаяхметова и др., 2017; Emengini et al., 2013; Baruah et al., 2014; Arellano et al., 2015, 2017; Athar et al., 2016; Lassalle et al., 2018). Вероятно, это связано с тем, что под действием углеводородов, например нафталина, в листьях растений происходит нарушение липидного бислоя мембраны плазмалеммы, а затем и липидного бислоя мембран клеточных органелл, в т.ч. хлоропластов. Изменение проницаемости мембран вызывает снижение содержания фотосинтетических пигментов и ингибирование процессов фотосинтеза (Ланкин, 2016).

Установлено отрицательное влияние нефтяного загрязнения на состояние фитоценозов, которое проявляется в снижении общего проективного покрытия, уровня видового и генетического разнообразия, продуктивности и запасов фитомассы, а также в смене одних экоморфных групп другими (Емельянова и др., 2012; Петухова, 2016; Arellano et al., 2015, 2017).

Одни и те же концентрации нефти и нефтепродуктов в одних и тех же условиях неодинаково действуют на различные растения. Наиболее устойчивы многолетние взрослые растения, способные к вегетативному размножению

(Назаров, 2007, 2013). В результате многочисленных исследований было выявлено большое количество видов, которые можно использовать для фиторемедиации нефтезагрязненных почв. Среди них встречаются дикорастущие и окультуренные (Киреева и др., 2011a; Григориади, Султанова, 2014; Ikeura et al., 2015; Liao Ch. et al., 2015; Noori et al., 2015; Shtangeeva et al., 2018), как травянистые, так и древесные виды (Халилова, Юнусова, 2017; Cook, Hesterberg, 2013; Limmer et al., 2018; Saum et al., 2018). Более подробно о растениях-фитомелиорантах будет написано в разделе 1.2.2.3, посвященном фиторемедиации.

В целом, можно утверждать, что нефть и нефтепродукты в подавляющем большинстве случаев негативно воздействуют на все характеристики почвы. Под влиянием этих поллютантов ухудшаются ее агрофизические, агрохимические свойства, снижается активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, а также обеспеченность подвижными формами азота и фосфора. Загрязнение приводит к изменению численности микроорганизмов основных физиологических групп, подавлению биологической активности почвы и деградации биоценозов. В результате нарушения почвенного покрова и растительности усиливаются нежелательные природные процессы – эрозия, деградация, криогенез, которые приводят к снижению или полной потере плодородия почвы.

## **1.2. Рекультивация нефтезагрязненных почв**

На сегодняшний день загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами является одной из самых острых экологических проблем, приводящей к большому числу негативных последствий. Среди них изменение морфологических, физико-химических и химических характеристик почвы; уменьшение ее аэрируемости и дренажа; снижение биологической активности и способности к самоочищению и самовосстановлению; нарушение экологического равновесия в почвенном биоценозе; деградация растительного покрова и депрессия функциональной активности флоры и фауны; выведение большого

количества земель из сельскохозяйственного оборота вследствие снижения или полной потери их продуктивности (ГОСТ ..., 2017). Естественное самоочищение почвы от антропогенного загрязнения – длительный процесс, особенно в регионах с умеренным и холодным климатом (Алексеев, 2011). Поэтому для ликвидации последствий нефтяного воздействия и мобилизации внутренних ресурсов экосистемы на восстановление своих первоначальных свойств и функций применяют **рекультивацию**. Под этим термином понимают мероприятия по предотвращению деградации земель и (или) восстановлению их плодородия посредством приведения в состояние, пригодное для использования в соответствии с целевым назначением, в том числе путем устранения последствий загрязнения почв, восстановления плодородного слоя, создания защитных лесных насаждений (Земельный кодекс ..., 2001). Проведение работ по рекультивации нарушенных почв и грунтов предусмотрено в Федеральном законе "Об охране окружающей среды", Земельном и Лесном кодексах Российской Федерации (Федеральный закон ...2002; Земельный кодекс ..., 2001; Лесной кодекс ..., 2006). Деятельность, связанная с загрязнением земель нефтью и нефтепродуктами, регламентируется постановлениями Правительства РФ (Постановление Правительства ... 2000, 2002, 2014) и другими нормативными документами (Охрана природы..., 2008; ГОСТ ..., 2017). Сроки и методы проведения мероприятий по рекультивации зависят от масштабности и характера загрязнения, давности разлива, типа загрязненной территории, степени ее биологической активности и состояния растительности на конкретном участке (ГОСТ ..., 2017).

Все работы по рекультивации классифицируют на категории *ex situ* и *in situ*. Первые включают в себя обязательное удаление загрязненной почвы и её последующую транспортировку на площадку обработки и складирования. Эскавация позволяет использовать более сложные, быстрые и эффективные методы очистки, однако такие технологии не приемлемы при больших площадях загрязнения и труднодоступности участка. К тому же, изъятие земель вызывает искажение морфологической структуры обрабатываемой территории и нарушение течения поверхностных и подземных вод, а во время удаления и перемещения



загрязненных грунтов персонал, вовлеченный в работу, может быть подвержен отрицательному влиянию нефти и нефтепродуктов.

Технологии *in situ* применяются непосредственно на месте загрязнения, что обеспечивает существенную экономию средств и снижает риск воздействия поллютантов на человека и окружающую среду во время извлечения и транспортировки почв. Основной сложностью при использовании таких приемов является гетерогенная природа грунта очищаемого участка, как с геологической точки зрения, так и с точки зрения распространения загрязнения.

Согласно (ГОСТ ..., 2017) рекультивацию нефтезагрязненных земель рекомендуется проводить последовательно в два этапа: технический и биологический.

### **1.2.1. Технический этап рекультивации**

Технический этап рекультивации почвы после нефтяного разлива предусматривает комплекс работ по максимальному сдерживанию распространения загрязнения, а также организации рельефа и ландшафта затронутой территории (в т.ч. вырубка растительности), позволяющей максимально оперативно провести работы по ликвидации аварийной ситуации и рекультивации нарушенных грунтов (ГОСТ ..., 2017). Ограничение распространения нефти осуществляют с помощью таких технологических приемов как обваловка; установка барьеров, дамб, гидрозатворов, ограждающих каналов и бонов, которые могут применяться на заболоченных территориях, а также на землях с развитой сетью поверхностных водоемов; сбор нефти с поверхности почвы с помощью специальных средств, машин и механизмов (эти приемы часто относят к механическим методам очистки нефтезагрязненной почвы). Кроме того, для купирования разливов используют химические препараты: эмульгаторы для создания эмульсий с целью диспергирования нефти и ускорения ее разложения; отвердители для придания ей густой консистенции и последующего механического удаления; моющие средства для смывания нефтяных пленок и пятен с загрязненных участков. В результате применения

химических средств происходит значительное сокращение площади разлива (утолщение пленки), отверждение нефти (гелеобразование), превращение ее в резиноподобную массу, легко удаляемую механическими средствами. Такое загущение позволяет надежно локализовать на земле нефтяное пятно.

После проведения ограничительных мероприятий иногда производят механический сбор загрязненного грунта и вывоз его на свалку для естественного разложения или засыпку свежезагрязненной почвы песком или торфом, после чего осуществляют перепахивание или рыхление. При таком варианте «очистки» происходит захоронение и консервация нефти в нижних почвенных слоях, где условия для протекания процессов деструкции углеводородов и естественного самоочищения почвенной среды хуже. Это приводит к образованию внутрипочвенных потоков нефти и загрязнению грунтовых вод (Кузнецов и др., 2012; Клещенок и др., 2012). Оба этих способа создают очаги вторичного загрязнения окружающей среды.

Кроме механических методов очистки возможно применение физико-химических методов, к которым относят: промывку земли с применением поверхностно-активных веществ (ПАВ); вентиляцию грунта с помощью дренажных систем (Thomé et al., 2014); экстракцию загрязнителей летучими растворителями в промывных барабанах с последующей отгонкой остатков растворителей паром (Трофимов, 2013); сорбцию (Фокина и др., 2014; Шагиев и др., 2016; Сулименко и др., 2017; Федотова, Мелкозеров, 2017; Цомбуева и др., 2017); термические десорбцию и деструкцию, в процессе которых происходит выпаривание углеводородов (Трофимов, 2013; Tatano et al., 2013; Falciglia, Vagliasindi, 2015); электрохимическую обработку с помощью погружных электродов, на которые осаждаются загрязняющие вещества (Пряничникова и др., 2016; Пряничникова, 2018); очистку ультразвуком, вызывающим кавитацию, под воздействием которой твердые частицы удаляются с поверхности почвы (Hu et al., 2014; Li X. et al., 2014); сжигание (Трофимов, 2013).

Недостатками механических и физико-химических методов являются высокие экономические, энергетические затраты, сложное аппаратное оформление и негативное воздействие на окружающую среду, которое проявляется в уничтожении плодородного слоя почвы, трансформации одних веществ в другие, вред от которых иногда оказывается еще больше, чем возможный ущерб от загрязнения нефтью, а также в образовании вторичных отходов, в свою очередь, нуждающихся в утилизации (Смольникова и др., 2011; Халилова, Елизарьева, 2016; Koshlaf, Ball, 2017).

### **1.2.2. Биологический этап рекультивации**

После проведения технических операций по предотвращению распространения загрязнителя, снижению его содержания, организации рельефа очищаемой территории (удаления мусора, поврежденной растительности, выравнивания поверхности и пр.), приступают к биологическому этапу рекультивации. Его целью является возвращение нефтезагрязненным землям хозяйственной и экологической ценности путем улучшения их агрофизических, агрохимических, биохимических и других свойств и создания условий для последующего восстановления видового разнообразия флоры и фауны. Это достигается с помощью комплекса агротехнических, агрохимических, биотехнологических и фитомелиоративных мероприятий (ГОСТ ..., 2017; Varjani, 2017a, 2017b). Выбор способов биологической рекультивации происходит с учетом природно-климатических условий, биоразнообразия, достигнутых параметров очищения на предыдущем техническом этапе, экономической и экологической целесообразности, целевого назначения и разрешенного использования земель (ГОСТ ..., 2017). Иногда для улучшения качества очистки допустимо предварительное разбавление сильно загрязненного грунта чистой почвой, песком, опилками или соломой.

Темпы биodeградации углеводов зависят от множества факторов, и для увеличения эффективности процесса требуется оптимизация условий для роста и

развития микроорганизмов и растений, для чего применяют различные агротехнические и агрохимические приемы.

Важную роль при биоразложении нефти и нефтепродуктов играет кислотность нефтезагрязненных почв, т.к. значения рН, близкие к нейтральным, являются наиболее оптимальными для жизнедеятельности почвенных микроорганизмов и растений (Prabhakaran et al., 2014; Suja et al., 2014; Varjani, Upasani, 2017a). Поддержание почвы во влажном состоянии улучшает агрохимические свойства земель, в частности, влияет на подвижность питательных веществ, микробиологическую деятельность и активность биохимических процессов (Клещенок и др., 2012; Насырова и др., 2017; Hajabbasi, 2016; Alavi et al., 2017). Для улучшения водно-воздушного режима рекультивируемого грунта, разрушения битумных корок на поверхности почвы и измельчения отмершей древесно-кустарниковой растительности применяют различные приемы механической обработки (рыхление, фрезерование и пр.) (Hajabbasi, 2016; Alavi et al., 2017). С целью интенсификации биодegradации углеводов и ускорения роста растений, в почву вносят органические и минеральные удобрения, биогенные добавки, содержащие такие элементы, как азот, фосфор, калий (Логинов и др., 2009; Мязин, 2014; Пунтус и др., 2015; Suja et al., 2014; Agarry, Latinwo, 2015).

Еще одним значимым параметром, определяющим темпы микробиологического разложения нефти и нефтепродуктов в почве, является температура, оптимальным значением которой считается 20-37°C, хотя некоторые исследователи полагают, что биодegradация более эффективна при 30-40°C, т.к. повышенная температура уменьшает вязкость и увеличивает растворимость углеводов, ускоряет диффузию гидрофобных загрязнителей и тем самым повышает скорость их биоокисления (Koshlaf, Ball, 2017; Yuniati, 2018). При низких температурах интенсивность биодеструкции падает, что связывают со снижением ферментативной активности (Bisht et al., 2015).

Кроме вышперечисленного, на процесс биодеструкции нефти в почве влияют такие факторы как деятельность аборигенной микробиоты, концентрация,

химическая структура и биодоступность поллютанта, а также возраст загрязнения (Koshlaf, Ball, 2017; Al-Hawash et al., 2018c; Yuniati, 2018).

### 1.2.2.1. Технологии биоремедиации нефтезагрязненной почвы

Одновременно с агротехническими мероприятиями по улучшению свойств почвы или сразу после них приступают к **биоремедиации**, под которой понимают комплекс методов очистки, основанный на использовании биохимического потенциала биологических объектов (микроорганизмов, водорослей, высших растений, червей) для детоксикации поллютантов или снижения их концентрации в окружающей среде. Преимущество биоремедиационных технологий связано с возможностями живых организмов, особенно микроорганизмов (Fukuhara et al., 2013; Shankar et al., 2014; Varjani, 2017a), метаболизировать в той или иной степени огромное число различных органических веществ, а также с их безопасностью для экосистем и отсутствием в результате их деятельности вторичных отходов и загрязнителей (Назаренко и др., 2018; Ivshina et al., 2015; Vodyanitskii et al., 2016). Кроме того, стоимость биоремедиации намного меньше по сравнению с механическими и физико-химическими способами (Orellana et al., 2017). К недостаткам биологических процессов очистки и восстановления почв относятся невысокая скорость биодеградации токсиканта, зависимость от почвенных и климатических условий (Янкевич и др., 2015).

Согласно принятой международной классификации, биоремедиационные технологии делятся на три группы (Янкевич и др., 2015; Varjani, Urasani, 2017a).

При **биоремедиации *on site*** загрязненная почва остается на месте, что позволяет существенно снизить затраты на очистку, только при необходимости механически снимается верхний, сильно загрязненный слой. Суть технологии состоит либо в активации аборигенной микробиоты, обладающей способностью к окислению нефтяных углеводородов (биостимуляция), либо во внесении в места загрязнения специальных микроорганизмов-нефтедеструкторов, часто в составе биопрепаратов (биодополнение, аугментация) (Яппаров и др., 2012; Мадякина и др., 2017; Roy et al., 2014; Suja et al., 2014; Szulc et al., 2014; Wu et al., 2016).

**При биоремедиации *ex situ*** производят извлечение загрязненной почвы и ее очистку либо за счет биостимулирования аборигенной микробиоты агротехническими приемами (рыхление, внесение минеральных удобрений, полив) или обработки биопрепаратами-нефтедеструкторами одновременно с поливом и внесением удобрений (Guarino et al., 2017), либо путем отмывания и проведения агротехнических мероприятий, биоаугментации и фиторемедиации, либо проведением жидкофазной или твердофазной ферментации в биореакторах с добавлением биогенных элементов в аэробных или анаэробных условиях.

**При биоремедиации *in situ*** для стимуляции жизнедеятельности почвенных микроорганизмов и миграции загрязнителей в зону дерна и корневой ризосферы проводят нагнетание воздуха через скважины, который потом очищается в специальных установках. При реализации этих методов, кроме насыщения воздухом, применяют биогенные элементы и добавки (обычно биологически совместимые поверхностно-активные агенты), способствующие десорбции адсорбированных на частицах почвы загрязняющих веществ и увеличению их биодоступности для аборигенной или интродуцированной микробиоты (Янкевич и др., 2015; Thomé et al., 2014; Lim et al., 2016; Guarino et al., 2017).

#### **1.2.2.2. Очистка нефтезагрязненной почвы с помощью биопрепаратов**

Как уже было сказано выше, биоремедиация включает в себя мероприятия по очистке почв с помощью биологических объектов, при этом ведущую роль в этом процессе играют микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды в процессе своей жизнедеятельности (Хоменко, Ногина, 2015; Udgire et al., 2015; Wolińska et al., 2016). Это свойство связывают с наличием у них ферментной системы оксигеназ, позволяющей им включать молекулярный кислород непосредственно в углеводород, образуя при этом окисленные соединения. В результате этого углерод из нефти и нефтепродуктов частично преобразуется в углекислый газ, метан, частично переходит в биомассу клеток, частично трансформируется в гумус и закрепляется в почве (Ron, Rosenberg, 2014). При

биоремедиации нефтезагрязненных почв посредством микроорганизмов используют два основных приёма (Lim et al., 2016; Wu et al., 2016; Yuniati, 2018):

– **биостимуляция** – активация аборигенной нефтеокисляющей микробиоты путем внесения удобрений (минеральных и органических) и агротехнических приемов (рыхление, полив, добавление структураторов и пр.) (Agarry, Latinwo, 2015; Naowasarn, Leungprasert, 2016; Benyahia, Embaby, 2016; Adekunle et al., 2017);

– **биоаугментация (биодополнение)** – внесение культур нефтеокисляющих микроорганизмов (в основном в виде биопрепаратов), способных к деструкции углеводов. Применение интродукции целесообразно, когда численность аборигенных микроорганизмов мала или они не способны к деградации всего спектра (или его большей части) углеводородсодержащих веществ, составляющих субстанцию загрязнителя, или процесс его разложения протекает с низкой скоростью, что характерно для регионов с холодными климатическими условиями (Алексеев, 2011). Также внесение дополнительного количества микроорганизмов совершенно необходимо в случаях аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, когда местная микробиота испытывает токсический шок от залпового воздействия поллютанта.

Несмотря на то, что в нашей стране разработано много биопрепаратов-нефтедеструкторов (Водянова и др., 2010; Киреева и др., 2010б; Рогозина и др., 2010; Барахнина, 2011; Кузнецов и др., 2015а; Морозова и др., 2015), большая часть из них не применяется. Наиболее известны такие биопрепараты как «Путидойл» (*P. putida*) (Дядечко и др., 1984, 1990), «Деворойл» (дрожжи р. *Candida* и бактерии *Rhodococcus* sp., *R. maris*, *R. erythropolis*, *Alcaligenes* sp. и *P. stutzeri*) (Борзенков и др., 1994), серия биопрепаратов «Биодеструктор» (Валентис, Аллегро, Торнадо, Лидер) (каждый препарат содержит по одному какому-либо штамму *Acinetobacter bicocum*, *Acinetobacter valentis*, *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* sp.) (Мурзаков и др., 1993), «Дестройл» (*Acinetobacter* sp.) (Ихсанов, Ихсанова, 2000), «Универсал» (дрожжи *Rhodotorula glutinis* и бактерии *R. equi* (3 штамма) (Маркарова, 2004; Киреева, 2012; Мелехина и др., 2016), «Лессорб-

био» (*Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp.) (Чугунов и др., 2002), «Родер» (*R. rubber* и *R. erythropolis*) (Мурьгина и др., 2001, 2007; Албулов и др., 2013; Мелехина и др., 2016; Murygina et al., 2005; Gaydamaka, Murygina, 2013), «Экойл» (*Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp.) (Холоденко и др., 2002), биопрепараты серии «Нафтокс» (*Mycobacterium phlei*, *P. aeruginosa*, *Rhodococcus* sp. или только *P. aeruginosa* или только *P. citronellolis*) (Белонин и др., 1994; Рогозина, 2010; Рогозина и др., 2013а, 2013б, 2014), «Биоойл» (*Enterobacter* sp., *Saccharometes* sp., *Bacillus* sp. (2 штамма)) (Алексеев и др., 2008), «Микробак» (*Pseudomonas* sp., *P. putida*, *Rhodococcus* sp. (2 штамма)) (Филонов и др., 2007б, 2010а; Филонов, 2016; Ветрова и др., 2013а). Некоторые биопрепараты рекомендованы не только для очистки почвы, но и для водных сред, а также для обезвреживания нефтяных шламов (см. раздел 2.4 и 4.3).

Основой биопрепаратов являются один или несколько штаммов микроорганизмов-деструкторов, эффективно разлагающих углеводороды нефти. В последнее время всё чаще используют биопрепараты, состоящие из нескольких штаммов, т.к. интродукция монокультуры УОМ не может полностью решить проблему очистки от такого сложного многокомпонентного загрязнителя, которым является нефть. Полибактериальные препараты, содержащие штаммы, относящиеся к разным таксономическим группам и отличающиеся по скорости роста, спектру потребляемых субстратов и особенностям метаболизма, имеют более широкие адаптационные и экологические возможности (Ветрова и др., 2013б; Брянская и др., 2014; Ильичева и др., 2014; Poi et al., 2017; Zhan et al., 2017). Также между членами ассоциации возможны синергетические взаимодействия. Например, один из них может удалять токсичные для других промежуточные продукты окисления углеводородов или выделять метаболиты, которые являются факторами роста для иных штаммов. Таким образом, при применении микробных ассоциаций (консорциумов), как природных, так и искусственно разработанных, биодеградация нефти происходит полнее и за меньшие сроки (Ильичева и др., 2014; Хидиятуллина, 2014; Делеган и др., 2016а,



2017; Салтынбаев и др., 2017; Хасенова и др., 2017; Alkhatib et al., 2011; Guizhou et al., 2013; Zaki, Fawzi, 2013; Suja et al., 2014; Poi et al., 2017; Zhan et al., 2017).

Также в состав биопрепаратов могут входить сорбенты, носители, стабилизаторы, консерванты, ферменты, поверхностно-активные вещества, различные органические и минеральные вещества (Морозова и др., 2015; Белик, 2017; Салтыкова и др., 2017).

Микроорганизмы и их ассоциации, являющиеся основой биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, обязаны соответствовать ряду требований и обладать такими свойствами как: высокая эффективность; безопасность для человека и окружающей среды; устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Биопрепараты не должны ухудшать экологическую обстановку на восстанавливаемой территории. Они не могут подавлять аборигенную микробиоту, способствовать эвтрофизированию водоемов или вторичному загрязнению объекта за счет повышенной биомассы интродуцированных микроорганизмов, а также увеличивать дозу внесения удобрений в почву (Водянова и др., 2010; Киреева и др., 2010б; Рогозина и др., 2010; Барахнина, 2011; Кузнецов и др., 2015а). Кроме того, биопрепараты должны быть изготовлены в соответствии с техническими условиями и снабжены подробной инструкцией по применению, иметь разрешение к использованию согласно законодательству РФ, а также быть удобными для перевозки любыми доступными видами транспорта на любые расстояния (ГОСТ ..., 2017).

В настоящее время биопрепараты нефтеокисляющего действия изготавливают в трех основных формах (ГОСТ ..., 2017): жидкая (несепарированная биомасса после ферментации с массовой долей влаги до 99% и титром живых клеток  $10^7$ - $10^8$  в 1 мл); пастообразная (сепарированная биомасса с массовой долей влаги до 30% и титром живых клеток до  $10^9$ - $10^{10}$  в 1 мл), которая может нуждаться в предварительной активизации перед применением и используется в виде водного раствора; сухая (лиофилизированная или распылительно высушенная в токе теплого воздуха биомасса влажностью от 3 до

5% и числом клеток до  $10^9$  в 1 г). Эта форма требует обязательной активизации перед использованием, т.е. добавления воды и барботирования водного раствора препарата в присутствии минеральных и органических добавок в течение некоторого времени. Также готовые биопрепараты могут быть нанесены на органические и минеральные носители (их смеси). В таком виде они не требуют предварительной активизации и могут вноситься в почву и в воду в нерастворенном виде одновременно с удобрениями.

Из-за сложного многокомпонентного состава нефти, который сильно варьируется в зависимости от месторождения, резких различий в химических свойствах между нефтью и нефтепродуктами, а также по причине неодинаковых природно-климатических и гидротермических условий районов добычи, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов, невозможно создание какого-то одного универсального биопрепарата-нефтедеструктора. Поэтому работы по разработке биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения и технологий их применения по-прежнему будут оставаться актуальными.

### **1.2.2.3. Фиторемедиация**

Фиторемедиация, т.е. очистка и восстановление окружающей среды с помощью растений, широко используется и как самостоятельный прием, способствующий удалению из почвы загрязняющих веществ, и как завершающий этап многоступенчатых рекультивационных технологий, необходимый для полноценной интеграции восстанавливаемого участка в окружающий ландшафт (Янкевич и др., 2015; Fester et al., 2014; Al-Baldawi et al., 2015; Ijaz et al., 2015; Lim et al., 2016; Lifshits et al., 2017). Эта технология не предусматривает экскавации грунта и может применяться на больших площадях, что особенно важно в условиях нашей страны. Она способствует улучшению качества и структуры почв, а также защите их от эрозии; уменьшает объемы отходов, отправляемых на свалки; применима к широкому кругу токсикантов (тяжелые металлы, стойкие органические загрязнители, нефтяные углеводороды, ПАУ и пр.); не требует

дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала; относительно дешева. Например, на фиторемедиацию в США тратится 100-150 млн. долларов в год, что составляет 0,5% всех затрат на очистку окружающей среды (для сравнения – затраты на биоремедиацию с использованием бактерий составляют 2%) (Степанова и др., 2017). Преимущества фиторемедиации как экономически выгодной, экологически безопасной и эстетически привлекательной биотехнологии восстановления загрязненных территорий *in situ*, нашедшей широкое одобрение у общественности, показаны в большом количестве исследований (Муратова, 2013; Егорова и др., 2014; Копцик, 2014; Кузнецов и др., 2015б; Ульрих, Тимофеева, 2016; Muratova et al., 2010; Kang J.W., 2014; Chen et al., 2015; Benson et al., 2017; Fatima et al., 2017; Wang et al., 2017).

К недостаткам фиторемедиации относится ее пригодность только для территорий с низким уровнем загрязнения, зависимость от климатических и сезонных условий и отсутствие эффективности при повреждении растительности болезнями или вредителями. Ее применение ограничивается растворимостью и доступностью поллютантов, а также степенью устойчивости растений к их воздействию, т.е. способностью выживать в неблагоприятных условиях загрязнения и наращивать биомассу и степень проективного покрытия (Копцик, 2014; Кузнецов и др., 2015а, 2015б; Wang et al., 2017). К растениям, используемым для очистки окружающей среды, предъявляются определенные требования: толерантность к высоким концентрациям поллютантов; способность поглощать и аккумулировать их в высоких концентрациях; способность к транспорту их из корневой системы в надземную утилизируемую биомассу; высокая скорость роста, достаточно большая биомасса и крупные размеры; глубоко разрастающаяся корневая система; высокая сопротивляемость к болезням и вредителям; удобство для уборки и непривлекательность для животных (Киреева и др., 2011б).

Во многих лабораториях мира проводятся масштабные исследования различных видов растений, которые могут быть использованы в рекультивации загрязненных нефтью почв. Растения-фиторемедианты наиболее широко представлены среди таких семейств, как злаковые (Ерофеевская, Глянцева,

2012; Григориади и др., 2013; Гаврилин, Шигапов, 2015; Красноперова, 2015; Томский и др., 2015; Мязин, Редькина, 2016а, 2016б; Синдерева и др., 2016; Шулаев и др., 2016, 2017; Степанова и др., 2017; Afzal et al., 2013, 2014; Han et al., 2016; Shahsavari et al., 2016; Alavi et al., 2017; Patel, Patra, 2017; Płociniczak et al., 2017) и бобовые (Назаров, 2013; Пахарькова и др., 2015; Федорова и др., 2015; Noori et al., 2012; Baruah et al., 2016; Marchand et al., 2016; Alavi et al., 2017; Balliana et al., 2017; Muratova et al., 2018; Saum et al., 2018). Для очистки почв от нефти и нефтепродуктов предлагают высаживать представителей семейств зонтичные (Баширова и др., 2012), осоковые (Basumatary et al., 2012; Bordoloi, Basumatary, 2015), рогозовые (Шулаев и др., 2016, 2017; Ijaz et al., 2015), амарантовые (Moubasher et al., 2015), эвкалиптовые (Taheria et al., 2018), молочайные (Singha, Pandey, 2017) и пр. С этой же целью можно использовать смеси трав – газонных или дикорастущих (Красноперова, 2015; Синдерева и др., 2016).

Показано, что деревья (тополь, ива, мескит, акация, сосна, эвкалипт) обладают быстрым ростом, глубоким укоренением, высокой транспирацией и гипераккумуляцией нефтепродуктов, а злаки образуют множество корней в поверхностном слое почвы, что способствует ее устойчивости к эрозии и связыванию углеводов (Халилова, Юнусова, 2017; Cook, Hesterberg, 2013; Lim et al., 2018; Saum et al., 2018; Taheria et al., 2018).

Основными методами очистки от загрязнений с помощью растений являются (Горшков, 2010; Киреева и др., 2011б; Копчик, 2014; Степанова и др., 2017; Frick et al., 1999; Materac et al., 2015; Lim et al., 2016; Liang et al., 2017; Fatima et al., 2017):

- фитостабилизация (фитоэкстракция, фитоаккумуляция) – поглощение корневой системой растений загрязняющих веществ из почвы или грунтовых вод с последующей транслокацией и накоплением их в биомассе наземных органов;
- фитодеградация (фитотрансформация) – способность растений осуществлять ферментативную внутреннюю деградацию токсикантов путем характерных для растительных клеток метаболических превращений либо

разлагать нефтепродукты под действием корневых выделений (внешняя деградация);

– фитоиспарение (фитоволатилизация) – поглощение растением из почвы или воды поллютанта с выделением его в атмосферу в процессе транспирации, после чего он рассеивается до безопасных концентраций или подвергается фотоокислению;

– гидравлический контроль (фитогидравлика). Это промежуточный метод между тремя вышеуказанными, основанный на том, что древесное растение с хорошо развитой корневой системой (тополь, береза, ива, эвкалипт) «вытягивает» из грунтовых вод и потребляет вместе с влагой загрязняющее вещество, которое оно в дальнейшем может либо разрушать, либо испарять;

– ризодеградация, принцип которой состоит в том, что разложение загрязняющих веществ производится не растением, а микроорганизмами, обитающими в непосредственной близости к его корням, т.е. в ризосфере. Роль растения заключается в значительном усилении эффективности работы микроорганизмов за счет биологически активных корневых выделений. Более подробно микробно-растительные взаимодействия в процессе очистки нефтезагрязненных почв будут рассмотрены в разделе 6.4.

По мнению ряда исследователей (Megharaj et al., 2011; Lifshits et al., 2017; Wang et al., 2017), фиторемедиацию следует применять в комплексе с другими методами биоремедиации и небиологическими технологиями очистки. Это позволит скорректировать ее недостатки (зависимость от свойств почвы, климатических условий, токсичности поллютанта и пр.) и обеспечить наиболее эффективную и полную очистку окружающей среды от антропогенных загрязнений.

## ГЛАВА 2. ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ НА ВОДНУЮ СРЕДУ

### 2.1. Особенности нефтяного загрязнения воды

Нефтяное загрязнение является одним из ведущих факторов антропогенного воздействия на водные экосистемы. Ежегодно в Мировой океан попадает по разным оценкам от 0,5 до 11 млн. т нефти и нефтепродуктов (Гуслинский, 2011; Владимиров, 2014; Патин, 2017; Янковский и др., 2017). Однако вопреки распространенному мнению, аварийные разливы, вызванные добычей и транспортировкой, не являются главным источником загрязнения Мирового океана. Их вклад составляет менее 10% от суммарного потока углеводородов в морскую среду. Первый по значимости (около 50%) канал поступления нефти имеет природное происхождение и объясняется в основном с ее выходом из трещин и разломов морского дна. Порядка 30% от общего нефтесодержания связано с судоходством. Сюда входят как штатные операции (сброс льяльных и балластных вод, очистка судов и др.) так, и аварийные ситуации, и нелегальные сбросы судовых нефтяных отходов. Еще около 10% обеспечивается за счет переноса с суши по рекам, деятельности на берегу, связанной с потреблением, хранением и переработкой нефти, а также с удалением в прибрежные воды нефтесодержащих отходов разного состава и происхождения (Патин, 2017).

Несколько иная картина складывается для пресноводных водоемов, главной причиной увеличения содержания углеводородов в которых являются аварии на объектах добычи и транспортировки нефти (Карпович, Масленникова, 2013). Вторым по значимости загрязнителем водных объектов являются сточные воды, содержащие различные углеводороды. Утечка нефтяных компонентов происходит также за счет миграции и рассеяния при обычной эксплуатации нефтепромысловых объектов (Назаров, Назаров, 2013). Источником загрязнения, не связанным с нефтедобычей, является водный транспорт и коммунально-бытовая деятельность. Также углеводороды поступают в водоемы и в ходе выпадения атмосферных осадков, с поверхностным стоком в результате дренирования торфов и почв (Кульков и др., 2010; Моисеенко и др., 2012;

Паничева и др., 2012; Кузнецов, Федоров, 2014; Московченко, Убайдуллаев, 2014). По мнению некоторых авторов, вклад естественных процессов в загрязнение нефтью пресных водоемов может достигать 50% (Кузнецов, Федоров, 2014; Московченко, Убайдуллаев, 2014).

Нефть, попадая в водный объект, достаточно быстро (часы и сутки) перестает существовать как исходный субстрат и распределяется на агрегатные фракции (формы нахождения), одной из которых является пленка. Она тонким слоем локализуется на поверхности, приводя к нарушению газо-, энерго-, тепло- и влагообмена между атмосферой и гидросферой (Караев, Шихалиев, 2014; Патин, 2017). Это не только негативно сказывается на физических, химических и гидробиологических условиях водной среды и жизнедеятельности ее обитателей, но и способно серьезно повлиять на климат и кислородный баланс в атмосфере Земли, а значит, ухудшить экологическую обстановку на планете в целом и жизнь человека в частности.

Помимо нефтяной пленки, углеводороды присутствуют в воде в растворенном или эмульгированном виде, а тяжелые фракции оседают на дно (Патин, 2008; Воробьев, 2013; Thibodeaux et al., 2011). Попав в воду, нефть подвергается переносу на поверхности и в толще воды (растекание, дрейф, седиментация, затопление), с ней происходит ряд превращений (испарение, растворение, диспергирование, эмульгирование, окисление, биodeградация), в ходе которых она меняет свои физические и химические свойства. Скорость этих процессов определяется количеством и составом нефти, особенностями углеводородов (плотность, вязкость, поверхностное натяжение), а также условиями водной среды, временем года и преобладающими погодными условиями (Шкапенко и др., 2011; Паничева и др., 2012; Воробьев, 2013; Немировская, 2013, 2015; Немировская и др., 2015, 2016; Леонов и др., 2016, 2017; Патин, 2017). Характерной чертой распределения нефти в воде является неоднородность ее содержания в водных экосистемах, локализация на границе раздела воды с атмосферой, дном (донные осадки) и берегом.

Самоочищение поверхностных вод от нефтяного загрязнения протекает под действием физических, химических и биологических факторов. Однако за счет первых двух происходят лишь частичные изменения в составе нефти и нефтепродуктов без полной деструкции. Ведущее место в процессе самоочищения водоемов принадлежит биологическим факторам, среди которых решающую роль играют нефтеокисляющие микроорганизмы. Благодаря их деятельности нефть трансформируется до простых соединений, происходит накопление нового органического вещества и дальнейшее включение его в круговорот углерода в водоемах. На этом основан метод биологической очистки с применением препаратов, содержащих УОМ.

## **2.2. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на различные объекты гидросферы**

Нефть и нефтепродукты представляют собой наиболее опасные загрязнители водного бассейна, которые затрудняют все виды водопользования, оказывают отрицательное воздействие на трофические связи и круговороты веществ, загрязняют берега рек и озер, побережья морей и океанов – места обитания многих растений и животных, приводят к ухудшению физических (цвет, рН, вязкость) и органолептических (вкус, запах) свойств воды.

В токсикологическом отношении нефть – это неспецифический групповой токсикант переменного состава, который относится к категории слаботоксичных и/или умеренно токсичных веществ. Наибольшую опасность для живых организмов представляют растворимые моноциклические ароматические углеводороды и устойчивые высокомолекулярные ПАУ. Большинство видов водной фауны особенно уязвимы к действию нефти на ранних стадиях своего развития (икра, личинки, молодь) (Технический информационный..., 2011).

В целом, тяжесть биологических последствий нефтяных разливов зависит от типа (легкая, средняя, тяжелая) и количества разлитой нефти, природной характеристики района разлива (геоморфология побережья, климат, глубина, тип осадков и пр., текущей гидрометеорологической ситуации (температура, скорость



течения, ветер, время года и др., а также видового состава, распределения, численности и других показателей состояния местной фауны и флоры.

К числу наиболее характерных проявлений вредного влияния нефти на водные организмы относят (Патин, 2017):

- поражающие эффекты при непосредственном физическом контакте нефти с организмами, которые наиболее ярко проявляются при соприкосновении птиц и млекопитающих с пленкой нефти, а также в условиях хронического нефтяного загрязнения донных осадков;

- прямую и быструю интоксикацию при сильном нефтяном загрязнении, что характерно для легких типов нефти с повышенным содержанием растворимых низкомолекулярных аренов;

- сублетальные (стрессовые) нарушения физиолого-биохимических, поведенческих и других жизненно важных процессов;

- накопление углеводородов в промысловых организмах с появлением в них нефтяных запахов и привкусов. Например, содержание в воде нефтепродуктов выше 0,1 мг/л придает мясу рыбы неустранимый при любых технологических обработках привкус и специфический запах нефти (Демьянова и др., 2013).

Следует отметить, что в целом, вредное действие нефти на водных обитателей может определяться не только и не столько интоксикацией организмов, сколько прямым физическим контактом с живыми организмами на поверхности водоемов и на берегах, а также нарушением их местообитаний. Попав в водную среду, нефть распределяется по ее профилю и оказывает влияние на все группы организмов, обитающих как в поверхностном слое, так и в толще воды и в донных осадках.

*Орнитофауна.* Наиболее экологически опасная миграционная форма нефти – пленка (слик). А самым уязвимым при такой форме нефтяного загрязнения элементом экосистем являются водоплавающие птицы (Дубина, Катин, 2012; Haney et al., 2014; Fox et al., 2016). Попадание нефти на оперение птиц приводит к переохлаждению, снижению плавучести, способности летать и добывать себе

корм и часто заканчивается их гибелью. При попытках удалить клювом загрязнение нефть заглатывается, что может привести к серьезным последствиям, например, к застою в легких, кишечному или легочному кровотечению, пневмонии, а также нарушениям работы печени и почек (Дягилец и др., 2014). По возвращении птицы в гнездо нефть с оперения переносится на птенцов или на высиживаемые яйца. Последнее грозит истончением скорлупы, невылуплением потомства или нарушениями в его развитии (Технический информационный..., 2011; Григорьев и др., 2014). Тяжесть последствий нефтяных разливов для популяций птиц определяется главным образом не количеством нефти, а ее нахождением в районах и местах их массового скопления в сезоны размножения или массовой миграции. При прочих равных условиях, чем ниже температуры воды и воздуха, тем выше риск летальных исходов для птиц (Патин, 2008).

Водные *млекопитающие* гибнут в основном за счет потери мехом теплоизоляционных свойств от соприкосновения с нефтью (Говорушко, 2011).

*Ихтиофауна.* Многие рыбы, обитающие на глубине менее 100 м, способны избегать мест загрязнения. Негативные последствия более вероятны для придонных видов и молоди рыб при нефтяных разливах в прибрежной мелководной части моря и в зонах слабой циркуляции воды. Тяжесть воздействия резко возрастает, если разлив совпадает по времени и месту с массовым и локализованным на мелководье нерестом рыб (Патин, 2017; Langangen et al., 2017; Carroll et al., 2018). Содержащиеся в воде углеводороды, попадая на эпителий жабр, могут вызывать нарушения водного и солевого обмена, дыхания, расстройства нервной системы, замещение печеночной ткани фиброзной, эрозию плавников, замедление роста (Каниева, Федорова, 2014; Fodrie et al., 2014). Биоаккумуляция углеводородов зависит от их гидрофобных и липофильных свойств, поэтому они сосредотачиваются в органах и тканях с повышенным содержанием жиров, например, гонадах и пищеварительных железах, в жировых отложениях (Патин, 2008; Умербаева, Попова, 2014; Harvey et al., 2014; Murawski et al., 2014; Al-Saad et al., 2017). Кроме прямого токсического действия, резкое

сокращение численности ихтиофауны может быть связано уничтожением в результате загрязнения кормовой базы (Патин, 2017; Langangen et al., 2017).

*Планктон* является основой большинства пищевых цепей в море и включает микроорганизмы, фитопланктон (маленькие, часто одноклеточные водоросли) и зоопланктон (мелкие ракообразные, медузы и пр.), яйца и личинки беспозвоночных и рыб. Самая большая плотность планктона наблюдается в прибрежных водах, где концентрация биогенных веществ достаточно высока для его выживания. Образующие его организмы относительно чувствительны к токсическим эффектам углеводов, особенно к водорастворимым фракциям и небольшим каплям нефти. Тем не менее, планктон достаточно быстро возвращается к нормальной плотности и составу после того, как концентрация нефти в воде падает. Такая высокая скорость восстановления связана с коротким временем смены поколений, большим количеством яиц и личинок, распределением на больших площадях и быстрым водообменом (Последствия разливов..., 2015; Jiang et al., 2010; Ning et al., 2011; Huang et al., 2011; Romero-Lopez et al., 2012; Ozhan et al., 2014).

*Бентос*. Содержащие наиболее устойчивые к биологическому разложению нефтяные углеводороды, донные осадки отличаются скудным видовым разнообразием при высокой численности выносливых к загрязнению форм. Так, содержание нефти в количестве 16,72 г/кг в донных отложениях не вызывает гибели червей-тубифицид, отмечается появление молодежи (Воробьев, 2013). Однако по некоторым данным (Лозовой, 2012), нефть и нефтепродукты провоцировали нарушения газового и фильтрационного процессов у бентосных беспозвоночных, изменение дыхательного и сердечного ритмов, поведенческих реакций. Главными изменениями внутренних органов моллюсков рода *Unio* под влиянием различных концентраций нефти являлись нарушения строения эпителиальной ткани жабр, кишечника, почечного мешка (Клишин и др., 2015, 2016). По мнению С.А. Патина (Патин, 2017), среди всех групп морского зообентоса самой высокой устойчивостью к действию нефти отличаются некоторые виды полихет (многощетинковые черви), нематод (круглые черви) и

двустворчатых моллюсков (мидии), а к организмам, которые наиболее быстро элиминируются в условиях сильного нефтяного загрязнения – ракообразные (особенно амфиподы), некоторые иглокожие, брюхоногие моллюски (гастроподы) и усоногие раки (балянусы). Отмечается относительно высокая устойчивость макрофитов, особенно бурых водорослей и ламинарий, к действию нефти, что объясняется защитным действием слизистого покрова на поверхности растений и способностью к прямому размножению с помощью плавающих в воде спор. Кроме того, возможность длительного существования бурой водоросли *Fucus vesiculosus* в условиях нефтяного загрязнения обеспечивается включением углеводов в метаболизм растительных клеток и присутствием на поверхности талломов УОМ (Воскобойников, Пуговкин, 2012; Патин, 2017).

Рост концентрации нефтяных углеводов в донных грунтах приводит к изменению структуры бентоценоза и снижению видового разнообразия в реках (Холмогорова, 2009; Галинуров и др., 2011). Аналогичные результаты получены для морских бентосных сообществ, для большинства из которых, однако характерно достаточно быстрое восстановление (Lee, Lin, 2013; Castège et al., 2014; Ferrando et al, 2015). Негативное действие нефти на бентос проявляется как в результате физического контакта с углеводородами в донных осадках, так и за счет токсических свойств растворенных в морской воде или аккумулярованных в донных осадках поллютантов (Кириевская, 2017).

Бентосные беспозвоночные в силу менее развитых по сравнению с рыбами ферментных и метаболических систем, а также за счет высокой фильтрационной активности и обитания на дне обладают, как правило, повышенной способностью к накоплению нефтяных соединений (Воробьев, 2006; Ларин, 2007; Ларин и др., 2009). Наибольшей способностью аккумулялировать ПАУ без их заметного метаболического разложения в тканях отличаются двустворчатые моллюски-фильтраторы (Патин, 2017).

Таким образом, нефтяные загрязнения вызывают изменения видовой и трофической структур водных экосистем, приводя к нарушению их функционирования и снижению биоразнообразия. Главные последствия

контаминации – образование нефтяной пленки на воде, ухудшающей газообмен в поверхностных слоях, препятствующей проникновению света, и, как следствие, фотосинтезу, а также оседание тяжелых фракций на дно. Особенно сильно негативное влияние разливов в прибрежной зоне и на берегу. Подавляющее большинство представителей фауны особо чувствительны к действию нефти на ранних стадиях развития. Последствия загрязнений для отдельных видов зависят от численности и скорости воспроизводства их популяций. Наиболее подвержены поражению птицы и млекопитающие.

### 2.3. Методы очистки водоемов от разливов нефти

Очистка водных объектов является одной из самых сложных и трудоемких задач при ликвидации последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами, что связано с динамичностью водной среды и сложностью процессов трансформации углеводородов в ней.

В распоряжении служб по борьбе с разливами нефти и нефтепродуктов имеется разнообразный набор методов, которые делятся на 4 группы: механические, термические, физико-химические и биологические (Привалова и др., 2015; Долгополова, Патрушева, 2016; Двадненко, Привалова, 2017; Asadpour et al., 2013; Hoang et al., 2018).

Первоочередной мерой при ликвидации аварий на воде является **механический** сбор нефти, который наиболее эффективен в первые часы после разлива, пока толщина нефтяного слоя остается еще достаточно большой. Со временем под воздействием ветра и течения происходит растекание и дрейф пятна, его площадь увеличивается, а толщина уменьшается, что значительно затрудняет процесс отделения нефти от воды. К числу недостатков механических методов относится и то, что данная технология не решает проблему полностью и после сбора на поверхности остается более 30% нефти, а при использовании всасывающих устройств, они поглощают значительное количество воды, содержащей нефтепродукты в различных состояниях (плавающие, эмульгированные и пр.). Чтобы вернуть ее обратно в водоем требуется

дополнительная очистка, а это существенно удорожает процесс. Достоинствами метода является возможность утилизации собранной нефти и минимальный урон, наносимый экосистеме (Кахраманлы, 2013; Hoang et al., 2018).

Для очистки воды механическими способами применяют либо стационарный сбор нефти с помощью бонов и нефтесборщиков для локализации и удаления нефтяных пятен, либо передвижные скиммеры – специальные устройства, которые отводят, собирают поллютант с поверхности, перекачивают его с помощью насоса в накопительный бак (Лобанова, Угланова, 2016).

**Термический** метод является экологически небезопасным и основан на выжигании нефти. Он применяется при толщине слоя не менее 3 мм (иначе из-за охлаждающего действия воды нефть гореть не будет) и непосредственно сразу после загрязнения до образования эмульсии с водой (Hoang et al., 2018).

**Физико-химические** методы ликвидации разливов нефти базируются на использовании реагентов-диспергентов и сорбентов. Диспергирующие средства разрушают сплошную нефтяную пленку и ускоряют процесс диффузии нефти в водную толщу, восстанавливают водо-, газо-, энергообмен с атмосферой, тем самым приводя к усилению биодеградации. С помощью этих веществ можно быстро и эффективно снизить ущерб от загрязнения для птиц, обитающих на поверхности и для растительности на побережье. Однако большинство препаратов не способно диспергировать очень вязкие нефтепродукты и стойкие эмульсии. К тому же, в качестве диспергентов используются различные ПАВ, большинство из которых являются высокотоксичными соединениями, и их отрицательное воздействие на морские организмы иногда бывает более существенным, чем самой нефти (Fulmer, Hamdan, 2010; Kleindienst et al., 2015; Hoang et al., 2018). Перспективным направлением развития этого метода является использование биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами, что более подробно будет рассмотрено в разделе 6.1.

Сорбционный метод удаления нефти заключается в нанесении и последующем сборе сорбента. Его преимуществом является высокая эффективность при пленках толщиной менее 1 мм, а ограничения связаны с

малым радиусом действия и постепенным изменением сорбционных свойств материалов, громоздкостью сорбентов при хранении и транспортировке, а также с необходимостью сбора и утилизации большого количества нефтенасыщенного сорбента (Гуславский, 2011; Долгополова, Патрушева, 2016; Asadpour et al., 2013).

Для результативного применения сорбентов они должны обладать определенными качествами, такими как гидрофобность, высокая нефтеёмкость, плавучесть, способность к удерживанию нефти при удалении сорбента с акватории, легкость утилизации или биоразлагаемость, устойчивость к разрушению в водной среде, возможность многократной регенерации, простота эксплуатации, эффективность работы в широком диапазоне температур, нетоксичность, оптимальная стоимость (Бойко и др., 2013; Мязин, 2017; Сулименко и др., 2017; Asadpour et al., 2013).

Сорбенты из природных материалов экологически чистые и дешевые, т.к. зачастую они являются отходами какого-либо производства (лузга подсолнечника, скорлупа кедрового ореха, древесные опилки, отходы ватного производства, кокосовое и пальмовое волокно, рисовая шелуха и пр.) или относительно доступны (уголь, цеолит, вермикулит, торф) (Привалова и др., 2017). Однако они тонут вместе с сорбированной нефтью, становясь источником вторичного загрязнения, имеют невысокую сорбционную ёмкость (менее 10 г нефти/г сорбента), с трудом удерживают легкие фракции нефти (бензин, дизельное топливо) и подвержены микробиологическому разложению при их хранении (Бурлака, Бруйка, 2017; Asadpour et al., 2013; Bazargan et al., 2014; Idris et al., 2014). Для ликвидации этих недостатков их модифицируют различными способами, в основном, придавая им гидрофобные свойства (Гесс и др., 2016; Коновалов, 2016; Пыстина и др., 2018; Teli, Valia, 2013; Li et al., 2015; Chai et al., 2016; Onwuka et al., 2016; Alpha et al., 2017; Oribayo et al., 2017).

Синтетические сорбенты (полипропилен, полиуретан, пенополистирол, резиновая крошка и пр.) обладают хорошей поглотительной способностью, однако отличаются большей стоимостью и сложностью утилизации в силу высокой токсичности продуктов горения.

Большинство применяемых на практике технологий механической и физико-химической очистки воды от нефти и нефтепродуктов многостадийны, трудоемки, связаны с большими материальными затратами и не обеспечивают полного удаления загрязнителя с поверхности, не говоря уже об углеводородах, растворенных или эмульгированных в воде (Долгополова, Патрушева, 2016).

На сегодняшний день большое внимание привлекают **биологические методы** очистки водных объектов от нефти и нефтепродуктов, преимуществами которых являются эффективность, экономичность, экологическая безопасность и отсутствие вторичных загрязнений. Для этих целей применяют водные организмы-фильтраторы (малощетинковые черви, мидии) (Воробьев, 2013; Гудимов, 2013; 2014), водные растения (эйхорния, водный мох, элодея, ряска, уруть, рдест, роголистник) (Кручинин и др., 2012; Заводская, Копнина, 2013; Пайдулова, Турковская, 2015; Денисова, 2016; Степанова и др., 2017; Gagnon et al., 2012; Allam et al., 2016; Ateia et al., 2016) и углеводородокисляющие микроорганизмы. Последним принадлежит ведущая роль в процессе очистки воды, т.к. только УОМ способны разлагать нефть и ее производные до безопасных конечных продуктов – углекислого газа и воды. Этому направлению биологической очистки водной среды будет посвящен следующий раздел.

#### **2.4. Очистка водных объектов от нефти и нефтепродуктов с помощью микроорганизмов**

Углеводороды, попадающие в водные экосистемы, являются источниками углерода и энергии для УОМ, тем самым способствуя увеличению их численности при наличии благоприятных условий для роста и развития. В свою очередь, микроорганизмы, используемые для ликвидации нефтяных разливов на воде, являются пищей для планктона и других организмов, поддерживая тем самым определенные трофические связи.

Среди УОМ, обитающих в морской среде, обнаружены представители бактерий (pp. *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Archrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Coryneforms*,



*Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Frankia*, *Nocardiosis*, *Brevibacterium*, *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Alteromonas*, *Oceanospirillales*, *Colwellia*, *Cycloclasticus*), цианобактерий, грибов и водорослей (Гоголева, Немцева, 2012; Xue et al., 2015; Hazen et al., 2016).

Из донных отложений озер, расположенных на территории Сургутского, Нижневартовского и Нефтеюганского районов ХМАО – Югры, выделены 6 штаммов р. *Streptomyces*, которые обладали высокой деструктивной способностью (50-90%) по отношению к нефти в концентрациях от 1 до 5% при температуре 4°C (Коваленко и др., 2018).

Получены данные о том, что бактерии р. *Alcanivorax* играют ведущую роль в деградации линейных углеводородов в загрязненных сырой нефтью водных средах (Santisi et al., 2015). Этот вывод подтвержден в работе (Mapelli et al., 2017), где показано, что кроме бактерий *Oleispira antarctica* основными микроорганизмами, осуществляющими разложение в морской воде н-алканов, являются *Alcanivorax borkumensis* и *Alcanivorax dieselolei*.

Исследована биodeградация углеводородов в морской воде при температуре 5°C при малых размерах капель нефти (9-11 мкм). Представители рр. *Colwellia*, *Oleispira* и сем. *Oceanospirillaceae* трансформировали н-алканы (C<sub>5</sub>-C<sub>36</sub>) более чем на 95% за 31 день, бактерии рр. *Cycloclasticus*, *Marinobacter* и сем. *Alteromonadaceae* и *Flavobacteriaceae* деструктировали ароматические углеводороды (включая ПАУ) более чем на 95% через 64 дня (Brakstad et al., 2015). Mapelli et al. (2017) указывают, что деградация в морской среде ПАУ происходит с помощью *Cycloclasticus pugetii* и *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Последняя также окисляет и линейные алканы.

Микроорганизмы *Oceanisphaera litoralis*, *Pseudoalteromonas citrea*, *P. elyakovii*, выделенные из морской воды у побережья о. Сахалин, разлагают бензиновые фракции, нефть и моторное масло. Штамм *P. citrea* оказался наиболее активным деструктором тяжелых масляных фракций (Струпуль и др., 2009).

В работах (Воскобойников, Пуговкин, 2012; Семенов и др., 2014; Пуговкин, 2017) установлено, что бактериоценозы фукусовых водорослей и эпифитных

углеводородоокисляющих бактерий *P. fluorescens*, *P. guinea*, *Ochrobactrum anthropi*, *R. fascians* способны к утилизации нефтяных углеводородов, успешно выдерживают их высокие концентрации в водной среде и могут вносить весомый вклад в процессы деструкции нефтяных загрязнений в прибрежных морских акваториях полярных и умеренных широт. Предложен способ очистки морской воды от нефти и нефтепродуктов с использованием симбиоза водорослей и УОМ, в котором используют фильтр, представляющий собой систему соединенных между собой синтетических канатов, засаженных водорослями и заселенных нефтеокисляющими микроорганизмами (Нетрусов и др., 2011).

Перспективным направлением очистки водных поверхностей и промышленных сточных вод от нефти и нефтепродуктов является использование биосорбентов, т.е. носителей с иммобилизованными на его поверхности микроорганизмами. Носитель защищает клетки от прямого воздействия токсичных веществ и неблагоприятных внешних факторов (температура, кислотность, концентрация электролитов), что позволяет иммобилизованным УОМ в течение длительного времени сохранять жизнеспособность и метаболическую активность (Wang et al., 2012; Martins et al., 2013; Žur et al., 2016). Кроме того, благодаря иммобилизации собирается значительное количество биомассы и предотвращается ее вынос при поступлении большого объема воды в очистные сооружения. Актуальным является разработка биосорбентов, обладающих способностью к повышенной концентрации растворенных и эмульгированных углеводородов в твердой фазе. Дальнейшая деструкция локализованных загрязнителей нефтеокисляющей микробиотой, иммобилизованной на носителе, обеспечивает эффект саморегенерации сорбента. Многочисленные исследования и полученные по их результатам патенты свидетельствуют, что иммобилизация УОМ способствует повышению эффективности процессов деструкции нефти и нефтепродуктов при очистке загрязненных акваторий, а также нефтесодержащих сточных вод (Морозов и др., 2011, 2017; Сваровская, Алтунина, 2011; Ковальчук, 2013; Артюх и др., 2014;

Галкина и др., 2014; Дедов и др., 2014; Белик, Злобина, 2016; Белик, 2017; Сулименко и др., 2017).

На сегодняшний день разработано большое количество биопрепаратов для очистки водных поверхностей от нефти и нефтепродуктов, как на основе монокультур, так и на основе ассоциаций УОМ. Многие из них применяются также и для удаления нефтезагрязнений из почвы (см. п. 1.2.2.2). Кроме этих, можно привести еще ряд запатентованных в России биопрепаратов (табл. 2.1).

К недостаткам применения биопрепаратов можно отнести их невысокую эффективность при ликвидации крупных разливов нефти и нефтепродуктов, при которых толщина пленки на водной поверхности составляет более 1 мм, а также необходимость внесения значительного количества питательных веществ, стимулирующих активность микробиоты при очистке больших объемов нефтезагрязненных вод (Башкин и др., 2010).

Каждый из рассмотренных методов очистки водной среды от нефтяных углеводородов имеет свои достоинства и недостатки. Выбор способа зависит от конкретного загрязнения, его масштаба и специфики, а также экологической и экономической целесообразности. Но учитывая то, что, ни один из них не может обеспечить полного удаления загрязнителя, наиболее перспективным представляется комплексное использование нескольких методов, которое позволит максимально снизить ущерб окружающей среде.

Таблица 2.1. – Биопрепараты для очистки воды от нефтяного загрязнения

№ п/п	Название биопрепарата	Входящие в состав микроорганизмы	Объект и условия применения	Источник информации
1	Эконадин	<i>P. fluorescens</i> Носитель торф	Вода, сточные воды	Кожанова, 1995
2	Дизойл-М	<i>Candida maltose</i> (2 штамма)	Водоемы, почва, засоленные экосистемы до 41°C, рН3,0-9,0	Авчиева, 1998
3	Композиция	<i>Pseudoamycolata halophobica</i> <i>Kibdelosporangium aridum</i> <i>A. oleovorum</i> <i>R. erythropolis</i>	Вода и почва +7...+17°C	Янкевич и др., 2006
4	Консорциум штаммов	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i>	Подземные воды	Максимович, Хмурчик, 2007
5	Биопрепарат	<i>P. fluorescens</i> Носитель гранулы алюмосиликата	Водоемы	Стяжкин и др., 2010
6	Биопрепарат	<i>Phyllobacterium</i> <i>myrsinacearum</i> Носитель вермикулит	Морская вода	Куликова, Дзержинская, 2010
7	Средство для деструкции	<i>B. firmus</i>	Водная среда 24,0% NaCl	Сопрунова и др., 2010
8	Биопрепарат	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. Носитель рыбная мука	Водоемы	Ботвинко и др., 2011
9	Биопрепарат	<i>Burkholderia caryophyllii</i> <i>P. fluorescens</i> Носитель стеклообразные метафосфаты	Вода	Хлыновский и др., 2012
10	Биопрепарат	<i>R. equi</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer.	Водная среда	Шарапова и др., 2012
11	Биопрепарат	<i>B. subtilis</i> , <i>P. putida</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Rhodococcus</i> sp. <i>Mycobacterium flavescens</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i> Носитель цеолит	Почва, вода до -5°C	Батарагин и др., 2014
12	Биоонит	<i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. putida</i> (2 штамма) <i>R. erythropolis</i> Носитель глауконит	Почва, морские, пресные и минерализованные воды	Волков и др., 2015
13	Микробный препарат	<i>Halomonas boliviensis</i> <i>Psychrobacter fozii</i> <i>Leucobacter aridicollis</i>	Водоемы +4... +20°C NaCl до 30 г/л	Шестаков и др., 2017а

### ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД ОТ УГЛЕВОДОРОДОВ

Серьезным источником загрязнения гидросферы является попадание в нее нефтесодержащих сточных вод (СВ), представляющих собой сложную многокомпонентную и многофазную систему, органическая часть которой (50-98%) представлена нефтяными углеводородами различных классов и их производными. Кроме того, в них обнаруживаются другие органические соединения, ПАВ и соли тяжелых металлов (Попова и др., 2017). Состав и концентрация загрязнителя зависят от вида, назначения и технологии производства, в процессе которого образуются СВ.

Нефтепродукты присутствуют в СВ в виде пленки на поверхности, грубо- и тонкодисперсном, эмульгированном и растворенном состоянии, а также могут сорбироваться на твердых взвешенных частицах (Анапольский и др., 2011). Основная особенность нефтезагрязнений в СВ – меньшая плотность по сравнению с водой и низкая растворимость в воде.

Попадание углеводородов в окружающую среду со сточными водами очень сложно предотвратить. Это связано с тем, что они находятся в стоках практически всех промышленных предприятий, транспорта и сферы услуг, поверхностном стоке с территорий этих предприятий, в отработанных технологических растворах различного назначения (смазочно-охлаждающих жидкостях, моечных и обезжиривающих растворах и т.п.), а также с большим разнообразием соединений, содержащихся в нефти и продуктах ее переработки (Попова и др., 2017). Решить основные задачи по минимизации ущерба от присутствия нефтепродуктов в водоемах можно уменьшая водопотребление, вводя системы замкнутого водооборота и производя очистку СВ до необходимых показателей.

В РФ приняты очень жесткие нормы ПДК нефтепродуктов, которые составляют для рыбо-хозяйственных водоемов 0,05 мг/л (СанПиН ..., 2000), для вод хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения – 0,1-0,3 мг/л (ГН ..., 2003). Вероятно, эти меры привели к тому, что согласно данным

Государственного доклада «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2016 году» в нашей стране наблюдается снижение количества нефтепродуктов, сброшенных вместе со сточными водами (т): 2000 г. – 5640; 2005 г. – 3650; 2010 г. – 2638,7; 2014 г. – 2044,4; 2016 г. – 1918,8 (Государственный доклад..., 2017).

Для очистки нефтесодержащих СВ применяют механические, химические, физико-химические и биологические методы. Из-за сложности состава стоков и высоких требований к качеству очищенной воды чаще всего используется их комбинирование, позволяющее достигнуть требуемой степени очистки с минимальными затратами (Привалова и др., 2015; Серебренникова и др., 2015; Кузнецова, Овсянкина, 2017; Jebrail, 2016).

**Механическая обработка** является предварительным этапом, в ходе которого различные устройства (песколовки, решетки, нефтеловушки) удаляют основную массу свободной нефти, а также грубодисперсные (капельные) нефтепродукты. В дальнейшем СВ подвергаются отстаиванию, центрифугированию или фильтрованию и частично очищенная вода может быть возвращена в систему оборотного водоснабжения.

**Химические методы** позволяют осаждать нефтепродукты в виде нерастворимых и не утилизируемых в дальнейшем осадков, для чего в воду вносят различные реагенты – коагулянты и флокулянты, которые достаточно дороги и могут служить источником вторичного загрязнения воды.

Озонирование используют для извлечения из воды эмульгированных и растворенных нефтепродуктов. В ходе реакции происходит окисление углеводородов, а также одновременное обеззараживание, обесцвечивание воды и её насыщение кислородом. Озонирование не приводит к изменению солевого состава очищаемых СВ, не загрязняет воду продуктами реакции, а сам процесс может быть полностью автоматизирован (Драгинский и др., 2007).

**Физико-химические методы** применяются для удаления эмульгированных и мелкодисперсных нефтепродуктов, в основном с помощью флотации или адсорбции. При флотации загрязнители извлекаются пузырьками воздуха или

смесью газов, всплывающими на поверхность. Адсорбция основана на поглощении дисперсных частиц загрязнителя поверхностью адсорбционного материала. Особенности сорбентов и их применение для удаления нефтепродуктов из СВ аналогично таковому при очистке природных водных объектов и было описано в разделе 2.3.

**Биологические методы** позволяют удалять из сточных вод растворенные или коллоидные нефтепродукты и основаны на использовании водных растений (Кручинин и др., 2012; Заводская, Копнина, 2013; Рыбка, 2015; Денисова, 2016; Раимбеков, 2017; Gagnon et al., 2012; Ertekin et al., 2015; Allam et al., 2016; Ateia et al., 2016) и микроорганизмов. Исходя из целей исследования, далее более подробно будут рассмотрены способы очистки СВ от нефти и нефтепродуктов с помощью УОМ, для которых эти соединения являются источником углерода и энергии. При этом часть поллютантов превращается в воду, диоксид углерода, нитрит- и сульфат-ионы, а часть идет на образование биомассы. По ходу очистки формируется биоценоз микроорганизмов (активный ил или биопленка), состав которого зависит от характера загрязнений в СВ, исходного посевного материала и условий проведения процесса.

Преимуществами биологической очистки являются возможность удалять из сточных вод разнообразные органические и некоторые неорганические соединения, находящиеся в воде в растворенном, коллоидном и нерастворенном состоянии, простота аппаратного оформления и относительно невысокие эксплуатационные затраты. К недостаткам метода относятся высокие капитальные затраты на строительство очистных сооружений большой площади; необходимость строгого соблюдения технологического режима, постоянного контроля за концентрацией загрязнителей в поступающей воде; токсичное действие на микроорганизмы ряда веществ, приводящее к их гибели и снижению эффективности процесса. Биологическая очистка нефтезагрязненных СВ производится в биологических прудах, биофильтрах и аэротенках.

*Биологические пруды* – это искусственные водоемы с проточной водой, куда кислород поступает за счет диффундирования его через поверхность воды или за счет механической аэрации. Как самостоятельное средство для очистки нефтесодержащих СВ не используются, применяются для доочистки.

*Биофильтры* представляют собой сооружения, загруженные фильтрующим материалом (шлак, щебень, керамзит, пластмасса и др.) высотой 1,5-2 м, на поверхности которого выращивается биопленка микроорганизмов толщиной 1-3 мм. СВ фильтруются через слой загрузки, содержащиеся в них загрязнители сорбируются и окисляются микроорганизмами. Омертвевшая и отработанная биопленка смывается протекающей сточной водой и выносится из системы. Необходимый для окисления кислород поступает в толщу загрузки путем естественной и искусственной вентиляции биофильтра.

*Аэротенки* – это железобетонные резервуары с постоянно протекающей внутри СВ (прошедшей предварительную очистку), удаление загрязнителей из которой происходит под воздействием активного ила. Он представляет собой зооглейные скопления микроорганизмов, простейших и более высокоорганизованных представителей фауны (коловратки, черви, личинки насекомых, а также водные грибы и дрожжи), которые пребывают во взвешенном в жидкости состоянии в виде отдельных хлопьев. Для их нормальной жизнедеятельности в аэротенки подают воздух и питательные вещества. Из-за развитой поверхности хлопьев активного ила ( $70-100 \text{ м}^2$  на 1 г сухого вещества) ему присуща высокая абсорбционная способность, позволяющая улавливать даже коллоидные вещества. В аэротенках нефтепродукты подвергаются испарению, хемоокислению, биотрансформации, биосорбции на активном иле и ферментативной деструкции. Повышенная температура и интенсивное перемешивание, а также непрерывная подача воздуха катализируют процесс биодegradации. Комплекс биологической очистки вместе с аэротенком включает в себя вторичный отстойник, где вода отстаивается от активного ила и осветляется. Из-за очень низкой скорости отмирания, которая во много раз



меньше скорости роста, в отстойнике, со временем, накапливается определенное количество избыточного активного ила, который или регенерируется и возвращается в аэротенк для последующего применения, или утилизируется каким-либо способом (Горелова, Титова, 2015; Путырская, Бельская, 2016; Тимакова, Ксенофонтов, 2016; Пospelов, 2017).

Современным и очень перспективным направлением биологической очистки СВ, в т.ч. и нефтесодержащих, является использование *биореакторов* – установок, которые позволяют концентрировать большое количество активной биомассы на носителе, способствуя уменьшению объема используемых конструкций и снижению их стоимости (Серебренникова, 2014; Серебренникова и др., 2015; Пукемо, 2017; Kang Z., 2014). Одной из разновидностей биореакторов является *мембранный биореактор* (МБР), который сочетает биологическую обработку природных и сточных вод (в т.ч. и нефтесодержащих) активным илом с механической мембранной фильтрацией на полимерных материалах (Андрианов, 2012; Баландина и др., 2015; Yoon, 2015; Iorhemen et al., 2016; Lay et al., 2017). Обработываемые СВ поступают в аэротенк, смешиваются с активным илом и начинают циркулировать через модуль, оборудованный ультрафильтрационными или микрофильтрационными мембранами. Фильтрация происходит через поверхность мембран снаружи вовнутрь из-за разности давлений между внутренней полостью мембран и пространством мембранного блока. В результате отделения твердых и коллоидных частиц на мембранах, концентрация ила в блоке мембранного биореактора и в аэротенке повышается, что способствует глубокой биологической очистке стоков и обеспечивает уменьшение объема аэротенка в 2-3 раза. Вследствие того, что поры мембран имеют меньший размер, чем размеры клеток микроорганизмов, в частности, бактерий, в МБР происходит частичное обеззараживание воды (Tsuru, 2012; Yoon, 2015). Очищенная вода отводится в систему оборотного водоснабжения или поступает на дальнейшее обеззараживание до нормативов сброса в рыбо-хозяйственные водоемы, а

активный ил остается в мембранном резервуаре и поддерживается во взвешенном состоянии с помощью системы аэрации, встроенной в мембранный модуль.

Постоянное омывание мембран разрушает плотные флоккулы бактерий, поэтому размер хлопьев ила в МБР в 5-10 раз меньше, чем в обычных аэротенках. Такая дисперсность приводит к увеличению площади контакта микроорганизмов с загрязнениями и кислородом и скорость биодеструкции в МБР оказывается большей по сравнению с классической системой с активным илом (Баландина и др., 2015). Отказ от гравитационного метода разделения иловой смеси позволяет повысить концентрацию активного ила в биореакторе до 10-20 г/л (в обычном аэротенке до 3 г/л) и эксплуатировать очистные сооружения в режиме низких нагрузок, что повышает устойчивость биоценоза ила к колебаниям состава СВ и пиковым нагрузкам, а также обеспечивает стабильное качество очистки. Кроме того, значительная концентрация активного ила многократно увеличивает окисляющую мощность системы в целом, что дает возможность очищать высококонцентрированные СВ и в целом сократить время их обработки. Кроме того, биореактор работает в условиях не просто высокой концентрации биомассы, а в условиях высокой концентрации биомассы значительного возраста. Если в традиционных очистных сооружениях возраст ила не более 15 суток, поскольку при «старении» ухудшаются седиментационные свойства хлопьев и наблюдается их вынос из вторичных отстойников, то в МБР возраст ила обычно составляет 25-30, иногда 60-70 суток (Трунов, 2010; Миклашевский, 2014; Yoon, 2015). Кроме того, постоянная циркуляция механически воздействует на оболочки бактерий, поэтому основная потребляемая ими энергия используется не для размножения (как в классических биотехнологиях), а для поддержания жизнедеятельности. Это способствует снижению прироста избыточной биомассы на 30-40% и уменьшает расходы на ее утилизацию (Tsuru, 2012).

Длительные полупроизводственные испытания по очистке нефтесодержащих СВ Новокуйбышевского и Сызранского нефтеперерабатывающих заводов в МБР подтвердили более высокое качество

обработанных вод по сравнению с традиционными биологическими методами. По большинству показателей (нефтепродукты, фенол, ПАВ, соединения азота) в очищенной воде были получены значения ниже ПДК рыбо-хозяйственных водоемов (Степанов и др., 2012, 2013; Степанов, 2014).

Не смотря на неоспоримые достоинства, повсеместное применение МБР для очистки СВ сдерживается такими факторами как высокие капитальные затраты, загрязнение мембран и связанные с этим расходы на их замену и очистку; высокая энергоемкость; более сложная система управления и контроля; проблемы в обеспечении достаточного уровня аэрации при высоких концентрациях активного ила, характерных для МБР (Баландина и др., 2015; Mutamim et al., 2013; Golbabaei Kootenaeei, Aminirad, 2014; Lay et al., 2017).

## **ГЛАВА 4. ОТХОДЫ НЕФТЕДОБЫВАЮЩЕЙ И НЕФТЕПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ ИХ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ**

На современном уровне развития нефтегазового комплекса невозможно исключить его отрицательное воздействие на окружающую среду. Значительный вклад в загрязнение экосистем вносят и нефтесодержащие отходы. Они образуются на всех этапах добычи, транспортировки и переработки нефти, при очистке сточных вод, содержащих нефтепродукты, чистке резервуаров и другого оборудования и т.д., что обусловлено как несовершенством техники и технологии, так и человеческим фактором. Потери нефти, содержащейся в отходах, по экспертным оценкам составляют примерно 3% от ее годовой добычи (Боковикова и др., 2011).

В нашей стране ежегодно образуется более 3 млн. т нефтеотходов. На территории Западной Сибири их скопилось около 3 млн. т, в Республике Татарстан – около 2,5 млн. т, в Республике Башкортостан – более 2 млн. т. На сегодняшний день на предприятиях АНК «Башнефть» складировано около 180 тыс. м<sup>3</sup> нефтешламов и каждый год образуется порядка 6,5 тыс. м<sup>3</sup> с тенденцией увеличения на 10% в год. Количество нефтесодержащих отходов постоянно растет: на 1 тыс. т сырой нефти приходится 1-5 т нефтешламов. Основной вклад в этот процесс вносят нефтедобывающие компании (более 1 млн. т нефтешламов и нефтезагрязненных грунтов), нефтеперерабатывающие заводы (0,7 млн. т), нефтебазы (0,3 млн. т), железные дороги, аэропорты, морские порты (0,5 млн. т) (Соколов, 2017). Согласно Федеральному классификационному каталогу отходов, нефтесодержащие отходы относятся к 3 (умеренно опасные отходы, содержание нефтепродуктов 15% или более) или 4 классу опасности (малоопасные вещества, содержание нефтепродуктов менее 15%) (ФККО, 2017).

#### 4.1. Виды нефтесодержащих отходов

Стандартизированной классификации всего комплекса нефтегазопромышленных отходов не существует. Как вариант предлагается деление по агрегатному состоянию: жидкие (пластовые воды, буровые сточные воды, углеводородсодержащие некондиции); твердые (донные осадки резервуаров, буровые шламы и буровые растворы, нефтешламы от разливов, нефтешламы при переработке нефти, нефтешламы трубопроводные); газообразные (попутный газ, сероводород, углекислый газ, углеводороды (в результате испарения нефти или утечек газа), оксиды серы (как продукты сгорания) (Егоров, Егорова, 2016).

Очень часто для обозначения твердых или пастообразных нефтесодержащих отходов используют общий термин «нефтешламы». Это сложные гетерофазные системы из органической, водной и минеральной части в виде песка, пыли, ила, соединений металлов, соотношение которых колеблется в очень широких пределах. Их состав может существенно различаться в зависимости от способа добычи сырья, компонентного состава и физико-химических свойств нефтей, схем переработки, температуры и др. Они содержат в среднем (масс.) 10-56% нефтепродуктов, 30-85% воды, 1,3-46% твердых примесей (Херрера-Альварадо, 2015; Юльtimiрова, 2018).

В зависимости от способа образования нефтешламы бывают придонные (формируются при оседании нефти и нефтепродуктов на дне водоемов), резервуарные (возникают при перевозке и хранении нефтепродуктов в различных емкостях в результате их взаимодействия с водой, кислородом, механическими примесями и материалом стенок резервуара) и грунтовые (Колобова, 2015).

Большие количества нефтезагрязненных (замазученных) грунтов образуются в результате проливов нефтепродуктов на земную поверхность в процессе производственных операций либо при аварийных ситуациях, очистке технологического оборудования, демонтаже резервуаров и пр. Усредненный состав замазученного грунта выглядит следующим образом: нефтепродукты (10,1-14,2%), нерастворимые компоненты (71,8-78,2%), механические примеси

(10,1-13,2%), вода (9,7-14,7%), соли металлов (Шпербер, 2016). Такие нефтезагрязненные грунты считаются отходами после складирования в специальных шламонакопителях. Количество нефтепродуктов и металлов в них не велико, поэтому они относятся к 4 классу опасности.

Различные нефтешламы, образующиеся в процессе добычи и переработки углеводородного сырья, являются наиболее крупнотоннажными промышленными отходами, которые занимают площади в десятки квадратных километров, выводя из оборота значительные земельные ресурсы (Боковикова и др., 2011; Атаманова, Мухаметшина, 2015; Соколов, 2017). Они собираются, как правило, открытых земляных резервуарах – нефтешламowych амбарах различной конструкции, без какой-либо сортировки и классификации. В таких хранилищах происходят естественные явления – накопление атмосферных осадков, развитие микроорганизмов, протекание окислительных и других реакций, т.е. идет самовосстановление, однако, в связи с наличием большого количества солей и нефтепродуктов при общем недостатке кислорода этот процесс затягивается на десятилетия. Состав нефтяного шлама, депонированного в накопителе в течение нескольких лет, отличается от состава свежего. Со временем он «старееет», что приводит к его упрочнению и уплотнению. Легкие фракции испаряются, нефть и нефтепродукты окисляется, смолы переходят в другое качество. Кроме того, происходит попадание твердых механических примесей. В результате образуются многокомпонентные дисперсные системы, которые отличаются значительной устойчивостью к разрушению, что делает задачу их утилизация очень сложной (Журавлева, 2017; Юльтимирова, 2018).

Помимо замазученных грунтов, еще одним значительным по объему нефтесодержащим отходом является загрязненная углеводородами отбеливающая глина, которая используется в нефтеперерабатывающей промышленности в качестве природного адсорбента для регенерации отработанных минеральных масел или в процессе их контактной доочистки. По

данным (Логинов и др., 2009), только в результате деятельности ПАО «Орскнефтеоргсинтез» накоплено около 100 тыс. т этого отхода.

К настоящему моменту значительное число шламонакопителей, построенных с начала 50-х годов, превратились из средства предотвращения загрязнения в постоянно действующий источник опасности (Ефремов и др., 2011; Ефремов, Фоменко, 2014; Соколов, 2017). Длительное хранение нефтешламов в амбарах, не отвечающих современным экологическим требованиям, приводит не только к изъятию земель, но и к выбросам загрязняющих веществ в атмосферу в результате испарения легких фракций; фильтрации поллютантов в подземные водоносные горизонты через борта и основание накопителей; нарушению обвалования хранилищ отходов и попаданию нефтеотходов на рельеф местности (Мазлова, Меньшикова, 2010; Миниغازимов, Миниغازимов, 2014; Маркарова и др., 2016а, 2016б; Мустафин и др., 2017; Троц и др., 2017; Филатов, Овсянникова, 2017). К тому же продукты частичного распада содержащихся в накопителях нефти и нефтепродуктов намного более токсичны и канцерогенны, чем сама нефть (Иванов, 2010). В связи с этим задача создания высокоэффективных и экологически чистых технологий обезвреживания нефтешламов и ликвидации нефтешламовых амбаров приобретает все большее значение.

#### **4.2. Методы переработки нефтешламов**

В настоящее время отсутствует какой-либо один универсальный, экологически чистый, экономически оправданный и ресурсосберегающий способ переработки нефтесодержащих отходов. В каждом конкретном случае это зависит от состава источника образования, времени складирования, количества механических примесей и пр. (Суфиянов, 2010).

В Российской Федерации нашли применение следующие методы переработки нефтяных отходов (Багдасарова, 2012; Бахонина, 2015; Хуснутдинов и др., 2015; Литвинова, 2016):

- термические, т.е. сжигание в печах разных конструкций, в т.ч. пиролиз. Недостатками является высокая стоимость, загрязнение воздуха продуктами горения, такими как оксиды углерода, азота, серы, ПАУ и другими токсичными веществами, а также образование шлаков, которые тоже необходимо обезвреживать, т.к. они содержат большое количество канцерогенов;
- химические методы обезвреживания жидких и твердых углеводородсодержащих отходов (осаждение, капсулирование, использование сорбентов, магнитных собирателей и пр.) заключаются в добавлении к нейтрализуемой массе различных реагентов;
- физические, такие как отстаивание, прессование, центрифугирование, фильтрование, экстрагирование. Применяются, как правило, при очистке жидких отходов, характеризуются самой низкой степенью очистки;
- физико-химические – разделение нефтяных шламов с помощью специально подобранных ПАВ, фильтрующих систем, реагентов для разрушения эмульсий, растворителей на отдельные фазы с дальнейшим использованием нефтяного шлама в качестве сырья для других отраслей экономики. К таким методам относится коагуляция и флокуляция, экстракция, сорбция, ионный обмен, флотация и др.

Все вышеперечисленные методы недостаточно технологичны, экологически небезопасны, энергоемки и требуют значительных капитальных вложений. В результате их применения часто образуются побочные продукты, которые в свою очередь нуждаются в утилизации. Поэтому объемы переработки отходов отстают от объемов образования и к уже накопленным количествам добавляются новые.

Подобных недостатков лишены биологические методы, основанные на способности микроорганизмов перерабатывать углеводороды и другие компоненты нефти посредством биохимических реакций, в ходе которых происходит расщепление, минерализация и частичная гумификация компонентов загрязненной почвенной системы. Это достигается либо внесением нефтесодержащих отходов в определенном количестве в пахотный слой земли



(смещение), что является экологически небезопасным и малоэффективным (Хуснутдинов и др., 2015; Соколов, 2017), либо использованием особых штаммов бактерий и биогенных добавок. К достоинствам второго метода следует отнести невысокие материальные затраты и экологическую чистоту. Однако область его применения имеет свои ограничения, связанные с диапазоном активности биопрепаратов, температурой, кислотностью, концентрацией нефтезагрязнения, аэробными условиями (Соловьянов, 2012).

Почва являются уникальной системой и важнейшим компонентом природной среды, формирование которой происходит на протяжении десятков и сотен тысяч лет. После биологического обезвреживания замазученных грунтов и нефтешламов образуется большое количество почвогрунта. В идеале, он должен характеризоваться хорошими потребительскими свойствами, т.е. обладать высоким содержанием гумуса и низким содержанием нефтепродуктов (Сухоносова и др., 2009; Бормотов, Тюрденева, 2014). Поэтому, несмотря на преимущества ряда механических, физических и химических методов очистки от нефти и нефтепродуктов и на недостатки биологических, главным аргументом в пользу применения последних является то, что и их помощью можно восстановить плодородие земли и вернуть ее в сельскохозяйственный оборот. В связи с этим, наиболее перспективным способом переработки нефтесодержащих отходов является использование комплекса мер, с обязательным включением этапа биологического (биотехнологического) обезвреживания.

#### **4.3. Микробиологические методы обезвреживания нефтесодержащих отходов**

Технологии биологического обезвреживания нефтесодержащих отходов, накопленных на свалках и полигонах, основаны либо на активации аборигенной микрофлоры с помощью механической обработки (рыхление, вспашка, дискование) и внесения биогенных добавок, либо на интродукции в грунт определенных культур микроорганизмов. Для второго способа разработано большое количество биопрепаратов на основе микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые могут включать различные питательные вещества и

носители. Здесь также предусмотрены дополнительные приемы для ускорения процесса обезвреживания, аналогичные применяемым в первом случае. В качестве примеров биопрепаратов для обезвреживания нефтешламов, кроме уже упоминавшихся ранее «Путидойл», «Деворойл», «Родер» (см. пп. 1.2.2.2 и 2.4) можно привести «Родотрин» (*Rhodococcus erythropolis*) (Ильина, 2002; Ягафарова и др., 2008), «БИОРОС» (*Rhodococcus* sp., *Candida* sp.) (Самсонов и др., 2010; Пыстина и др., 2013), «БИОЛ» (представители рр. *Bacillus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Chryseobacterium*) (Мазлова, Херрера, 2014; Херрера, Васильева, 2014), «Рустэко» (*B. subtilis*, *Pseudomonas* sp.) (Черных, Садчиков, 2016), «Микрозим™ Петро Трит» (представители рр. *Bacillus*, *Atherobacter*, *Nocordia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*) (<http://www.microzym.ru/oilspills.htm>), «БАК-Верад» (представители рр. *Bacillus*, *Atherobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*) (Черных, Садчиков, 2016), «DOP-UNI» (представители рр. *Rhodococcus*, *Candida*, *Pseudomonas*) ([http://dop-uni.ru/destructor\\_of\\_oil\\_polution](http://dop-uni.ru/destructor_of_oil_polution)).

Однако ученые продолжают разработку способов микробиологического обезвреживания нефтесодержащих отходов. Из проб, отобранных на нефтешламохранилище в Волгоградской области, выделено 8 штаммов, способных к деградации углеводов. Наиболее активные бактерии-нефтедеструкторы идентифицированы как представители р. *Rhodococcus*, которые могут быть использованы для утилизации нефтяного шлама (Редкозубов, 2010, 2011).

Мильман и Гильвановой (Мильман, Гильванова, 2014) проведены модельные испытания биопрепарата, включающего смесь спор бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB-739, не обладающих окислительной активностью, но продуцирующих циклодекстрины, субстрата для их биосинтеза (крахмала), а также консорциума углеводородоокисляющих микроорганизмов. Внесение в нефтешлам этого комплексного биопрепарата ускоряет процесс биodeградации за счет образования циклодекстринов, способных к изменению фазового состояния углеводов нефти с гидрофобного на гидрофильное.

Разработана поэтапная схема обезвреживания нефтешлама, включающая следующие стадии: диспергирование нефтешлама в полисахаридных коллоидных растворах (альгинате кальция) или с помощью биоПАВ. Для этих целей использовали биотехнологически полученные ПАВ *P. aeruginosa* RM или *Acinetobacter* sp. 15; добавления раствора биогенных элементов, необходимых для развития УОМ-ассоциаций; биодеструкция нефтешлама в контейнерах в аэробных, а потом и в микроаэрофильных условиях; внесение биотехнологически модифицированного нефтешлама в почву в количестве 1-5% и засев ее растениями-фитомелиорантами (Ботвиненко и др., 2013).

На полигоне-накопителе ТОО “Химпромсервис-Актобе” на территории месторождения Жанажол (Республика Казахстан) были проведены полевые эксперименты по обезвреживанию нефтешлама, (замазученного грунта) с использованием циано-бактериальных ассоциаций на основе *Phormidium* sp. K-1 и углеводородокисляющих бактерий *P. stutzeri* A1, *Pseudomonas* sp. N2 и *P. alcaligenes* A5. Через 6 месяцев после интродукции биопрепарата в грунте существенно уменьшилась концентрация углеводородов с длиной цепи C<sub>14</sub>-C<sub>27</sub>, а также C<sub>32</sub>-C<sub>34</sub> (в среднем на 80% по сравнению с контролем), а углеводороды с длиной цепи C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub> и C<sub>28</sub>-C<sub>31</sub> полностью исчезли. Также с помощью тест-организмов установлено значительное снижение токсичности рекультивированного грунта (Жубанова и др., 2013).

Выделены и исследованы микроорганизмы нефтешламов, способные к эффективной азотфиксации и разложению углеводородов. На основании полученных результатов была разработана биотехнология обезвреживания и переработки промышленных нефтесодержащих отходов путем активации содержащихся в них аборигенных азотфиксирующих микроорганизмов. Предложен штамм бактерий *P. stutzeri* ВКПМ В-11230 – деструктор алифатических и ароматических углеводородов, стимулирующий рост растений, который можно применять для очистки и фиторемедиации нефтезагрязненных почв и нефтехимических шламов, в т.ч. в условиях высокого содержания

загрязнителя и в присутствии тяжелых металлов (Григорьева, 2009, Григорьева и др., 2012, 2014; Naumova et al., 2009).

Низкая водорастворимость нефтяного шлама и других углеводородных соединений является серьезной проблемой при их биоремедиации. В работах (Bezza et al., 2015; Bezza, 2016) из почвы, хронически загрязненной креозотом и другими углеводородами (Западная Претория, Южная Африка), выделен штамм CN3, идентифицированный как *Ochrobactrum intermedium*. Способность изолята разрушать нефтяной шлам и влияние синтезируемого им биосурфактанта на этот процесс тестировали в экспериментах с жидкой культурой с 4% (об./об.) нефтешлама. Установлено, что сам микроорганизм разлагает до 40% длинноцепочечных алифатических и полициклической ароматических углеводородов, а в присутствии биосурфактанта он способен к деградации на 70% наиболее гидрофобных компонентов нефтяного шлама за 3 недели.

Подводя итоги, можно сказать, что в современных условиях все более ужесточающихся требований природоохранного законодательства и правил лицензирования и землеотвода, задача эффективного обезвреживания нефтеотходов и ликвидации амбаров-накопителей по-прежнему остается актуальной. С одной стороны, это связано с высокой устойчивостью нефтешламов к разрушению, особенностями их состава и свойств, которые постоянно меняются под воздействием погодных условий и процессов, протекающих в них. С другой стороны, предприятия нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности при обращении с нефтеотходами должны всячески содействовать минимизации их количества, стараться делить их на группы уже на стадии образования для обеспечения возможности применения наиболее рациональных способов утилизации или обезвреживания каждой группы, разрабатывать собственные экономически доступные и технически осуществимые технологии для вовлечения отходов в ресурсооборот (Кудеева, 2015).

## ГЛАВА 5. МИКРООРГАНИЗМЫ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ УГЛЕВОДОРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

### 5.1. Разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов

Основными агентами биodeградации различных загрязняющих веществ в экосистемах являются микроорганизмы, при этом ключевую роль в процессе деструкции природными микробными сообществами таких распространенных поллютантов, как нефть и нефтепродукты, играют углеводородокисляющие микроорганизмы. Поэтому вполне понятен интерес многих ученых к изучению свойств именно этой группы объектов живой природы.

Установлено, что УОМ широко распространены в природе. Они обнаруживаются в разнообразных водных и почвенных экосистемах, особенно загрязнённых углеводородами или нефтью, а также в самой нефти и пластовых водах месторождений (Иванова и др., 2012; Михайлова, 2012; Назина и др., 2013, 2015; Карасева и др., 2017; Nazina et al., 2013). Известны бактерии, цианобактерии, грибы и водоросли, способные использовать нефть и ее производные в качестве единственного источника углерода и энергии. Изучены углеводородокисляющие дрожжи рр. *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporom*, *Saccharomyces*, мицелиальные грибы рр. *Aspergillus*, *Penicillum*, *Fusarium* и пр. (Рябцева и др., 2015, 2016; Farag, Soliman, 2011; Jarboui et al., 2012; Olukunle et al., 2012; Shumin et al., 2012; Mostafa et al., 2015; Olukunle, Oyegoke, 2016; Zhang et al., 2016; Nrior, Onwuka, 2017; Al-Hawash et al., 2018a, 2018b). Углеводородокисляющие бактерии обнаружены среди следующих родов:

– *Rhodococcus* (Делеган и др., 2016а, 2016б; Льюнг и др., 2016; Филонов, 2016; Беловежец и др., 2017; Борзова и др., 2017; Петриков и др., 2017; Третьякова и др., 2017; Филонов и др., 2017; Kuyukina et al., 2009; Astashkina et al., 2015);

– *Pseudomonas* (Жубанова и др., 2013; Панов и др., 2013; Филонов, 2016; Филонов и др., 2017; Беловежец и др., 2017; Astashkina et al., 2015; Gayathiri et al., 2017; Al-Dhabaan et al., 2018);

- *Vacillus* (Гоголева, 2012; Жубанова и др., 2013; Мусаева и др., 2014; Плешакова и др., 2017; Alegbeleye et al., 2017; Gayathiri et al., 2017; Ogugbue et al., 2017; Al-Dhabaan et al., 2018; Kashi et al., 2018);
- *Arthrobacter* (Сребняк, 2008; Жубанова и др., 2013; Панов и др., 2013; Мусаева и др., 2014; Карасева и др., 2017);
- *Acinetobacter* (Овчинникова, 2011; Гоголева, 2012; Филонов, 2016; Беловежец и др., 2017; Mazumdar et al., 2013; Wu, M. et al., 2016; Ogugbue et al., 2017);
- *Azotobacter* (Сулима и др., 2010; Галкина и др., 2017; Ogugbue et al., 2017);
- *Achromobacter* (Mazumdar et al., 2013, 2015; Ogugbue et al., 2017);
- *Ochrobactrum* (Chai et al., 2015; Bezza et al., 2015; Bezza, 2016; Tirado-Torres et al., 2017);
- *Corynebacterium* (Сребняк, 2008; Gayathiri et al., 2017; Ogugbue et al., 2017);
- *Flavobacterium* (Xu, 2012; Gayathiri et al., 2017);
- *Alcanivorax* (Prince et al., 2010; Santisi et al., 2015; Ogugbue et al., 2017);
- *Alcaligenes* (Гоголева, 2012; Жубанова и др., 2013; Gayathiri et al., 2017);
- *Burkholderia* (Овчинникова, 2011; Balogun et al., 2015; Almatawah, 2017; Ogugbue et al., 2017);
- *Gordonia* (Делеган и др., 2016а, 2016б; Борзова и др., 2017; Карасева и др., 2017; . Nicdao, Rivera, 2012; Qi et al., 2017);
- *Serratia* (Мусаева и др., 2014; Филонов, 2016; Alegbeleye et al., 2017; Gayathiri et al., 2017; Ogugbue et al., 2017);
- *Nocardia* (Сребняк, 2008; Федоренко и др., 2016; Шестаков и др., 2017б);
- *Cycloclasticus* (Teramoto et al., 2010; Brakstad et al., 2015; Mapelli et al., 2017);
- *Micrococcus* (Филонов, 2016; Карасева и др., 2017);
- *Streptomyces* (Карасева и др., 2017; Коваленко и др., 2018) и др.

В данном обзоре основное внимание будет уделено представителям рр. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum* и их роли в процессах очистки окружающей среды от загрязняющих веществ.

## **5.2. Применение бактерий рода *Acinetobacter* для деструкции нефти и нефтепродуктов в почве и воде**

Согласно современной таксономии эубактерий, р. *Acinetobacter* принадлежит к семейству *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gammaproteobacteria* (тип *Proteobacteria*). Представители этого рода свободноживущие, строго аэробные грамотрицательные, неферментирующие, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, неподвижные, неспорообразующие гетеротрофные бактерии, форма которых в зависимости от фазы и условий роста может быть кокковидной либо коккобациллярной, некоторые могут образовывать слизь (Чеботарь и др., 2014; *Acinetobacter*, 2008; Chan et al., 2012).

Ацинетобактерии характеризуются метаболической универсальностью, что обеспечивает их экологическую пластичность и повсеместную распространенность. В качестве источника питания они используют очень широкий круг разнообразных веществ от простых углеводов (глюкоза и др.) и нефти до тканей организма человека. *Acinetobacter* spp. играют важную роль в биологическом разложении большого количества веществ, загрязняющих окружающую среду, в т.ч. и нефтепродуктов.

Так, в лабораторных экспериментах показано, что степень деструкции *n*-алканов нефти после их окисления штаммами *A. junii* E1 133, *A. calcoaceticus* E1 134 и E1 135 составила 71-99% (Емельянова, 2009).

Штаммы, выделенные из загрязненной нефтью почвы (Дэжон, Южная Корея) и идентифицированные как *A. haemolyticus* MJ01 и *A. johnsonii* MJ4, могут деградировать более 90% дизельного топлива с начальной концентрацией 20000 мг/л после инкубации в течение 7 суток. По мнению авторов, это свидетельствует

о возможности применения указанных бактерий для биоремедиации объектов, загрязненных этим нефтепродуктом (Lee et al., 2012).

Некоторые штаммы р. *Acinetobacter*, деградирующие высокие концентрации нефти и нефтепродуктов в присутствии 3% NaCl и pH 4-10, можно использовать для очистки от углеводородного загрязнения засоленных почв, например, на территории нефтеразлива, где кроме загрязнителя присутствуют минерализованные пластовые воды (Ветрова и др., 2013а).

Госал с соавт. (Ghosal et al., 2013) впервые сообщили о полной деградации аценафтенон и аценафтилен микроорганизмом, принадлежащим к р. *Acinetobacter*. Они выяснили механизм этого процесса у штамма AGAT-W, изолированного ими из почвы, загрязненной муниципальными отходами.

Показано, что степень разложения сырой нефти штаммами *A. calcoaceticus* 134, *A. calcoaceticus* ACKS и *Acinetobacter* sp. в течение 40 суток в лабораторном опыте составляет 40-73%, а в вегетационных условиях – 40-60%. Предполагается использование указанных микроорганизмов для рекультивации нефтезагрязненных почв (Подольский и др., 2014).

Из морских донных отложений была выделена бактерия *Acinetobacter* sp. NC8-3S, деградирующая фракцию насыщенных углеводородов сырой нефти на 94% за 5 суток. Штамм был признан полезным для очистки загрязненной нефтью окружающей среды, поэтому параметры его ферментации были оптимизированы для промышленного культивирования (Lin et al., 2014; Liu et al., 2016).

Предложено применять микроорганизмы *A. beijerinckii* 302-PWB-ON1 и ZRS, изолированные из загрязненной нефтью почвы (Синьцзянь-Уйгурский автономный округ, Китай), для очистки морской воды от дизельного топлива. Оба штамма хорошо зарекомендовали себя в лабораторных экспериментах, разлагая этот нефтепродукт на 65-73,9% в зависимости от условий опыта (Huang L. et al., 2013; Lei et al., 2013).

Рекомендован штамм *Acinetobacter* sp. N3 для деградации нефтяных углеводородов в морской воде. При температуре 30°C, pH 8,0, концентрации



загрязнителя 2 г/л и в условиях крайне высокой солености модельной среды (35%) штамм разлагал 16,2% сырой нефти (Fatajeva et al., 2014).

Многие представители р. *Acinetobacter* продуцируют ПАВ, которые эмульгируют нефть и углеводороды, делая их доступными для разложения в жидкой среде. Показана эффективность применения невысоких концентраций ПАВ (5-15% в воде или 100-300 мг/кг почвы), образуемых бактерией *A. calcoaceticus* IMB B-7241, для очистки от нефти воды (содержание загрязнителя 2,6-6,0 г/л) и почвы (содержание загрязнителя 21,4 г/кг). Степень деструкции поллютанта в воде составила 87,7-92,3%, в почве – 80,8-82,2% (Пирог и др., 2015).

Бао с соавт. (Bao et al., 2014) изучена бактерия *Acinetobacter* sp. D3-2, выделенная из почвы, загрязненной нефтью. Штамм утилизирует различные углеводородные субстраты и продуцирует биосурфактант липопептидной природы. Установлено, что *Acinetobacter* sp. D3-2 при 30°C в присутствии 3% NaCl способен деградировать 82% углеводов сырой нефти.

В результате биодегградации сырой нефти штаммом *A. baylyi* ZJ2, продуцирующим биосурфактант липопептидной природы, произошло уменьшение количества тяжелых компонентов и увеличилось содержание легких фракций углеводородов в почве. По мнению авторов, штамм имеет значительные перспективы применения в экологической биотехнологии (Zou et al., 2014).

Из речной воды, загрязненной сливами нефтеперерабатывающего завода, был выделен микроорганизм *A. haemolyticus* Zn01, продуцирующий ПАВ, которое обладает 60%-ным значением индекса эмульгирования дизельного топлива. С помощью штамма Zn01 степень деградации данного вещества за 14 суток достигала 92%. Бактерия содержит гены катаболизма углеводов, кодирующие ключевые ферменты этих процессов, такие как *alkB* и C23O и может быть использована для очистки воды от дизельного топлива (Onur et al., 2015; Isgen, Yilmaz, 2016).

Изолят B6, отнесенный к виду *A. junii*, был выделен из почвы, загрязненной иранской легкой сырой нефтью. Штамм образует биосурфактант и деградирует большинство компонентов алкановой фракции нефти при использовании их

качестве единственного источника углерода. Микроорганизм и образуемый им могут использоваться в биоремедиации и для повышения добычи нефти (Ohadi et al., 2017).

Изучена углеводородокисляющая активность и способность к продукции биоПАВ у трех представителей р. *Acinetobacter*. Обоснована возможность использования консорциума из этих штаммов в качестве основы биопрепарата-нефтедеструктора, в котором бактерии *A. radioresistens* осуществляют ферментативное окисление нефтепродуктов (штамм В-5064 и В-2838), а *A. calcoaceticus* В-3780 продуцирует биосурфактант. Доказана эффективность консорциума для очистки почвы, загрязненной отработанным маслом (15-20 г/кг почвы). Деструкция поллютанта за 2 месяца составила 48,4%, общая численность микроорганизмов возросла на 2 порядка, а падение коэффициента гумификации замедлялось на 20% или полностью прекращалось, что свидетельствует о положительной направленности гумусообразования, способствующего повышению плодородия почвы (Логинова и др., 2011а, 2011б, 2011в; Данг, 2012). В дальнейшем, на основе указанного консорциума, был разработан биопрепарат из лиофильно высушенных бактерий для очистки от нефтяного загрязнения (Большаков и др., 2017).

Представители р. *Acinetobacter* входят в состав многочисленных нефтеокисляющих консорциумов. Так, предложена искусственная ассоциация бактерий-нефтедеструкторов *Acinetobacter* sp. В-1037, *Pseudomonas* sp. В-989, *Bacillus* sp. В-1040, выделенных из нефтезагрязненной почвы. За 21 сутки культивирования в жидкой среде с нефтью при 10°C степень биodeградации нефти составила 69-84%. Для ремедиации почв, загрязненных нефтепродуктами, используют водную суспензию лиофильно высушенной биомассы ассоциации штаммов. В модельном эксперименте ее внесение в почву ускоряло снижение токсичности после загрязнения отработанным автомобильным маслом и соляркой и способствовало восстановлению микробиоценоза и травяного покрова (Ильичева и др., 2014).

Было проведено исследование эффективности применения микроорганизмов *P. aeruginosa*, *B. subtilis* и *A. lwoffii*, выделенных из загрязненных нефтью воды и почвы, для разложения сырой египетской нефти по отдельности и в бактериальном консорциуме. При температуре 22°C после 28 суток инкубации индивидуальные бактериальные культуры показали меньший рост и деградацию загрязнителя (74,3-77,8%), чем состоящий из них консорциум, с помощью которого утилизировали 88,5% нефти (Al-Wasify, Hamed, 2014).

Разработана микробная ассоциация «ВиО» как основа биопрепарата для биоремедиации почвенных и водных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, состоящая из штаммов-деструкторов рр. *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, содержащих катаболические плазмиды. Консорциум способен к деградации углеводородов нефти при их концентрации до 30%, в температурном диапазоне 4-42°C и в присутствии до 5% соли (Филонов, 2016; Ветрова и др., 2018).

Бактерии р. *Acinetobacter* являются действующим веществом нескольких коммерческих биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения, таких как «Олеворин», «Дестройл», «Валентис», «Экойл», «Лессорб-био» (см. п. 1.2.2.2).

### **5.3. Дегградация углеводородсодержащих веществ бактериями рода *Ochrobactrum***

Согласно современной таксономии эубактерий, род *Ochrobactrum* принадлежит к семейству *Brucellaceae* порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria* (тип *Proteobacteria*). Представители рода строго аэробные грамотрицательные, неферментирующие, каталазо- и оксидазоположительные, неспорообразующие гетеротрофные бактерии, в форме коротких палочек. Могут иметь жгутики и образовывать слизь.

*Ochrobactrum* spp. играют важную роль в биологическом разложении большого количества веществ, загрязняющих окружающую среду, например,

нефти и нефтепродуктов (в т.ч. и ПАУ), пестицидов, углеводородсодержащих отходов и пр.

Так, например, бактериальный изолят MS30, выделенный из загрязненной углеводородами почвы и отнесенный к виду *O. lupini*, показывал высокий рост на твердой среде со смесью бензола, толуола, этилбензола, о-, м- и п-ксилола (концентрация смеси 250 мг/л). В лабораторных опытах показано, что штамм MS30 деградировал 94,6% от общего количества нефтяных углеводородов в водных средах и 43,6% – в почве (Eraky et al., 2015).

Госал с соавт. (Ghosal et al., 2010) впервые установили метаболический путь деградации фенантрена через 2-гидрокси-1-нафтойную кислоту, салициловую кислоту и катехол с помощью бактерии *Ochrobactrum* sp. PWTJD, изолированной ими из почвы, загрязненной муниципальными отходами.

Из пластовой воды нефтеместорождения (провинция Шаньси, Китай) выделен штамм *Ochrobactrum* sp. 2745-2, разлагающий сырую нефть. Это аэробные палочки с оптимальным ростом при 42°C и pH 5,5. У бактерий обнаружены гены, ответственные за эмульгирование и деструкцию сырой нефти (Chai et al., 2015).

Бактерия *Ochrobactrum* sp. C1 способна деградировать отработанные смазочные материалы: ее эффективность после 7 суток инкубации составляет 48,5% для моторного масла и 30,5% – для трансформаторного масла. Для достижения максимального результата был осуществлен подбор условий культивирования. Результаты показали, что при температуре 36,4°C, pH 7,3 и концентрации масла 4,6% (объем.) разложение отработанного моторного масла составляет 57% за 7 суток. Штамм был изолирован из нефтезагрязненной почвы с территории полигона промышленных отходов сталелитейного завода (Бернпур, Индия). Это первое исследование, показывающее, что представитель рода *Ochrobactrum* способен разрушать отходы смазочных материалов (Bhattacharya et al., 2015).

Ученые из Южной Африки установили, что штаммы р. *Ochrobactrum*, выделенные из жидкой среды, содержащей 1% шлама сырой нефти, способны к обезвреживанию этого шлама, разлагая около 50% углеводов, входящих в его состав, за 7 суток культивирования при 28°C (Obi et al., 2016).

Из 20 бактериальных культур, обнаруженных в контаминированной нефтью почве, были отобраны 3, демонстрирующие хороший рост на солевой среде с 4% сырой нефти и высокие значения индекса эмульгирования и поверхностного натяжения, а также степени деградации нефти. Штаммы идентифицировали как *O. cytisi* RAM03, *O. anthropi* RAM06 и RAM17. Микроорганизмы обладают значительным биотехнологическим потенциалом, поскольку после 30-дневной инкубации они разрушали более 93% от общего количества нефтяных углеводов в воде и 54% – в почве. Штаммы могут эффективно удалять как алифатические, так и ароматические углеводороды (Abou-Shanab et al., 2016).

Сточные воды нефтеперерабатывающих заводов содержат высокие концентрации углеводородных соединений. Штамм *O. anthropi* MP3 за 7 суток деградирует 53% этих веществ в сточной воде. Обнаружено, что экзополисахарид, синтезируемый данным микроорганизмом в количестве 0,42 г/л, представляет собой гликопротеин и обладает высокой эмульгирующей активностью в отношении дизельного топлива (60%) (Ramasamy et al., 2014).

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – разнообразная группа органических соединений, для которых характерно наличие в химической структуре двух и более конденсированных бензольных колец. В природе они входят в состав нефти, встречаются в пластах каменного, бурого угля и антрацита, образуются в процессе пиролиза целлюлозы, а также как продукт неполного сгорания при лесных пожарах. Основными источниками эмиссии техногенных ПАУ в окружающую природную среду являются предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленность. Многие из них являются сильными химическими канцерогенами. Такие соединения, как бенз(а)антрацен, бензпирен и овален, обладают ярко выраженными канцерогенными, мутагенными и тератогенными

свойствами. Будучи производными бензола, ПАУ являются термодинамически устойчивыми, низко водорастворимыми и сильно гидрофобными, поэтому при систематическом образовании они в значительных количествах накапливаются в природных объектах. Это делает ПАУ одними из приоритетных загрязнителей окружающей среды (Niritha et al., 2017; Varjani et al., 2018). Имеются сведения о способности бактерий р. *Ochrobactrum* к окислению таких опасных загрязнителей окружающей среды как ПАУ. Штамм *Ochrobactrum* sp. ВАР5, изолированный из морских донных отложений, разлагает бензоперен в концентрации 50 мг/л за 30 суток на 20% (Nikitha et al., 2017), а бактерия *O. intermedium*, выделенная из почвы с территории нефтеперерабатывающего завода (штат Уттар-Прадеш, Индия), способна к деградации полициклического ароматического углеводорода хризена (Ali et al., 2015). Изучены свойства микроорганизма *O. anthropi* 126, обнаруженного в загрязненной углеводородами почве (округ Асир, Саудовская Аравия). Биодеструкция антрацена этой бактерией составляет 50% при его начальной концентрации в среде 500 мг/л (Alrumman et al., 2016).

Тиррадо-Торес с соавт. (Tirado-Torres et al., 2017) из загрязненной нефтью почвы (штат Веракрус, Мексика) изолировали и идентифицировали 2 штамма – *O. intermedium* и *Ochrobactrum* sp. В лабораторном эксперименте за 80 суток инкубации при 30°C при содержании фракции ПАУ в количестве 24,15 мг/кг сухой почвы, *O. intermedium* разлагал 69,9% загрязнителя, а при содержании в 47,49 мг/кг – 80,7%. Штамм *Ochrobactrum* sp. был менее активен, разлагая 44,4 и 27,3% ПАУ соответственно. Оба микроорганизма деградировали и индивидуальные вещества, включая высокомолекулярные. Так, они разрушали практически полностью флуорантен. Деструкция бензо(b)флуорантена штаммом *O. intermedium* составила 81,8%, бензо(a)пирена – 87,0%, у *Ochrobactrum* sp. эти показатели были более низкими – 59,1 и 56,5% соответственно. По мнению авторов этой и других работ (Ferhat et al., 2011; Bezza et al., 2015, Bezza, 2016), высокая способность к деградации углеводородов и ПАУ, в частности, у представителей р. *Ochrobactrum* связана с тем, что они производят

биосурфактант, который уменьшает поверхностное натяжение и обладает высокой эмульгирующей активностью, тем самым ускоряя процесс разрушения углеводородов (см. п. 6.1).

Был исследован состав и деградирующий потенциал углеводородокисляющих бактерий, выделенных из морской воды около о. Кон Дао (Вьетнам) в Южно-Китайском море (Doan et al., 2017). Остров расположен на оживленном морском пути, по которому ежедневно перевозят 15 млн. баррелей нефти. Авторы установили, что среди 16 обнаруженных изолятов, наиболее активными оказались штаммы *P. putida* BD-2.5.6 и *O. anthropi* BD-2.5.3, которые могут разлагать более 40% сырой нефти и н-алканов, а также 25% ПАУ, присутствующих в воде.

Из ризосферы растений, произрастающих в мангровых зарослях, загрязненных нефтью, были выделены бактерии, идентифицированные как *Ralstonia pickettii*, *Bacillus* sp. *Bacillus circulans*, *O. anthropi*. Все изоляты могут использовать углеводородные соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Но, по сравнению с отдельными культурами, деградация нефти консорциумом из этих микроорганизмов происходит более эффективно. Так, при начальной концентрации в 5% она разлагается на 94,4%, при 10% – на 80,3%, при 15% – на 72% (Rinanti, Nainggolan, 2018).

На основе микроорганизмов р. *Ochrobactrum* разработан биопрепарат «Охромин» для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов и утилизации нефтесодержащих отходов, применяемый в широком диапазоне температур и pH. С его помощью степень деградации через 72 ч составляет: для парафина – 98%, дизельного топлива – 95%, нефти – 90%, нефтешлама – 50%. На полигоне нефтесодержащих отходов «Башнефть-Уфа» в результате проведения опытно-промышленных испытаний биопрепарата с использованием нефтешламовой установки фирмы «Альфа-Лаваль» выявлено, что степень разложения нефтешлама за один вегетационный период достигала 80-86% (Соколов, 2017).

#### 5.4. Очистка почвы и воды от нефти и нефтепродуктов с использованием бактерий рода *Pseudomonas*

Согласно современной таксономии эубактерий, род *Pseudomonas* принадлежит к семейству *Pseudomonadaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gammaproteobacteria* (тип *Proteobacteria*). Он обладает значительной гетерогенностью и сейчас включает более 218 видов (LPSN bactrio.net). Псевдомонады – это грамотрицательные, аэробные, неспорообразующие, неферментирующие, каталазо- и оксидазоположительные, подвижные бактерии (исключая *P. mallei*), имеющие форму прямых или изогнутых палочек и полярно расположенные жгутики. Многие могут образовывать флуоресцирующие пигменты. Представители этого рода распространены в природе повсеместно – в воздухе, почве, морских и пресных водоемах, сточных водах, нефти. Также их обнаруживают на пищевых продуктах, телах животных, растениях, а также в гнойных ранах и экскрементах больных млекопитающих (*Pseudomonas...*, 2008; Özen, Ussery, 2012). Они известны своей способностью использовать очень широкий спектр органических соединений. Такую метаболическую универсальность связывают с тем, что у очень многих представителей р. *Pseudomonas* наряду с хромосомной ДНК есть дополнительный генетический материал в виде плазмид биodeградации, которые играют важную роль в адаптации бактерий к изменяющимся условиям окружающей среды. Они содержат гены, ответственные за разложение различных органических веществ, в т.ч. n-алканов, моно- и полициклических ароматических углеводов, гетероциклических соединений. Интродукция микроорганизмов, имеющих плазмиды биodeградации ароматических углеводов, интенсифицирует процессы очищения от поллютантов путем передачи этих плазмид эндогенным микроорганизмам (Ветрова и др., 2008, 2009, 2013б; Овчинникова и др., 2009; Филонов и др., 2010б; Филонов, 2016; Al-Gelawi et al., 2013; Sharma, Pathak, 2014; Kahlon, 2016). Благодаря своим свойствам, бактерии р. *Pseudomonas* активно изучаются учеными всего мира с целью применения их в очистке окружающей



среды от различных экотоксикантов (Wasi et al., 2013; Fuentes et al., 2014; Pandey et al., 2016; Koshlaf, Ball, 2017).

В Республике Казахстан из многочисленных образцов активного ила и сточных вод АО «Карбид», производящего синтетический каучук (г. Темиртау), а также почв Тенгизского месторождения (Атырауская обл.) и воды Каспийского моря в районе нефтеналивных причалов порта (г. Актау), выделены бактерии р. *Pseudomonas*, которые отнесены к видам *P. aeruginosa* (штаммы ДС-26 и 8), *P. putida* D12, *P. mendocina* НЗ, *P. pseudoalcaligenes* (штаммы Н7 и Н16), *P. stutzeri* Н10, *P. alcaligenes* Н15, *P. mallei* 36К. Отобранные микроорганизмы способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии при их концентрации в среде 2-10 г/л. Наибольшей активностью обладали штаммы *P. mendocina* НЗ и *P. aeruginosa* 8, благодаря которым степень разложения нефти составляла 87,5 и 72,5%, дизельного топлива – 90 и 86%, толуола – 86 и 85% соответственно. В лабораторных экспериментах показана деструктивная активность микробного консорциума на основе клеток *P. mendocina* НЗ, *P. aeruginosa* 8 и *P. stutzeri* Н10 в отношении нефтезагрязненного балластного слоя железнодорожного полотна. Через 7 суток содержание углеводов в балластном слое уменьшилось на 32%, через 14 суток – на 47%, а через 30 суток – на 64%. Результаты получили подтверждение в ходе производственных испытаний консорциума по очистке балластного щебня железнодорожного полотна на участке Алматы – Чимкент (Джусупова, 2010).

Из морской воды вдоль побережья о. Гоа (Индия), контаминированной сырой нефтью, выделен штамм *P. aeruginosa*, использующий дизельное топливо в качестве единственного источника углерода и энергии и окисляющий н-алканы C<sub>12</sub>-C<sub>33</sub> с высокой скоростью в присутствии 3% NaCl (Pasumarthi et al., 2013).

Кумар с соавт. (Kumar et al., 2014) выделили из почвы, загрязненной нефтью, штамм *P. fluorescens*, который способен при температуре 37°C и pH 8,0 эффективно деградировать дизельное топливо.

Обнаружено, что в микробной популяции, обитающей в нефтепроводах Индийской нефтяной корпорации, наиболее распространен вид *P. stutzeri*, способный использовать ароматические углеводороды, такие как ксилол, толуол, фенол, а также ПАУ (нафталин). Исследователи установили ферменты, которые содействуют деградации аренов (бензоатадиоксигеназа, 1,2-диоксигеназа толуола и 1,2-диоксигеназа катехола) и алифатических углеводородов (метанолдегидрогеназа) (Joshi et al., 2014).

В образцах почвы, содержащих сырую нефть (штат Тамилнад, Индия), обнаружены бактерии *P. putida* DB1 и *B. cereus* DB2. В лабораторных экспериментах через 7 суток инкубации штамм DB1 деградировал 65% сырой нефти, а DB2 – 40%. В результате инокуляции нефтезагрязненной почвы микроорганизмами, снижалась ее фитотоксичность, увеличивалась всхожесть семян, длина проростков и корней зернобобовой культуры *Vigna mungo*. При этом применение бактерии *P. putida* DB1 оказалось более эффективно, чем использование *B. cereus* DB2 (Vinothini et al., 2015).

Три штамма микроорганизмов р. *Pseudomonas*, выделенных из почвы вокруг резервуаров для хранения сырой нефти в гавани Ченнаи (Индия), являются очень перспективными для очистки окружающей среды от нефтепродуктов. В лабораторных условиях в жидкой среде эффективность деградации бензина с помощью этих штаммов составила 85,6-87,8%, дизельного топлива – 94-97,8%, моторного масла – 67,8-71,4% (Vignesh et al., 2016).

В результате скрининга из воды озера Халы-Балы (Амгинский район, Республика Саха (Якутия)), загрязненного арктическим дизельным топливом, выделен не патогенный, не токсичный по отношению к высшим растениям штамм *P. panipatensis* C71 (ВКПМ В-10593). В лабораторном эксперименте за 2 месяца экспозиции с помощью этого микроорганизма удалось добиться высокой степени разложения в воде сырой неочищенной нефти – 98,3% (начальная концентрация загрязнителя 1%). В другом опыте по очистке водной солевой среды, содержащей нефть или нефтепродукты (1000 мг/100 мл среды), при различных температурах культивирования установлено, что уже на пятый день при температуре +8°C

штамм деградировал 79,6% нефти и 40,0% дизельного топлива; при +20°C эти показатели составили 94,5 и 48,5% соответственно; при +30°C – 96,4 и 67,7% соответственно. Проведен эксперимент по очистке мерзлотной почвы на месте аварийного разлива арктического дизельного топлива с помощью штамма *P. panipatensis*. За один вегетационный период (2 месяца) под влиянием интродукции бактерии происходила деструкция 91,7% нефтепродуктов. В дальнейшем был разработан биопрепарат для очистки почвы и воды от нефтезагрязнений, содержащий биомассу бактерий *P. panipatensis*, иммобилизованную на поверхности вспученного вермикулита (Ерофеевская, 2013, 2014а, 2015, 2016).

Штамм *P. aeruginosa* NCIM 5514, способный утилизировать сырую нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, был изолирован из загрязненной нефтью почвы (штат Гуджарат, Индия). Микроорганизм является аэробным, мезофильным, галотолерантным (растет при 5% NaCl) и продуцирует биосурфактант в количестве  $3,2 \pm 0,1$  г/л, который является смесью дирамнолипида и монорамнолипида. Степень деградации сырой нефти штаммом *P. aeruginosa* NCIM 5514 составляет 60,63% (Varjani, Urasani, 2016а, 2016b, 2017b; Varjani, 2017а).

Установлена способность бактерий *P. aeruginosa* к очистке от загрязнения углеводородами воды озера Альберта (Уганда) (Kiraye et al., 2016).

Многие представители р. *Pseudomonas* способны к деструкции и очистке окружающей среды от ПАУ (Farshid et al., 2011; Kafilzadeh et al., 2012; Amenu et al., 2014; Sharma, Pathak, 2014; Ghosal et al., 2016). Так, показано, что использование штаммов вида *P. putida* для очистки почвы, загрязненной ПАУ, является эффективным приемом биоремедиации. После двух месяцев полевого эксперимента концентрация нафталина уменьшилась на 63,6%, а пирена – на 96,6% (Pizarro-Tobías et al., 2015).

Два штамма *P. aeruginosa* RM1 и SK1, выделенные из нефтезагрязненной тропической почвы (г. Лагос, Нигерия), обладают значительной способностью к

деградации отработанного моторного масла в целом, и содержащихся в нем ПАУ в частности. С помощью газовой хроматографии установлено, что 66,6 и 89,1%, а также 63,4 и 90,8% начального содержания моторного масла были деградированы бактериями RM1 и SK1 в течение 12 и 21 дней. После 12 суток инкубации штаммов RM1 и SK1 обнаружено полное исчезновение углеводородных фракций C<sub>15</sub>, C<sub>23</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub> и C<sub>26</sub>, а также резкое снижение содержания фракций C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> и ПАУ, таких как C<sub>19</sub> – антрацен и C<sub>22</sub> – пирен. В конце 21 суток наблюдали полное исчезновение C<sub>17</sub> – пристана, C<sub>22</sub> – пирена, одного соединения из антраценовой фракции и значительное снижение содержания фракции C<sub>18</sub> – фитана (97,2% штамм RM1, 95,1% штамм SK1) (Salam, 2016).

Из подзолистой нефтезагрязненной почвы (Пуровский район, ЯНАО) выделен штамм *P. denitrificans* Fdl, который в лабораторных условиях утилизирует фенантрен за 14 суток на 83,2%, а в присутствии детергента твин-20 – за 1 сутки на 100%. Штамм запатентован и может быть использован для получения препарата для очистки почвы, грунтовых и поверхностных вод от фенантрена (Астанин и др., 2016).

Бактерии р. *Pseudomonas* в виде монокультуры или в ассоциациях входят в состав многих биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения (см. пп. 1.2.2.2, 2.4 и 4.3).

## **ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С ЗАДААННЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ**

### **6.1. Применение биосурфактантов и микроорганизмов, их продуцирующих, для очистки почвы и воды от углеводородного загрязнения**

Основной причиной, которая затрудняет микробиологическое разложение нефтепродуктов, является гидрофобность молекул углеводородов, приводящая как к их сорбции на различных поверхностях и переходу в биологически труднодоступную форму, так и к невозможности эффективного контакта с микробными клетками, имеющими, как правило, гидрофильную внешнюю оболочку. Устранить это препятствие способны биосурфактанты – разнообразные поверхностно-активные вещества, синтезируемые микроорганизмами. Механизм их действия связан с процессами десорбции органических загрязнителей и их переводом в водную фазу и, как следствие, повышением их биодоступности для микроорганизмов, а также с модификацией внешней поверхности бактерий путём гидрофобизации для обеспечения лучшего контакта с молекулами углеводородов (Mao et al., 2015; Pirog et al., 2015a; Santos et al., 2016).

По химическому строению биосурфактанты представляют собой амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной (аминокислотные или пептидные анионы или катионы; моно-, ди- или полисахариды) и гидрофобной части (ненасыщенные или насыщенные жирные кислоты). Микробные ПАВ делят на две основные группы. В первую входят низкомолекулярные вещества, называемые собственно биоПАВ или биосурфактантами, такие как гликолипиды (рамнолипиды, трегалозолипиды, софоролипиды) и липопептиды (сурфактин, лихенизин, полимиксин, грамицидин), снижающие поверхностное и межфазное натяжение. Ко второй относят высокомолекулярные соединения (полимеры), называемые эмульсанами или биоэмульгаторами и представленные полисахаридами, липополисахаридами, протеинами, липопротеинами и их комплексами, которые стабилизируют эмульсии типа «масло в воде» (Desai, Banat, 1997; Silva et al., 2014).

Способность к образованию биоПАВ выявлена у широкого круга микроорганизмов – это представители pp. *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Torulopsis*, *Ochrobactrum*, *Gordonia*, *Burkholderia* и др. (Ившина и др., 2012; Соколова, 2013; Делеган, 2016; Льюнг и др., 2016, 2017; Пирог и др., 2016а, 2016б; Петриков и др., 2017; Ángeles, Refugio, 2013; Joshi, Shekhawat, 2014; Matvyeyeva et al., 2014; Bezza et al., 2015; Pirog et al., 2015в, 2015с, 2017, 2018; Biosurfactants..., 2015а, 2015б; Freitas et al., 2016; Almatawah, 2017; Barakat et al., 2017; Bezza, Chirwa, 2017; Santos et al., 2017; Sharma, Oberoi, 2017).

В отличие от своих синтетических аналогов, биосурфактанты менее токсичны, обладают высокой биоразлагаемостью, поэтому быстро элиминируются в окружающей среде, активны в меньших концентрациях, синтезируются микроорганизмами из возобновляемого сырья (например, из отходов пищевой промышленности), а также не теряют активность при экстремальных значениях температуры, солёности и pH (Петриков и др., 2017; Lima et al., 2011; Marchant, Banat, 2012; Kapadia, Yagnik, 2013; Santos et al., 2013; Sarubbo et al., 2015; Shah et al., 2016; Sharma, Oberoi, 2017). Благодаря этим свойствам биосурфактанты находят применение в самых разнообразных областях, таких как защита окружающей среды, нефтедобывающая, нефтеперерабатывающая, пищевая и фармацевтическая промышленность, косметология и медицина, сельское хозяйство (Perfumo et al., 2010; Gharaei-Fathabad et al., 2011; Campos et al., 2013; Ławniczak et al., 2013; Sachdev, Cameotra, 2013; Matvyeyeva et al., 2014; Silva et al., 2014; Biosurfactants ..., 2015а, 2015б; Mao et al., 2015; Varvaresou, Iakovou, 2015; De Almeida et al., 2016; Freitas et al., 2016; Ivshina et al., 2016; Joy et al., 2017а; Sharma, Oberoi, 2017).

На цену биосурфактантов очень большое влияние оказывает необходимость проведения стадии очистки биотехнологического продукта, на которую может приходиться до 60% от общей стоимости производства. Например, 1 мг коммерческого препарата «Surfactin» (чистота 98%), используемого в медицинских исследованиях, стоит около 10 долларов (Freitas et al., 2016). Но эту

высокозатратную операцию вполне можно исключить, когда биосурфактанты применяют в экологической биотехнологии или в нефтяной и нефтехимической промышленности (Freitas et al., 2016; Santos et al., 2016). Если в 80-х гг. XX в. цена биосурфактантов, используемых для удаления нефтеостатков и фракций тяжелых масел со дна и стенок емкостей хранения или ускоренной добычи нефти, была порядка 24 долларов за 1 кг, то в настоящий момент стоимость препарата «Sophoron»<sup>TM</sup> на основе софоролипидов, синтезируемых дрожжами *Candida bombicola* и предлагаемого компаниями «Saraya» (Япония) и «Soliance» (Франция), составляет 2,5-6,3 долларов за 1 кг (Freitas et al., 2016).

В рамках данного обзора будет рассматриваться использование микроорганизмов-продуцентов и образуемых ими биоПАВ для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Исследовалось влияние двух биосурфактантов и двух синтетических ПАВ Tween 80 и Triton X-100 на очистку песка, загрязненного моторным маслом, в лабораторных условиях. Биосурфактанты были получены при культивировании дрожжей *S. sphaerica* и бактерии *Bacillus* sp. на промышленных отходах и показали высокую эффективность при удалении моторного масла из загрязненного песка – 70-90%. Синтетические ПАВ разлагали 55-80% поллютанта. Присутствие биосурфактантов увеличило скорость деградации на 10-20%, что указывает на то, что они действуют как эффективные усилители деструкции углеводов аборигенной микробиотой (Chaprao et al., 2015).

Запатентован способ получения диспергатора для удаления с поверхности моря нефтяной пленки, в состав которого входит биосурфактант, продуцируемый дрожжами *C. bombicola* URM 3718 при культивировании их на промышленных отходах, а также консервант – сорбат калия. Препарат не токсичен, обладает стабильностью и продемонстрировал высокую эффективность в экспериментах по очистке водной поверхности от нефти при различных значениях pH, температуры и концентрации соли (Freitas et al., 2016; Santos et al., 2017).

Исследовано влияние биосурфактанта (липопептида), продуцируемого штаммом *Paenibacillus dendritiformis* CN5, на разложение пирена консорциумом,

состоящим из *P. viridiflava* и *P. nitroreducens*. Результаты показали, что в течение 24 суток липопептид в концентрации 600 и 300 мг/л увеличивает деструкцию пирена до 83,5 и 67% соответственно, в то время как деградация в отсутствии биосурфактанта составляет только 16% (Bezza, Chirwa, 2017).

Биосурфактанты, образуемые дрожжами (*C. guilliermondii*, *C. lipolytica* и *C. sphaerica*) и бактериями (*P. aeruginosa*, *P. ceracia* и *Bacillus* sp.) при выращивании на промышленных отходах, были испытаны на способность деэмульгировать моторное масло, содержащееся в морской воде. Лучшие результаты были получены для бактериальных ПАВ, благодаря которым удалось «собрать» около 65% загрязнителя, по сравнению с 35-40% для дрожжевых биосурфактантов (Rocha e Silva et al., 2017).

Мнифом с соавт. (Mnif et al., 2014) изучен штамм *B. subtilis* SPB1, способный к деструкции керосина и дизельного топлива в жидкой среде за счет синтеза биосурфактанта липопептидной природы. Далее этими авторами из загрязненной нефтью почвы (Тунис) были выделены четыре штамма УОМ (*Lysinibacillus bronitolerans* RI18, *B. thuringiensis* RI16, *B. weihenstephanensis* RI12 и *Acinetobacter radioresistens* RI7), из которых был составлен консорциум. Исследования показали усиление биодеградации дизельного топлива этим консорциумом в жидкой среде и в почве, как при добавлении 0,1% липопептида, продуцируемого штаммом *B. subtilis* SPB1 (на 38,42 и 12,19% соответственно), так и при совместной инокуляции консорциумом и штаммом, производящим биосурфактант (на 49,65 и 15,35% соответственно) (Mnif et al., 2015, 2017).

Отработаны условия культивирования штамма *B. subtilis*, выделенного из воды Атлантического океана, для увеличения количества продуцируемого им биосурфактанта. Максимальный выход продукта достигался при использовании глицерина в качестве источника углерода и нитрата натрия и дрожжевого экстракта в качестве источников азота. Биосурфактант снижает поверхностное натяжение воды до 27 мН/м, а при разбавлении в 10 раз – до 36,4 мН/м. Установлено, что очищенный продукт представляет собой смесь липопептида и гликолипида. При использовании его раствора с концентрациями 4 и 8 г/л степень



деструкции сырой нефти в почве составляет 58 и 65% соответственно. Полученные результаты демонстрируют потенциал микробных биосурфактантов для очистки загрязненной нефтью почвы (Zhu Z. et al., 2016).

Среди 47 штаммов УОМ обнаружено 11 изолятов, синтезирующих биосурфактанты. Это представители рр. *Achromobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobastrum* и *Pseudomonas*. Установлено, что *Achromobacter* sp. PS1 и *Bacillus* sp. SLDB1 образуют гликолипиды, поверхностное натяжение которых составляет 30,43 и 31,10 мН/м, а индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) 69,90% и 65,23% соответственно. Штаммы *Ochrobastrum* sp. GREW1 и *Bacillus* sp. SB2 продуцируют липопептиды с величинами поверхностного натяжения 31,14 и 28,16 мН/м и  $E_{24}$  59,51% и 61,35%, соответственно. *Achromobacter* sp. PS1 продемонстрировал самую высокую способность к деградации сырой нефти (46,32%) (при этом содержание алифатических и ароматических фракций уменьшилось на 70,77 и 77,17%) при одновременном снижении поверхностного натяжения с 59,27 мН/м (контроль) до 32,43 мН/м за 7 суток (Joy et al., 2017b).

Запатентован штамм бактерий *P. putida* ВКМ В-2380Д, продуцирующий поверхностно-активные вещества при росте на ПАУ и углеводородах нефти. Указанный микроорганизм полностью деградирует нафталин и фенантрен в почве за 3 и 20 суток и может входить в состав биопрепарата для очистки почв и поверхностных вод от нефтяных загрязнений, содержащих высокие концентрации ПАУ в различных климатических условиях (Филонов и др., 2009).

Из почвы в районе деревообрабатывающего предприятия выделен штамм *Ochrobastrum* sp. CN3, разрушающий нефтешламы и продуцирующий гликолипидопептидный биосурфактант, который обладает высоким уровнем термической стабильности, устойчивостью в условиях экстремальной солености и высокого pH. Штамм разрушал до 40% гидрофобных длинноцепочечных алифатических и полициклических ароматических углеводородов в жидких средах с 4% (об./об.) содержанием нефтешлама. Это свидетельствует о возможности применения изолята и его биосурфактанта в биоремедиации загрязненной углеводородами окружающей среды (Bezza et al., 2015; Bezza, 2016).

Исследована способность штамма *O. anthropi* НМ-1, выделенного из загрязненной моторным маслом почвы, к продукции биосурфактанта. Установлено, что ПАВ, синтезируемый этим микроорганизмом, снижает поверхностное натяжение среды с 70 до 30,8 мН/м и обладает высокой эмульгирующей активностью ( $E_{24}$  отработанного моторного масла 90%, сырой нефти – 92%). По составу это гликолипид, для производства которого в качестве дешевого источника углерода целесообразно использовать отработанное масло. В этом случае после 96 ч инкубации выход продукта составляет 4,9 г/л. Биосурфактант показал хорошую стабильность. После воздействия на протяжении месяца экстремальных условий, таких как температура (50-100°C в течение 30 мин), pH (2-12) и соленость (2-10% NaCl), он сохранял 83% эмульгирующей активности. С его помощью эффективно извлекали до 70% остаточных углеводов из песка, используемого при нефтедобыче. Изученный биосурфактант можно применять для биоремедиации или повышения нефтеотдачи пластов (Ibrahim, 2018).

Составлен консорциум, способный утилизировать нефть и нефтепродукты в почвах и водах при температурах 20-50°C, влажности грунта около 10% и уровне загрязнения нефтью до 10%. В его состав которого входят штамм *Gordonia* sp. 1D, продуцирующий биосурфактант, представляющий собой гликолипидную смесь и штаммы *R. erythropolis* Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, эмульгирующие углеводороды. Показана эффективность консорциума в условиях, моделирующих жаркий аридный климат (уровень загрязнения нефтью 2%, соленость 3%, влажность грунта 10%): степень деструкции нефти составила 70 и 59% (при температурах 24°C и 45°C соответственно) (Делеган, 2016).

Ранее уже упоминалась (см. раздел 5.2) эффективная ассоциация плазмидосодержащих микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти «ВиО», состоящая из *R. erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *A. baumannii* 7 и *P. putida* F7G1. Образующие ее штаммы являются продуцентами биосурфактантов, снижающих вязкость нефти и повышающих ее биодоступность, и способны к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широких

диапазонах температур (4-42°C) и pH (4-10) (Ветрова и др., 2013а, 2013б; Филонов, 2016).

Разработан, успешно испытан в полевых условиях и запатентован биопрепарат «МикроБак» для очистки почв и грунтов от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата. Входящие с его состав бактерии *Pseudomonas* spp. при росте на углеводородах образуют биоПАВ рамнолипидной природы, а штаммы *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 синтезируют гликолипиды, два из которых отнесены к сукциноилтрегалолипидам (Филонов и др., 2007б, 2010а; Петриков, 2011; Филонов, 2016).

Многие представители р. *Acinetobacter* способны к продукции биоПАВ, ускоряющих процесс нефтедеструкции (см. п. 5.2).

Несмотря на многочисленные научные статьи, касающиеся биодegradации углеводородов с помощью бактерий, синтезирующих биосурфактанты, в литературе отсутствуют упоминания об успехе коммерческой биоремедиации, связанной с применением биосурфактантов. Мало что известно о продукции этих веществ микроорганизмами *in situ*. Большинство описанных исследований проводились в лабораторных условиях, где использовался единственный источник загрязнения. Для эффективного применения этих соединений в процессах очистки окружающей среды требуется дополнительная информация о структуре биосурфактантов, их взаимодействии с почвой и загрязняющими веществами, влиянии на аборигенную микробиоту, а также разработка методик контроля их содержания в почве и новых технологий экономически выгодного производства (Matvuyeva et al., 2014; Decesaro et al., 2017).

## **6.2. Азотфиксирующие микроорганизмы и их участие в процессах биоремедиации нефтезагрязненных объектов**

Азотфиксация (дiazотрофия) – важнейшее звено в глобальном цикле азота, которое наряду с фотосинтезом обеспечивает продуктивность биосферы в целом. Многие природные экосистемы лимитированы по доступным соединениям азота, что придает процессу азотфиксации особое значение в круговороте биогенных

элементов (Умаров, 2007). Ранее считалось, что это явление характерно только для узкой группы специализированных бактерий и основное внимание ученых было сосредоточено на изучение симбиотической азотфиксации, в свете ее значимости для сельского хозяйства. Однако в настоящее время распространено мнение о том, что способность к фиксации атмосферного азота имеется у всех прокариот (бактерий и архей), относящихся к самым разным физиологическим и таксономическим группам – хемолитотрофов, фототрофов и гетеротрофов, аэробов, микроаэрофилов, анаэробов и пр., которые присутствуют практически во всех экосистемах (Zehr et al., 2003; Умаров, 2007).

Скорость биодеструкции нефти и нефтепродуктов зависит в т.ч. и от обеспеченности УОМ микроэлементами, важнейшим среди которых является азот. При загрязнении почв нефтью вносится большое количество углерода, в результате чего нарушается количественное отношение C:N и возникает недостаток азота для микроорганизмов-нефтедеструкторов. Поэтому задачей биотехнологического подхода к восстановлению почв является активизация микробного метаболизма путем корректировки углеродно-азотного баланса (Aichberger et al., 2005). Этого чаще всего добиваются путем внесения больших объемов минеральных азотных удобрений, что является экономически невыгодным, а, зачастую, и бесполезным т.к. не учитывается неодинаковое влияние различных форм удобрений и их количества на интенсивность азотфиксации (Терещенко и др., 2004). К тому же, повышенные дозы минеральных удобрений могут приводить к солевой фитотоксичности, связанной с сильным подкислением почвы; микробному токсикозу почв, вызванному изменением структуры и физиологической активности пула почвенных микроорганизмов, в котором начинают доминировать токсинообразующие грибы р. *Penicillium*, угнетающие прорастание семян и развитие проростков; ингибированию микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов (Шаронова и др., 2009; Алексеева и др., 2013; Chaineau et al., 2003, 2005; Koshlaf, Ball, 2017). Более экономически и экологически целесообразным представляется внесение в загрязненную углеводородами почву полифункциональных штаммов

бактерий, не только деградирующих ксенобиотики, но и фиксирующих атмосферный азот.

К числу таких микроорганизмов относятся многие представители р. *Azotobacter*, способные к значительной нитрогеназной активности, продукции фитогормонов и часто используемые в качестве основы биоудобрений (Логинов и др., 2004, 2005; Астафьева и др., 2012; Дегтярева и др., 2012). Эти бактерии также могут усваивать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии, как в присутствии связанного азота, так и при азотфиксации. Интродукция штаммов *Azotobacter* spp. повышает скорость самоочищения загрязненной нефтью почвы, а бактерии *A. chroococcum* оказывают активирующее влияние на рост УОМ, входящих в состав препарата «Деворойл» (Градова и др., 2003). При культивировании *A. chroococcum* в жидкой среде без азота и с нефтью в качестве единственного источника углерода, содержание углеводов снижается на 52% (Рысбаева, 2007). Штамм *A. chroococcum*, выделенный из морской воды у побережья штата Тамилнад (Индия), обладает высоким потенциалом деградации сырой нефти (58%) за счет производства биосурфактанта (1 мг/мл за 96 ч) и фиксации азота (4,2 мг/л). Есть сообщения о возможности использования азотфиксирующих бактерий, деградирующих углеводороды, и их биосурфактантов в борьбе с загрязнением морей нефтью (Thavasi et al., 2006). Проведены исследования способности микроорганизмов р. *Azotobacter* расти и развиваться на средах, содержащих нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и предложено применять эти штаммы в очистке почв от нефтепродуктов (Сулима и др., 2010).

Установлено, что diaзотрофные микроорганизмы, такие как *Azotobacter* sp., *B. polymyxa* и *Chroococcus* sp., ускоряют биоремедиацию загрязненной сырой нефтью почвы более эффективно, чем комплексные минеральные удобрения (NPK 15:15:15) (Odokuma, Inor, 2002).

На примере аборигенных азотфиксаторов нефтешламов показано, что у микроорганизмов возможно сочетание diaзотрофии со способностями к деструкции широкого спектра специфических загрязнений. Десять таких

изолятов, относящихся к классу  $\gamma$ -*Proteobacteria*, растут на средах с добавлением индивидуальных углеводородных соединений или непосредственно нефтешлама. Продемонстрирована весьма ценная в эколого-экономическом отношении возможность замены в процессе биоремедиации нефтешлама азотных удобрений биологическим процессом фиксации азота (Григорьева, 2009).

Есть сообщения о том, что в ризосфере бобовых растений, выращенных в нефтезагрязненной почве, присутствуют свободноживущие азотфиксирующие бактерии *Clostridium pasteurianum*, *B. polymyxa*, *P. aeruginosa*, *Azotobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* и *Derxia gummosa*, деградирующие углеводороды (John et al., 2011). Такая же способность была обнаружена у микроорганизмов *Azospirillum brasilense* SR80 (Муратова, 2013). Интродукция diaзотрофных микроорганизмов *Azospirillum doebereineri* 13131<sup>T</sup> ускоряла (в 1,6 раза) биodeградацию нефтепродуктов штаммами углеводородокисляющих бактерий р. *Acinetobacter* (Данг, 2012).

Присутствие азотфиксирующих фотогетеротрофных пурпурных бактерий компенсирует недостаток азота в среде и оказывает положительное влияние на окисление углеводов бактериями *Dietzia maris* (Драчук, 2004).

Имеются сведения о том, что в прибрежных и пустынных почвах Кувейта, особенно в тех, что имеют давнюю историю нефтяного загрязнения, присутствуют в больших количествах бактерии ( $10^7$ - $10^8$  КОЕ/г), обладающие комплексом биотехнологически значимых свойств, таких как способность к деградации нефти, фиксации азота и устойчивость к ртути. Наибольший интерес среди них представляют штаммы *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter* sp., *Exiguobacterium aurantiacum*, которые предлагается использовать для биоремедиации пустынной нефтезагрязненной почвы, крайне бедной азотом (Sorkhoh et al., 2010).

Из сельскохозяйственной почвы (Нигерия) на жидкой среде без азота были выделены и в дальнейшем идентифицированы свободно живущие diaзотрофные бактерии *Paenibacillus polymyxa*, *P. lautus*, *Bacillus* sp. и *Brevibacillus agri*,

разлагающие за 21 сутки сырую нефть на 94,13-97,97%. Изоляты также использовали *n*-гексадекан, *n*-додекан, дизельное топливо и керосин в качестве единственного источника углерода и энергии. В лабораторных экспериментах по ремедиации почвы, загрязненной сырой нефтью, установлено, что ее деградация этими микроорганизмами за 60 суток инкубации составила 89,92-92,72%, в то время как в контрольных вариантах без инокуляции – только 23,19% (Omotayo et al., 2013).

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии *Acinetobacter junii* AM14, *Achromobacter* sp. AM02 и AM05 а также *Alcaligenes faecalis* AM07 и *Arthrobacter* sp. AM10 выделены из различных образцов нефзагрязненных почв (штат Ассам, Индия) (Mazumdar, Deka, 2013; Mazumdar et al., 2015). Эти микроорганизмы можно использовать для биоремедиации нефтезагрязненных почв и в качестве биоудобрений для увеличения содержания азота в таких почвах, а саму сырую нефть рассматривать как источник углерода и энергии для роста diaзотрофных бактерий.

Мексиканские ученые использовали для биоаугментации свободноживущие азотфиксирующие бактерии, продуцирующие биосурфактанты и выделенные из мест, длительно загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Благодаря их интродукции общее содержание углеводов в почве снизилось на 80% за 16 месяцев, а численность азотфиксирующих микроорганизмов увеличилась с  $10^4$  до  $10^9$  КОЕ/г. Предлагается применять эти микроорганизмы для обработки бедных азотом почв, загрязненных углеводородами (Pérez-Vargas et al., 2017).

### **6.3. Психротолерантные микроорганизмы для очистки экосистем от нефтяного загрязнения в условиях умеренного и холодного климата**

В России значительное число нефтедобывающих предприятий сосредоточено на севере европейской части страны и в Западной Сибири в зоне умеренного и холодного климата. В этих регионах самоочищение почво-грунтов и водоемов от нефтезагрязнения с помощью эндогенной углеводородокисляющей микробиоты лимитируется неблагоприятными почвенно-климатическими

факторами – низкими среднегодовыми температурами, слабым влиянием такого физико-химического фактора разложения, как солнечное излучение, невысокой интенсивностью испарения летучих фракций углеводородов, малым содержанием питательных веществ, повышенной концентрацией соли, недостатком аэрации и др. Кроме того, характерной чертой северных экосистем является наличие многолетнемерзлых пород, небольшая мощность гумусового горизонта, невысокая биологическая активность почв, относительная обедненность видового состава растений, микроорганизмов и почвенных животных. В таких условиях процесс ауторемедиации может продолжаться в течение десятилетий (Алексеев, 2011; Алексеев и др., 2011). Поэтому в умеренных и приполярных регионах необходимо применение специальных приемов для ускорения очистки окружающей среды от углеводородов, среди которых наиболее оптимальным является внесение психротолерантных микроорганизмов, обладающих достаточной способностью к деструкции поллютантов при низкой положительной температуре, приспособленностью к сезонным колебаниям температур и растущих даже тогда, когда активность других бактерий снижена. Их интродукция позволит продлить период биорекультивации на несколько месяцев. В связи с этим актуален поиск новых микроорганизмов, которые были бы устойчивы к условиям восстанавливаемых территорий и могли бы обеспечивать значительную степень деградации нефти и нефтепродуктов.

Из природных биоценозов Сибири выделены 424 штамма психротолерантных и галотолерантных (5-10% NaCl) микроорганизмов, в основном относящихся к бактериям pp. *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Enterobacter*, к грибам pp. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Yarrowia* и способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при низких положительных температурах. Наиболее эффективные штаммы-деструкторы нефтепродуктов были идентифицированы как *Y. lipolytica*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter junii*, *A. calcoaceticus*, *Pseudomonas* sp. Содержание фракции n-алканов после биodeградации штаммами *A. junii*, *A. calcoaceticus* снизилось на 97%, ассоциацией штаммов *Y. lipolytica* Y1064 и



*Enterobacter* sp. B1024 – на 92%, ассоциацией штаммов *Y. lipolytica* NF5-1 и *Pseudomonas* sp. KL-1 – на 90%. Содержание производных бензола после биодegradации ассоциацией штаммов *Y. lipolytica* Y1064 и *Enterobacter* sp. B1024 снизилось до 34,5 раз; производных нафталина – до 79 раз. Разработанные ассоциации рекомендованы в качестве основы комплексных биопрепаратов для биоремедиации почвы и воды в регионах с холодным климатом (Андреева и др., 2006, 2007; Емельянова, 2009; Emel'yanova et al., 2006).

Из природных загрязненных нефтью субстратов (вода, почва, техногенный грунт и отсыпка) были выделены 13 культур микроорганизмов, обладающих способностью к активному росту на селективных питательных средах с нефтью при температуре 4-8°C. Штаммы, внесенные в загрязненную высокопарафинистой нефтью почву, деградируют за 4 недели до 69,4-89,9% нефти. Количество предельных углеводородов твердой фракции (C<sub>17</sub>-C<sub>39</sub>) при этом снижалось на 60,7-84,9%. Из наиболее эффективных деструкторов была составлена микробная ассоциация ДТА-1 (*Pseudomonas* sp. ТЕТР-1-кр, *Pseudomonas* sp. № 8, *Enterobacter* sp. ГАВ 2-гл, *Bacillus* sp. № 2в, *Acinetobacter* sp. № 7), благодаря применению которой была достигнута очень высокая степень деструкции (89,8%) фракции твердых алканов при низких положительных температурах. Подобранный ассоциация рекомендована для разработки препарата для очистки загрязненных нефтью территорий в условиях севера (Алексеев и др., 2011). Для этих же целей предложен штамм бактерий *B. subtilis* «Колыма-7/2к», применение которого позволяет за 3 месяца летнего периода снизить концентрацию нефти с 135143 до 645 мг/кг (Неустроев и др., 2012).

В полевых испытаниях, проведенных в течение 2 месяцев при средней температуре почвы 8-14°C, с помощью штамма бактерий *Exiguobacterium mexicanum* ВКПМ В-11011, выделенного из нефтезагрязненной почвы Амурской области, была осуществлена деструкция нефти на 86,97%, в то время как ее естественные потери в мерзлотной почве, не обработанной микроорганизмами, составили 7,32% (Ерофеевская, 2014б).

Из природных объектов северных регионов, загрязненных нефтью, выделены 3 психротолерантных углеводородокисляющих микробных сообщества Nsk1, Nsk2 и Csha2. Эффективность деструкции нефти при температуре 4°C для консорциумов Nsk1 и Nsk2 составляет более 30%, для консорциума Csha2 – более 70%. Ассоциация Nsk1 обладает высокой эмульгирующей активностью, достигающей 65,9%. Исследованные сообщества могут быть использованы для создания на их основе биопрепаратов для очистки от загрязнения углеводородами акваторий и прибрежных зон северных морей (Федоренко и др., 2015).

Установлено присутствие в Баренцевом море нефтедеструкторов *Arthrobacter rhombi*, *Salinibacterium amurskyense*, *Shewanella vesiculosa*, а в Белом море – вида *Nocardia coeliaca*, изолированных с поверхностей морских макрофитов. Выявлено, что они обладают высоким окислительным потенциалом (до 60%) и биоэмульгирующей активностью (до 50%) в условиях низких температур и солености 30 г/л NaCl, а также способностью к образованию внеклеточных и внутриклеточных ПАВ. Изученные штаммы представляются перспективными компонентами биопрепарата для борьбы с нефтяными загрязнениями в арктическом регионе (Федоренко, 2016; Федоренко и др., 2016).

Многолетние исследования по выделению, изучению свойств психротолерантных микроорганизмов и возможностей их применения в биоремедиации нефтезагрязненных объектов окружающей среды проводятся в лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино) под руководством член-корреспондента РАН А.М. Боронина и д.б.н. А.Е. Филонова. В результате проведенного скрининга выделено 220 штаммов УОМ. На основании детального анализа их свойств отобрано 15 наиболее эффективных психротолерантных штаммов, образующих биоэмульгаторы и способных к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов (до 30%) в присутствии соли (до 5% NaCl) в температурном диапазоне (4-42°C) при значениях pH от 4 до 10. Штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* и *Serratia* (Филонов, 2016). Сотрудниками лаборатории на основе консорциума

психротрофных, галотолерантных микроорганизмов-деструкторов углеводов pp. *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, продуцирующих биоэмульгаторы, разработан и запатентован биопрепарат «МикроБак» для биоремедиации почв, содержащих до 15% нефти в присутствии до 5% соли, pH 6-8, в температурном диапазоне 4-32°C. Штаммы псевдомонад, входящие в состав биопрепарата, содержат плазмиды биодegradации ПАУ. Полевые испытания биопрепарата «МикроБак» при пониженной температуре показали, что за 2 месяца он способен утилизировать от 50 до 90% нефти и нефтепродуктов (Филонов и др., 2007а, 2007б, 2010а; Нечаева, 2009; Ветрова и др., 2013б; Филонов, 2016). Кроме этого, научным коллективом создана уже упомянутая микробная ассоциация «ВиО» как основа биопрепарата для биоремедиации почвенных и водных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Она состоит из штаммов *R. erythropolis* S26, *A. baumannii* 1В, *A. baumannii* 7 и *P. putida* F701, содержащих катаболические плазмиды и способных к деградации углеводов нефти при концентрации до 30%, в температурном диапазоне 4-42°C, в присутствии до 5% соли и pH от 4 до 10 (Ветрова, 2010; Ветрова и др., 2013б; Филонов, 2016; Filonov et al., 2012)

Запатентован психроактивный штамм бактерий *Arthrobacter rhombi* ARC 16, изолированный из портовой зоны г. Мурманск, а также микробный препарат и способ его получения, содержащий кроме этой бактерии еще биомассу психроактивных микроорганизмов *Nocardia coeliaca* ARC 1, *Cobetia marina* ARC 11 в объемном соотношении 1:1:1. Оба изобретения предназначены для утилизации углеводородных загрязнений акваторий и береговой линии при температуре 4-20°C и солености до 30 г/л. В лабораторных экспериментах при использовании как индивидуального штамма *A. rhombi* ARC 16, так и созданной ассоциации, суммарная убыль среднекипящей и высококипящей фракций нефти составляла не менее 50% за 7 суток культивирования при температуре 4°C и солености среды 30 г/л (Исаченко и др., 2017; Шестаков и др., 2017в).

#### **6.4. Микробно-растительные ассоциации как перспективное направление экологической биотехнологии**

Одним из приемов стимуляции разложения нефти в почве является применение микробно-растительных комплексов. В основе их действия лежит ризодеградация – деструкция токсикантов ассоциированными с корнями растений микроорганизмами (Муратова, 2013; Назаров, 2013; Нишкевич и др., 2017; Graj et al., 2013; Khan et al., 2013; Fester et al., 2014; Hou et al., 2015; Fatima et al., 2016, 2017). Корни растений обеспечивают поверхности для прикрепления микроорганизмов и выделяют экссудаты – внеклеточную жидкость, содержащую ферменты, сахара, аминокислоты, органические кислоты, стимуляторы роста, различные вторичные метаболиты и т.д. Их наличие создает оптимальные условия существования и размножения микроорганизмов, количество которых в ризосфере намного выше, чем в окружающей почве (Горшков, 2010; Отрошко и др., 2015; Степанова и др., 2017; Kitamura, Maranhо, 2016). Корни подготавливают питательные компоненты и другие субстраты, повышая эффективность их усвоения и, по возможности, при помощи экссудатных ферментов, осуществляя деградацию органических субстратов, находящихся в почве, в более низкомолекулярные и легкоусвояемые микроорганизмами соединения. Так, например, в составе корневых экссудатов присутствует сапонин, увеличивающий биодоступность углеводов для микроорганизмов (Новоселова, Киреева, 2009). Также корни при помощи выделяемых ферментов осуществляют деградацию органических субстратов, находящихся в почве. Установлено, что присутствующие в составе корневых экссудатов оксидоредуктазы участвуют в разложении полициклических ароматических углеводов, как нативных, так и их микробных метаболитов (Muratova et al., 2015). Кроме того, образующийся в результате фотосинтеза кислород обеспечивает окисление компонентов нефти. Развитие корневой системы также увеличивает пористость почвы, что способствует массовому переносу субстрата и акцепторов электронов (Gkorezis et al., 2016). Микроорганизмы, в свою очередь, увеличивают катаболическую активность в прикорневой зоне и могут

стимулировать рост растений путем выделения различных биологически активных веществ (фитогормонов, витаминов, вторичных метаболитов и пр.), улучшения фосфорного и азотного питания и повышения стрессоустойчивости, а также опосредованной стимуляции за счет антагонизма в отношении фитопатогенных агентов (Четвериков и др., 2009; Максимов и др., 2015; Феоктистова и др., 2016; Maksimov et al., 2011; Duca et al., 2014; Kudoyarova et al., 2014; Panhwar et al., 2014; Chowdhury et al., 2015; Koul et al., 2015; Ijaz et al., 2016; Ahmed et al., 2017; Тус et al., 2017).

Доминирующими в прикорневой зоне растений, произрастающих в почвах, загрязненных углеводородами, являются представители рр. *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Rhizobium*. Микробно-растительные ассоциации и симбиозы, обладающие гибким метаболизмом и уникальными ферментными системами, имеют большие преимущества при выживании в неблагоприятных условиях окружающей среды, обусловленные не только повышенной толерантностью к ксенобиотикам, но и способностью к активному удалению токсикантов из сферы обитания (Muratova et al., 2010; Alwan et al., 2013; Liu W. et al., 2014; Al-Baldawi et al., 2015; Ijaz et al., 2015; Gkorezis et al., 2016). Используя микробно-растительные взаимодействия можно ускорить очистку и восстановление почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, ПАУ, синтетическими ПАВ, хлор-, нитро- и фосфорорганическими соединениями, а также другими органическими поллютантами (Нишкевич и др., 2017; Степанова и др., 2017; Megharaj et al., 2011; Siunova et al., 2011; Jampasri et al., 2016; Kitamura, Maranhо, 2016; Shahsavari et al., 2016; Farraji et al., 2017; Kuppusamy et al., 2017; Liang et al., 2017; Patel, Patra, 2017; Fatima et al., 2018). В рамках данного обзора будут рассмотрены примеры изучения и использования микробно-растительных комплексов для очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения.

Создана коллекция азотфиксирующих изолятов, выделенных из отходов нефтепереработки, нефтехимии и органического синтеза, сочетающих способность к утилизации компонентов шлама (многоатомные спирты, алканы,

ПАУ) с ростстимулирующим потенциалом в отношении растений (растворение труднодоступных соединений фосфора, синтез фитогормонов, антагонистическая активность против бактериальных и грибных фитопатогенов) (Григорьева, 2009).

Выделены и сконструированы новые плазмидосодержащие штаммы бактерий р. *Pseudomonas*, совмещающие способность деградировать ПАУ, подавлять рост фитопатогенов и продуцировать индолил-3-уксусную кислоту, которые могут использоваться для разработки на их основе нового поколения биопрепаратов для защиты и стимуляции роста растений, а также очистки почв с комплексным загрязнением нефтепродуктами, ПАУ и тяжелыми металлами (Анохина, 2011).

В работе (Орлова, Степанова, 2012) проведена оценка возможности создания биоремедиационного комплекса для очистки почвы от нефти с использованием растений люцерны и райграса и микроорганизмов *A. oleovorum* 712 и *Candida maltosa* 569, входящих в состав коммерческого препарата «Олеоворин». Наиболее эффективным оказался комплекс, состоящий из микроорганизмов *C. maltosa* 569 и растений люцерны, который способствовал уменьшению содержания нефтепродуктов в почве на 69% к 56-м суткам опыта.

Нефтяное загрязнение почвы является главной проблемой для чайной промышленности в штате Ассам (Индия). Для ее решения Рой с соавт. из загрязненной нефтью почвы выделили два штамма, способные к росту на среде с сырой нефтью и идентифицированные ими как *P. aeruginosa* AS03 и NA108. Установлено, что они обладают антигрибной активностью и могут использоваться для биоремедиации почв. Наблюдалось усиление роста чайных растений и увеличение сухой массы их корней и побегов в нефтезагрязненной почве, обработанной как штаммом AS03, так и NA108, по сравнению с растениями, выросшими в нарушенной почве без инокуляции. Интродукция бактерий улучшила качество самой почвы: уменьшилось содержание углеводов (каждый из штаммов деградировал сырую нефть на 40%), улучшилась проводимость, повышалась активность почвенных ферментов (Roy et al., 2013).

Запатентован штамм *Sinorhizobium meliloti* P221, который синтезирует индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрации 30-40 мкг/мл и деградирует фенантрен в концентрации 0,1-1,0 г/л за 5 суток в жидкой среде на 90-30% и способ очистки от загрязнения углеводородами, включающий внесение в грунт минеральных азотных удобрений и посев смеси бобовых (люцерна) и злаковых (райграс пастбищный, и/или рожь озимая, и/или сорго веничное) растений-фиторемедиантов. При этом осуществляют либо бактеризацию семян, либо полив проростков суспензией штамма микроорганизма-деструктора углеводов, стимулирующего рост растений. Используют или штамм *S. meliloti* P221, или *Azospirillum braselense* SR80, продуцирующий ИУК в концентрации 35-45 мкг/мл и деградирующий сырую нефть в концентрации 10 г/л за 14 суток на 57% в жидкой среде. Обработка штаммом *A. braselense* SR80 позволила достичь 69% деградации загрязнителя (нефтешлам с исходным содержанием 11,5 г/кг почвы) через 120 суток. Инокуляция бактериями *S. meliloti* P221 растений-фиторемедиантов, высеянных в песок, содержащий фенантрен (0,1 г/кг), способствовало преодолению ими поллютантного стресса, увеличивая приживаемость и прирост биомассы в условиях загрязнения, и повышало эффективность очистки грунта на 24% по сравнению с песком с неинокулированными растениями. В свою очередь, растения поддерживали в песке численность штамма *S. meliloti* P221 (Муратова и др., 2010а, 2010б).

Предложен штамм азотфиксирующих бактерий *P. stutzeri* KOS6 – деструктор алифатических и ароматических углеводородов, стимулирующий рост растений за счет выработки ИУК. Инокуляция им семян как двудольных (горох), так и однодольных (овес) растений способствует увеличению длины корней и роста побегов, общей биомассы в условиях развития на нефтехимическом шламе, содержащем тяжелые металлы. Посев в почву, загрязненную сырой нефтью в концентрации 150 г/кг, семян растений, обработанных микроорганизмами *P. stutzeri* KOS6, приводит к тому, что за 90 суток эксперимента происходит существенное, на 36%, снижение содержания

углеводородов в грунте по сравнению с использованием небактеризованных растений. Это доказывает применимость штамма *P. stutzeri* KOS6 для фиторемедиации нефтешламов и антропогенно нарушенных почв, для которых характерно комплексное загрязнение углеводородами и тяжелыми металлами, а также недостаток азота на фоне высокого содержания углеводородов (Григорьева и др., 2014).

Разработан комплекс для биоремедиации, включающий микроорганизмы биопрепарата-нефтедеструктора «Деворойл» (представители рр. *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Candida*) и многолетние травянистые растения (тимофеевка или клевер) (Лифшиц и др., 2014).

На основе консорциума «ВиО», состоящего из плазмидосодержащих бактерий *R. erythropolis* S26, *A. baumannii* 1В, *P. putida* F701, *A. baumannii* 7, способных к росту в широком диапазоне температур (4-42°C) в присутствии высоких концентраций нефти (до 30%) при значениях рН 4-10 и синтезирующих биосурфактанты, разработаны микробно-растительные ассоциации для повышения эффективности деградации нефти в почве. Наиболее перспективной оказалась «ВиО»-ячмень, благодаря применению которой деструкция нефти на территории нефтяных месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа за 2 месяца при температуре от -2 до +24°C была на 20% выше, чем при использовании ассоциаций ячменя с другими коммерческими препаратами (Ветрова, 2010; Ветрова и др., 2013б; Иванова и др., 2015; Филонов, 2016).

Разработана микробно-растительная ассоциация для фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами, в которой в качестве фитоэкстрагента используется люцерна посевная, а микробный компонент включает штаммы клубеньковой азотфиксирующей бактерии *Sinorhizobium meliloti* S3 и фосфатмобилизующей бактерии *Serratia plymuthica* 57. Оба микроорганизма продуцируют ИУК в количестве 67 и 170 мкг/мл соответственно. Обработка семян люцерны суспензией *S. meliloti* S3 ускоряет процесс разрушения нефти на 13,8%, штаммом *S. plymuthica* 57 – на 28,4%, а их смесью – на 58,5%.



При загрязнении почвы отработанным индустриальным маслом (1%), инокуляция семян люцерны смесью бактерий увеличивает урожайность зеленой массы культуры на 9,6 ц/га по сравнению с контролем. Микробно-растительная ассоциация способствует восстановлению типичного для данных условий почвенного микробоценоза (Федоренчик и др., 2014; Порхунцова и др., 2015).

Исследована возможность использования трансгенных растений и их комплекса с микроорганизмами для очистки почвы от нефтезагрязнений. Подобраны условия агробактериальной трансформации и получены генетически модифицированные растения люцерны с геном *rhlA*, ответственным за синтез биосурфактанта рамнолипидной природы. Выращивание в почве, содержащей 4% нефти, контрольных и трансгенных растений люцерны показало преимущество последних: утилизация ими нефти была на 20% выше по сравнению с контролем. При совместном использовании трансгенных растений и микроорганизмов *Candida maltosa* удалось повысить степень деградации поллютанта до 86%. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения трансгенных растений и их комплекса с микроорганизмами для повышения эффективности биоремедиации (Степанова и др., 2015).

Разработан способ фиторемедиации, согласно которому в нефтезагрязненную почву вносят суспензию штамма *R. erythropolis* ВКМ Ас-2017Д – деструктора углеводов, стимулирующего рост растений, совместно с содержащей фитогормоны средой культивирования и производят посев растений-фиторемедиантов (люцерна посевная или пшеница озимая). Способ позволяет увеличить вегетацию растений и довести остаточное содержание поллютанта до 42-47% и рекомендуется для ускорения скорости очистки почв на сильно загрязненных участках (Отрошко и др., 2017).

Показано, что интродукция микроорганизма *R. erythropolis* CD106 повышала эффективность фиторемедиации почвы, хронически загрязненной углеводородами, с помощью растений райграса. Внесение штамма CD106 значительно увеличило их биомассу (свежий вес побегов и корней возрос на 49 и

30% соответственно) и снижало концентрацию углеводов в почве на 31,2% после 210 суток эксперимента. При использовании только растений этот показатель уменьшился на 16,8%, а при применении только микроорганизмов – на 18,7% (Płociniczak et al., 2017).

Разработан биопрепарат для биремедиации и способ его получения, состоящий из ассоциации нефтеокисляющих бактерий *Pseudomonas delhiensis* B-11400 и клубеньковых бактерий *Rhizobium lotus* RL-5, а также растений лядвенца рогатого (Трефилова, Лазыкин, 2017).

Путем комбинирования наиболее активных штаммов УОМ, выделенных из ризосферы растений, произрастающих в нефтезагрязненной почве, подобрана ассоциация из двух штаммов вида *A. guillouiae* и штамма *R. erythropolis*. В ее присутствии повышается эффективность разложения углеводов в почве, увеличивается активность почвенных оксидоредуктаз (до 8 раз), усиливается интенсивность дыхания (до 74%), снижается токсическое действие поллютанта на растения редьки масличной (до 1,5 раз) (Третьякова, 2018).

Применение растений люцерны желтой совместно со штаммом *Acinetobacter* sp. S-33 для биоремедиации почвы, контаминированной нефтью, улучшает качество очистки (содержание поллютанта снижалось на 39%) по сравнению с обработкой только бактериями или растениями (содержание нефти уменьшалось на 35 и 34% соответственно). Инокуляция штаммом S-33 привела к усилению роста корней и побегов на 44 и 47% соответственно и положительно повлияла на почвенную микробиоту, увеличивая в 10 раз численность УОМ и гетеротрофных микроорганизмов (Muratova et al., 2018).

Как видно из приведенных примеров, в настоящее время активно проводится изучение потенциала микробно-растительных комплексов для очистки почвы от нефтяного загрязнения. Дальнейшие исследования взаимного влияния поллютанта, аборигенных или интродуцированных микроорганизмов-деструкторов и растений-ремедиантов будут способствовать созданию надежных и высокоэффективных технологий биоремедиации окружающей среды от антропогенного воздействия.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами является глобальной экологической проблемой и будет оставаться таковой еще очень долгое время. Это связано с тем, что указанные вещества служат основным источником энергии на планете, а также со способностью углеводородов, попадая в одну из природных сред (водную, почвенную, воздушную), достаточно быстро распространяться в каждой из них. Поэтому исследования влияния нефти и ее производных на различные экосистемы и разработка методов их очистки по-прежнему актуальны и проводятся учеными из многих лабораторий мира.

К настоящему времени накоплен большой массив сведений о воздействии этих поллютантов на различные природные объекты. Показано, что загрязнение углеводородами в целом отрицательно влияет на весь комплекс морфологических, физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих ее плодородие и экологические функции. Степень этих изменений зависит от климата и рельефа местности, типа и исходного состояния почвы, а также от состава, свойств, количества и продолжительности воздействия загрязнителя. Попадание нефти приводит к изменению численности популяций и структуры биоценозов. В ряде случаев, в малых концентрациях она способна стимулировать активность некоторых почвенных ферментов, усиливать рост и развитие определенных видов микроорганизмов и растений.

Главные последствия контаминации нефтью водной среды – это образование пленки на воде, ухудшающей газообмен в поверхностных слоях, препятствующей проникновению света, и, как следствие, фотосинтезу, а также оседание тяжелых фракций на дно. Загрязнение углеводородами приводит к ухудшению физических и органолептических свойств воды и вызывает нарушения видовой и трофической структур водных экосистем. Попав в водную среду, нефть распределяется по ее профилю и оказывает влияние на все группы организмов, обитающих как в поверхностном слое, так и в толще и в донных осадках. Особенно сильно негативное влияние разливов в прибрежной зоне и на берегу. Большинство представителей фауны особо чувствительны к действию

нефти на ранних стадиях развития. Последствия загрязнений для отдельных видов зависят от численности и скорости воспроизводства их популяций. Наиболее подвержены поражению птицы и млекопитающие. В целом, вредное действие нефти на водных обитателей определяется не столько интоксикацией организмов, сколько их прямым физическим контактом с загрязнителем на поверхности водоемов и на берегах, а также с нарушением местообитаний и кормовой базы.

Серьезным источником загрязнения гидросферы является попадание в нее нефтесодержащих сточных вод, представляющих собой сложную многокомпонентную и многофазную систему, органическая часть которой (50-98%) представлена нефтяными углеводородами различных классов и их производными. Состав и концентрация этих поллютантов зависят от вида, назначения и технологии производства, в процессе которого они образуются. Попадание углеводородов в окружающую среду со сточными водами очень сложно предотвратить, т.к. они находятся в стоках практически всех промышленных предприятий, транспорта и сферы услуг, поверхностном стоке с территорий этих предприятий, в отработанных технологических растворах и т.п.

Значительный вклад в загрязнение экосистем вносят и нефтесодержащие отходы. Различные нефтешламы, образующиеся в процессе добычи и переработки углеводородного сырья, являются наиболее крупнотоннажными промышленными отходами, которые занимают огромные площади, выводя из оборота значительные земельные ресурсы, приводя к выбросам загрязняющих веществ в атмосферу, фильтрации поллютантов в подземные водоносные горизонты.

Самоочищение окружающей среды от нефтяного загрязнения – достаточно длительный процесс, особенно в регионах с холодным климатом, поэтому необходимо применение методов очистки, которые можно разделить на несколько групп: механические, термические, химические, физические и биологические. Наиболее экологически безопасными и экономически целесообразными из них являются биоремедиационные, базирующиеся на свойствах живых организмов (растений, животных, микроорганизмов) использовать нефть и нефтепродукты в процессе своей жизнедеятельности.

Основную роль в этом играют микроорганизмы, только они способны окислять различные углеводороды до конечных продуктов – углекислого газа и воды. Существуют два приема биоремедиации посредством микроорганизмов: биостимуляция эндогенной углеводородокисляющей микробиоты и биоаугментация – внесение дополнительного количества микроорганизмов-нефтедеструкторов, в основном в виде биопрепаратов.

Установлено большое разнообразие УОМ, среди которых есть бактерии, грибы, водоросли, но особенно широко такие виды представлены среди бактерий pp. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum* и пр. В нашей стране разработано большое количество биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения и обезвреживания нефтесодержащих отходов, как на основе монокультур, так и содержащих ассоциации из нескольких штаммов УОМ. Но, не смотря на это, из-за сложного многокомпонентного состава нефти, который сильно варьируется в зависимости от месторождения, различий в химических свойствах между нефтью и нефтепродуктами, а также по причине неодинаковых природно-климатических условий районов добычи, переработки и хранения нефти, невозможно создание какого-то одного универсального биопрепарата. Поэтому работы по разработке биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения и технологий их применения по-прежнему остаются актуальными.

Основной причиной, которая затрудняет микробиологическое разложение нефтепродуктов, является гидрофобность молекул углеводородов, приводящая к их сорбции на различных поверхностях и переходу в биологически труднодоступную форму. Устранить это препятствие способны биосурфактанты – разнообразные поверхностно-активные вещества, синтезируемые микроорганизмами. Ведется активный поиск таких продуцентов и отработка условий их культивирования для увеличения выхода биосурфактанта и изучение его свойств с целью применения для очистки окружающей среды.

Задачей биотехнологического подхода к восстановлению почв является активизация микробного метаболизма путем корректировки углеродно-азотного

баланса, нарушенного в результате поступления с нефтью избыточного количества углерода. Предлагается решать ее путем интродукции полифункциональных штаммов бактерий, способных не только к деградации ксенобиотиков, но и к diaзотрофии и обогащению нефтезагрязненной почвы азотом.

Эффективным приемом биоремедиации является внесение в загрязненный объект микроорганизмов, устойчивых к условиям восстанавливаемых территорий и обеспечивающих значительную степень деградации нефти и нефтепродуктов. Описаны психротолерантные микроорганизмы-нефтедеструкторы, приспособленные к низким положительным температурам, благодаря применению которых была успешно произведена очистка почвы и воды и удлинена период рекультивации в условиях умеренного и холодного климата.

В настоящее время для удаления из почвы нефтяного загрязнения активно проводится изучение потенциала микробно-растительных комплексов, в основе действия которых лежит деструкция токсикантов ассоциированными с корнями растений микроорганизмами. Такие ассоциации и симбиозы, обладающие гибким метаболизмом и уникальными ферментными системами, имеют большие преимущества при выживании в неблагоприятных условиях окружающей среды. Исследования взаимного влияния поллютаната, аборигенных или интродуцированных микроорганизмов-деструкторов и растений-ремедиантов будут способствовать созданию высокоэффективных биотехнологий очистки окружающей среды от антропогенного воздействия.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 7.1. Штаммы микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, способные к окислению нефти и нефтепродуктов и образующие природный консорциум, выделенный из загрязненной дизельным топливом серой лесной почвы Республики Башкортостан.

Штамм бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1, изолированный из нефтезагрязненной почвы Туруханского района Красноярского края и обладающий деструктивной активностью по отношению к нефти, в т.ч. в условиях низкой положительной температуры.

Штамм микроорганизмов *Pseudomonas* sp. ИБ-4, выделенный из пахотных почв Республики Башкортостан, способный к антагонизму по отношению к фитопатогенным грибам, фиксации молекулярного азота и синтезу фитогормонов.

Штамм бактерий *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН (ВКМ В-2680D), продуцирующий различные биологически активные вещества.

#### 7.2. Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Углевородоокисляющие микроорганизмы выделяли на следующих средах:

среда Раймонда, (г/л):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{CaCl}_2$  – 0,01;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,02;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,5;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2,0 (Raymond, 1961);

среда Цукамуры, (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,64;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 (Сэги, 1983).

Для выделения бактерий р. *Pseudomonas* из пахотных почв использовали среду Козера, где цитрат натрия заменили на пируват натрия (г/л):  $\text{NaCl}$  – 5,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{NH}_4 \text{H}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{CH}_3(\text{CO})_2\text{Na}$  – 0,1% (Сэги, 1983).

Все штаммы УОМ выращивали и поддерживали на среде Раймонда.

Для выращивания и поддержания клеток *P. koreensis* ИБ-4 применяли среду Кинг Б, (г/л): пептон – 20; глицерин – 10;  $K_2HPO_4$  – 1,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,5 (Дзержинская, 2008).

Для выращивания и поддержания клеток микроорганизмов *P. ehimensis* ИВ 739 готовили среду К1, (г/л): крахмал – 10,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0;  $KH_2PO_4$  – 2,0;  $Na_2HPO_4$  – 2,0 (Федорова и др., 2011).

Гетеротрофные микроорганизмы и бактериальные клетки для выделения тотальной ДНК, МАЛДИ-ВП–масс-спектрометрии культивировали на питательном агаре (ПА) или питательном бульоне (ПБ), (г/л): панкреатический гидролизат кильки – 17,9 (для ПБ – 10,05);  $NaCl$  – 7,7 (для ПБ – 4,95); агар – 11,2 (Дзержинская, 2008).

Для проверки антагонистической активности использовали среду КГА (г/л): протертый картофель – 200 г; глюкоза – 20,0; агар – 18,0 (Сэги, 1983).

При определении окислительной активности применяли среду Диановой и Ворошиловой, (г/л):  $NH_4NO_3$  – 1,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $KH_2PO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,2;  $FeCl_2$  – 2 капли насыщенного раствора (Дзержинская, 2008).

При подсчете количества азотфиксирующих микроорганизмов и определении нитрогеназной активности использовали среду Эшби, (г/л): маннит – 20;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,2;  $NaCl$  – 0,2;  $K_2SO_4$  – 0,1;  $CaCO_3$  – 5 (Дзержинская, 2008)

Для анализа состава жирных кислот клеточной стенки и определения хинонов бактерии культивировали на коммерческой среде TSA (Merck, США) (г/л): пептон из казеина 15,0; пептон из сои 5,0; хлорид натрия 5,0.

### 7.3. Скрининг микроорганизмов-деструкторов углеводов

Угледородокисляющие микроорганизмы выделяли методом накопительных культур (Руководство ..., 1983).



Для выделения мезофильных УОМ 1 г серой лесной почвы Республики Башкортостан, загрязненной дизельным топливом, помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда. В качестве единственного источника углерода и энергии добавляли дизельное топливо в количестве 0,5-1% (объем.). Инкубирование проводили в лабораторном термостатируемом встряхивателе П-5.10-Э5960 при температуре 26-28°C и 160 об/мин в течение 14 сут.

Для выделения психротолерантных микроорганизмов 1 г почвы с территории нефтедобывающего предприятия на севере Красноярского края помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Цукамуры. В качестве единственного источника углерода и энергии вносили стерильную сырую нефть в количестве 1-3% (объем.). Культивирование проводили в статических условиях при температуре 4-6°C в течение 10-14 сут при периодическом встряхивании.

Рост накопительной микробной культуры устанавливали визуально по помутнению среды и с помощью микроскопа.

Штаммы УОМ выделяли из накопительных культур на агаризованной минеральной среде Раймонда, на поверхность которой наносили углеводородный субстрат – 100 мкл стерильного дизельного топлива. Культивирование микроорганизмов в чашках Петри осуществляли при температуре 26-28°C. Изолирование получившихся колоний проводили по морфолого-физиологическим признакам. Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами, такими как микроскопический контроль и посев на питательный агар.

#### **7.4. Скрининг бактерий-антагонистов фитопатогенных грибов**

Для выделения бактерий р. *Pseudomonas* применяли метод накопительных культур с использованием синтетической среды Козера с добавлением 0,1% соли пировиноградной кислоты в качестве источника углерода, который утилизируется практически всеми штаммами различных видов бактерий р. *Pseudomonas* (Смирнов, Киприанова, 1990).

1 г почвы сельскохозяйственного назначения Республики Башкортостан помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл стерильной среды Козера и культивировали в лабораторном термостатируемом встряхивателе П-5.10-Э5960 при температуре 28-30°C и 170 об/мин в течение 5 сут, после чего содержимое колб высевали на питательный агар. Изолирование получившихся колоний проводили по морфолого-физиологическим признакам. Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами – с помощью контроля под микроскопом и посевом на питательный агар.

Наличие антагонизма в отношении фитопатогенных грибов определяли методом совместного выращивания бактерий и фитопатогенов в чашках Петри. Суспензию спор тест-гриба высевали на среду КГА. Исследуемые культуры вносили уколом поверх газона гриба. Для каждого штамма делали по 5 повторностей (уколов). Чашки Петри помещали в термостат на 3 сут при температуре 28°C. Антагонистов выявляли по наличию вокруг колонии бактерии зоны подавления роста тест-гриба. Количественная оценка антагонистической активности бактерий соответствовала величине диаметра зоны ингибирования роста тест-объекта (мм).

В качестве тест-организмов для определения антигрибной активности использовали следующие микромицеты: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Fusarium avenaceum* (ВКМ 132), *Fusarium culmorum* (ВКМ 844), *Fusarium gibbosum* (ВКМ 848), *Fusarium graminearum* (ВКМ 1668), *Fusarium moniliforme* J. Sheld., *Fusarium nivale* (ВКМ 3106), *Fusarium oxysporum* (ВКМ 137), *Fusarium semitectum* (ВКМ 1938), *Fusarium solani* (ВКМ 142), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. Культуры *F. moniliforme*, *A. alternata* и *B. sorokiniana* являются местными изолятами и хранятся в коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

### **7.5. Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных культур**

Предварительную идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, физиолого-биохимическим

признакам, используя общепринятые руководства (Руководство ..., 1983; Методы общей бактериологии, 1984; Добровольская и др., 1990; Определитель бактерий Берджи, 1997; The Prokaryotes, 1992).

Морфологию клеток изучали с помощью световой фазово-контрастной микроскопии (световые микроскопы AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия) и МИКМЕД-6 (ОАО «ЛОМО», Россия)) и атомно-силовой микроскопии (сканирующий зондовый микроскоп Solver Pro-M (NT-MDT, Россия)).

Изучение особенностей углеродного питания углеводородокисляющих микроорганизмов проводили на агаризованной среде Раймонда с внесением 1% исследуемого источника углерода, а бактерий, выделенных их пахотных почв – на агаризованной среде Козера с 0,1% исследуемого источника углерода.

## **7.6. Идентификация штаммов микроорганизмов молекулярно-генетическими методами**

### **7.6.1. Выделение ДНК**

Выделение тотальной ДНК из колоний бактерий *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, *Ochrobastrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 и *Pseudomonas* sp. ИБ-4 выполняли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (АмплиСенс, Россия) согласно рекомендациям производителя.

ДНК бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 выделяли по методу, предложенному (Rivas et al., 2007). Для этого штамм выращивали на питательном бульоне в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин, а затем промывали 200 мкл водного раствора лаурилсаркозината натрия 0,1%. Потом вносили 100 мкл 0,5 М раствора NaOH, нагревали при 100°C 4 мин и добавляли 900 мкл воды. Далее центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин и собирали супернатант.

### **7.6.2. Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК**

Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК производили с использованием универсальных бактериальных праймеров:

27F (5`-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3`) и 1492R (5`-ACGGTACCTTGTTACGACTT-3`) (Lane, 1991). ПЦР была выполнена в 25 мкл смеси, состоящей из 1 × буфера для Taq-полимеразы, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ каждого dNTP, 0,4 мМ каждого праймера, 2 ед. акт. Taq-полимеразы (СибЭнзим, Россия) и 10 нг геномной ДНК, при следующих условиях: 95°C – 5 мин; далее 30 циклов, включающих – 30 с при 94°C, 30 с при 55°C и 1 мин 20 с при 72°C; затем следовала дополнительная элонгация при 72°C в течение 5 мин.

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 xL (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирования очищали с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

### 7.6.3. Определение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего β-субъединицу ДНК-гиразы (*gyrB*)

Для проведения ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена *gyrB* была использована праймерная система UP-1 и UP-2r (Yamamoto, Narayama, 1995, 1998). Для ПЦР: UP-1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA(TC)GC(TCAG)GG(TCAG)GG(TCAG)AA(AG)TT(TC)GA-3') и UP-2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC(AG)TC(TCAG)AC(AG)TC(TCAG)GC(AG)TC(TCAG)GTCAT-3'), для секвенирования: UP-1S (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3') и UP-2Sr (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3'). Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1 × буфер для ДНК-полимеразы BioTaq (17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>), по 12,5 нмоль каждого из dNTP, по 5 пмоль каждого праймера, 3 ед. акт. ДНК-полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия) и 50 нг ДНК.

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл 94°C – 9 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин; последующие 30 циклов по 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 2 мин при 72°C; завершающий цикл – 72°C в течение 7 мин. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов гена *gyrB* осуществляли с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, США) согласно прилагаемым инструкциям. Выделение и очистку продуктов секвенирования проводили с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США).

#### **7.6.4. Определение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего β-субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*)**

Аmplификацию фрагмента гена *rpoB* производили с использованием бактериальных праймеров LAPS (5'-TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT-3') и LAPS27 (5'-CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG-3') (Tayeb et al., 2005). ПЦР выполняли в 50 мкл смеси, состоящей из 1 × буфера для Taq-полимеразы, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ каждого dNTP, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. акт. Taq-полимеразы (Invitrogen, Cergy Pontoise, Франция) и 1 мкг геномной ДНК, при следующих условиях: начальная денатурация при 94°C в течение 90 с, далее 40 циклов, включающих 10 с при 94°C, 20 с при 50 или 45°C, 50 с при 72°C и заключительный этап удлинения при 72°C в течение 5 мин.

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов гена *rpoB* осуществляли с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 XL (Applied Biosystems, США) согласно прилагаемым инструкциям. Выделение и очистку продуктов секвенирования проводили с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США).

### **7.6.5. Определение нуклеотидной последовательности гена, кодирующего $\sigma$ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoD*)**

Аmplификацию фрагмента гена *rpoD* производили с использованием бактериальных праймеров PsEG30F (5'-ATYGAAATCGCCAARCG-3') и PsEG790R (5'-CGGTTGATKTCCTTGA-3') (Mulet et al., 2009). ПЦР выполняли в 50 мкл смеси, состоящей из 5 мкл ПЦР-буфера, 8 мкл каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов с концентрацией 200 мкМ, 2,5 мкл каждого праймера с концентрацией 10 мкМ, 5 ед. акт. Taq-полимеразы (Invitrogen, Cergy Pontoise, Франция) и 1 мкг геномной ДНК, при следующих условиях: начальная денатурация при 94°C в течение 5 мин, далее 30 циклов, включающих 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C, 1,5 мин при 72°C и заключительный этап элонгации при 72°C в течение 10 мин.

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов гена *rpoD* осуществляли с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 XL (Applied Biosystems, США) согласно прилагаемым инструкциям. Выделение и очистку продуктов секвенирования проводили с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США).

### **7.6.6. Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей генов**

Поиск нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемых штаммов в базе данных GenBank проводили с помощью программного пакета EzTaxon (Kim et al., 2012), а генов *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* - с использованием программ BLASTN (Altschul et al., 1990) и BLAST (Camacho et al., 2009). Для выравнивания последовательностей использовали программы CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) или CLUSTAL X (Thompson et al., 1997).

### 7.6.7. Построение дендрограмм филогенетического сходства

Дендрограммы выстраивали в программе MEGA5 (Tamura et al., 2011) методом «присоединения ближайших соседей» (Neighbor-Joining method) (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Kimura (Kimura, 1980) (для нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и объединенного древа на основе последовательностей генов *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*) и методом максимального подобия (Maximum Likelihood) (Rogers, Swofford, 1998) по модели Tamura–Nei (Tamura, Nei, 1993) (для нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*).

### 7.6.8. Определение содержания ГЦ-пар в молекуле ДНК

Содержание ГЦ-пар в составе ДНК находили с помощью кривых термической денатурации, используя саморегистрирующий спектрофотометр Pye Unicum SP1800 (Philips, Великобритания) со скоростью подогрева 0,5°C в 1 мин. Плавление проводили в растворе 0,1 SSC (1 SSC – 0,015 М раствор тризамещенного цитрата натрия в 0,15 М растворе хлорида натрия, рН 7,0). Нуклеотидный состав рассчитывали по формуле:

$ГЦ = 2,08 \cdot T_m - 106,4$ , где  $T_m$  – температура плавления ДНК в градусах (Owen et al., 1969).

### 7.6.9. ДНК-ДНК-гибридизация

Определение уровня гомологии ДНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и штамма *P. koreensis* Ps 9-14 (Т) проводили методом оптической реассоциации по Де Лею (De Ley et al, 1970). Для этого препараты ДНК в 0,1 SSC обрабатывали ультразвуком (УЗДН-1, 0,4 мА в течение 2-3 мин). До и после этой процедуры продували газообразный азот для удаления радикальных перекисей. В результате получали фрагментированную ДНК, которую вносили в кюветы спектрофотометра Pye Unicum SP1800 (Philips, Великобритания), предварительно прогретые до оптимальной температуры реассоциации, которую рассчитывали по формуле:

$$T_{op} = 0,51 ГЦ + 47,0.$$

Схема эксперимента:

a – 1-ая пробирка – раствор первого образца ДНК в 0,1 SSC в концентрации 50 мкг на 1 мл в количестве 2 мл;

b – 2-ая пробирка с 2 мл другого образца ДНК такой же концентрации;

m – смесь образцов по 1 мл каждого.

Пробирки плотно закрывали пробкой и нагревали при 100°C в течение 5 мин. В спектрофотометр помещали 3 кюветы с 0,2 мл 20 SSC при оптимальной температуре реассоциации, затем в них добавляли образцы, перемешивали и реассоциировали на чувствительной шкале в течение 40-50 мин. Затем рассчитывали V – скорость реассоциации за 30 мин. Первые 10 мин отбрасывали, т.е. скорость за 1 мин должна быть в диапазоне 10-40 мин. Сходство в полинуклеотидных последовательностях ДНК определяли по формуле (%):

$$D = \frac{4V_m - V_a - V_b}{2 \sqrt{V_a \times V_b}} \times 100$$

где D – гомология ДНК в процентах, V<sub>a</sub> – скорость реассоциации образца a, V<sub>b</sub> – скорость реассоциации образца b, V<sub>m</sub> – скорость реассоциация смеси двух ДНК в эквимольном соотношении.

ДНК-ДНК-гибридизацию для штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и 8 штаммов, представляющих другие виды р. *Pseudomonas* проводили по методу Езаки (Ezaki et al., 1989) согласно рекомендациям Виллемс (Willems et al., 2001). ДНК нековалентно адсорбировали на полистирольных микропланшетах при 30°C в течение 4 ч в гибридной печи ShelLab 1004 (Sheldon, США). Затем планшеты промывали один раз 300 мкл раствора PBS (8 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1-5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 137 мМ NaCl, 2-7 мМ KCl, 0-1 М MgCl<sub>2</sub>) на лунку, сушили при 45°C в течение 15 мин. ДНК-зонд получали путем смешивания ДНК-раствора в 0,1 SSC и 10 мкл фотобиотинового раствора (Sigma, США) и освещали смесь в течение 30 мин при 400 Вт ртутной лампой. Меченый ДНК-зонд разбавляли добавлением 185 мкл 0,1 М Трис-НСl (pH 9,0), а оставшийся свободный фотобиотин удаляли двойной экстракцией 200 мкл 1-бутанолом, насыщенным 0,1 М Трис-НСl (pH 9,0). Потом в каждую лунку добавляли раствор стрептавидина (авидин) (Gibco, США), который



образует нерастворимый комплекс биотин–авидин и ДНК-зонд. Микропланшет инкубировали в течение 10 мин при 37°C. Затем пластину промывали три раза 300 мкл 1 SSC на лунку. Продукт реакции, 4-метилумбеллиферон (возбуждение максимум 360 нм, излучение до 465 нм), определяли количественно с использованием системы HTS 7000 BioAssay Reader (Perkin Elmer, США) в моменты времени 0, 15, 30 и 45 мин. Значения реассоциации рассчитывали с использованием значений флуоресценции при 30 мин и гомологичную реакцию рассматривали как представляющую 100% повторную ассоциацию.

## **7.7. Идентификация штаммов микроорганизмов хемотаксономическими методами**

### **7.7.1. Анализ жирных кислот клеточной стенки**

Пробу сухой биомассы клеток (3-5 мг) *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 или *Pseudomonas* sp. ИБ-4, выращенных на среде TSA, обрабатывали в 0,4 мл 1,2 н соляной кислоты в метаноле при 80°C в течение 1 ч. Образовавшиеся при метанолизе метиловые эфиры жирных кислот и другие липидные компоненты экстрагировали гексаном. Последний упаривали, а сухой остаток силилировали в 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА) 15 мин при 80°C для получения триметилсилильных эфиров оксикислот и разбавляли гексаном до 100 мкл. Для анализа 1 мкл смеси вводили в инжектор системы газовый хроматограф–масс-спектрометр AT-5850/5973 (Agilent Technologies, США). Квадрупольный масс-спектрометр имеет разрешающую способность 0,5 атомных единиц масс (а.е.м.), рабочий диапазон (2-950 а.е.м.). Ионизация электронами 70 эВ. Чувствительность прибора по метилстеарату составляет 0,01 нг. Для хроматографического разделения пробы использовали капиллярную колонку из плавленого кварца длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм. Хроматографирование проводили в режиме программирования температуры от 140 до 320°C со скоростью 7°C в 1 мин. Температура инжектора и интерфейса составляла 280°C. Данные обрабатывали с помощью штатных программ прибора. Вещества в хроматографических пиках

идентифицировали с помощью библиотечных программ базы данных масс-спектров Национального института стандартов и технологий (США) (<http://webbook.nist.gov/chemistry>).

Состав жирных кислот клеточной стенки штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 определяли с помощью идентификационной системы Sherlock 6.1 (MIDI; Microbial ID) и библиотеки спектров RTSBA6 в соответствии с техническими инструкциями этой системы.

### **7.7.2. Определение состава изопреноидных хинонов**

Состав клеточных хинонов изучали по методу Коллинза (Collins, 1981, 1985). Прямую экстракцию лиофилизированных клеток (50-100 мг) дважды проводили малым объемом (25 мл) смеси хлороформ-метанол 2:1 в течение 2 ч на магнитной мешалке. Фильтрат упаривали и хроматографировали на пластинке с силикагелем в системе гексан-диэтиловый эфир 85:15. Полосу, поглощающую в УФ-свете, счищали и экстрагировали хлороформом. В таких условиях тонкослойной хроматографии менахиноны имели подвижность приблизительно 0,7, убихиноны – 0,3. Масс-спектры регистрировали при химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (Thermo Finnigan, Германия) используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца.

### **7.7.3. Изучение профиля клеточных белков**

Анализ белковой фракции бактериальных клеток проводили с помощью матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. Для этого клетки одной колонии переносили на стальную пластинку-мишень, смешивали с 0,5 мкл раствора матрицы ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота в 50%-ном водном растворе ацетонитрила, содержавшем 2% трифторуксусной кислоты) и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Спектры регистрировали в линейном режиме с задержанной экстракцией ионов на приборе Autoflex Speed

(Bruker Daltonics, Германия), оснащенном времяпролетным анализатором (время задержки – 350 нс, ускоряющее напряжение – 20 кВ). Запись спектров проводили в режиме положительных ионов (регистрируемые массы составляли 2-20 кДа). Внешнюю калибровку прибора осуществляли по смеси белков Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics); разрешение спектров составило  $\pm 2$  Да. Результирующие спектры каждого препарата штамма получали суммированием спектров, зарегистрированных в 10-15 точках анализируемых препаратов при 500 ударах лазера. Таксономическую принадлежность штамма определяли с помощью программы Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics).

### 7.8. Исследование окислительной активности

Окислительную активность микроорганизмов оценивали по конечному продукту реакции, т.е. по количеству углекислого газа, образованного в результате окисления углеводов.

Для этого в колбу с 250 мл среды Диановой и Ворошиловой вносили 1% (2,5 мл) источника углерода и 5 мл трехсуточной культуры микроорганизмов консорциума (или чистой культуры микроорганизмов, входящих в состав консорциума) с содержанием клеток  $1,0 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. В герметично закрытые колбы компрессором-дозатором со скоростью 520 мл/мин подавали стерильный воздух, который после окисления субстрата улавливали поглотителем углекислого газа (200 мл 0,1 н NaOH). Из сосудов посуточно отбирали аликвоту в количестве 10 мл, к которой добавляли 2-3 капли фенолфталеина и титровали 0,1 н. раствором соляной кислоты до обесцвечивания раствора. Затем прибавляли 2 капли метилового оранжевого и титровали при энергичном перемешивании 0,1 н. раствором соляной кислоты до перехода желтой окраски в оранжевую. В качестве контроля использовали образец с реактивами, нефтепродуктами, но без микроорганизмов. Продолжительность эксперимента – 3 суток.

Окислительную активность (А) рассчитывали по количеству углекислого газа, оттитрованного кислотой и выражали в мг  $\text{CO}_2$  на 1 г источника углерода.

Использовали следующую формулу:

$$A = 1/m \times V_{\text{щ}}/V_{\text{пр}} \times 0,0044 \times 1000 \times \sum_{j=1 \dots 3} (X_j - X_k),$$

где  $m$  – масса внесенного источника углерода, г,

$j$  – сутки эксперимента, 1-3,

$V_{\text{щ}}$  – объем 0,1 н NaOH, мл,

$V_{\text{пр}}$  – объем аликвоты пробы, взятой на титрование, мл,

$X_j$  – объем раствора HCl с концентрацией 0,1 моль/л, израсходованный на титрование пробы в присутствии метилового оранжевого, мл,

$X_k$  – объем раствора HCl с концентрацией 0,1 моль/л, израсходованный на титрование контрольного образца в присутствии фенолфталеина, мл,

0,0044 – масса углекислого газа, соответствующая 1 мл раствора HCl с концентрацией 0,1 моль/л, г.

За результат анализа окислительной активности принимали среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает допускаемое расхождение в 1%.

## 7.9. Определение способности к фиксации атмосферного азота

### 7.9.1. Оценка нитрогеназной активности

Способность бактерий к фиксации атмосферного азота определяли ацетиленовым методом (Умаров, 1986), основанном на способности фермента нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена в количестве, пропорциональном количеству азота, которое может быть восстановлено в тех же условиях. Микроорганизмы культивировали 2 сут на среде Эшби при комнатной температуре (26°C) и в условиях низкой положительной температуры (8°C). Для проверки влияния источника углерода на способность к азотфиксации, маннит в среде Эшби в других вариантах опыта был заменен на декан (0,5%), метилбензол (1%) и 2-метилнафталин (0,5%). Ацетилен вводили в колбы ( $V=250$  мл) со 100 мл бактериальной суспензии до концентрации 10% (объем.) и перемешивали при 180 об/мин без доступа воздуха. Через 1,5 часа отбирали шприцем пробы газа (1 мл) из каждой колбы в трехкратной повторности. Содержание ацетилена и этилена

определяли на газовом хроматографе «Кристалл Люкс 4000» (Россия) с пламенным ионизационным детектором (длина колонки 3 м, сорбент – Porapak Q, стандартный газ – азот). Объем вводимой газовой пробы – 1 мл. Количество этилена и ацетилену рассчитывали по калибровочной кривой.

### **7.9.2. Выявление потенциальной активности азотфиксации в почве**

Потенциальную активность азотфиксации в почве (чернозем выщелоченный) рассчитывали по Умарову (Теппер, 2004) с нашими модификациями. В почвенные пробы массой 200 г вносили по 10 мл бактериальной суспензии с титром  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, увлажняли до 60% полной влагоемкости почвы, тщательно перемешивали. После трех суток инкубации в термостате при 28°C из каждого образца отбирали в пенициллиновые флаконы по 5 г почвы, добавляли по 2% (от массы абсолютно сухой почвы) источника углерода (маннит (контроль), декан, метилбензол и 2-метилнафталин соответственно), увлажняли до 60% полной влагоемкости почвы, перемешивали, герметично закупоривали, чтобы предотвратить улетучивание углеводородов и хранили одну часть проб в холодильнике при 8°C, а вторую часть проб – в термостате при 26°C. Через сутки во флаконы вводили по 0,5 мл ацетилену и спустя час отбирали газовую пробу (0,5 мл) для анализа на газовом хроматографе. Параллельно проводили контрольное определение на восстановление ацетилену до этилену во флаконе с 5 мл воды при отсутствии почвы. Расчет величины активности азотфиксации производили, исходя из того, что соотношение между количеством образованного этилену и соответствующим количеством азота составляет 3:1, т. е. результат, полученный для этилену делили на 3.

### **7.10. Исследование поверхностно-активных свойств**

Способность к синтезу ПАВ у бактерий оценивали по снижению поверхностного натяжения и проявлению эмульгирующей активности жидкой культуры и ее супернатанта в процессе роста на минимальной жидкой среде с

гидрофобным источником углерода (Willumsen, Karlson, 1997; Волченко, 2006). Микроорганизмы выращивали на минеральной среде Раймонда с 1% (объем.) гексадеканом в лабораторном термостатируемом встряхивателе П-5.10-Э5960 при температуре 28°C и 160 об/мин в течение 5 сут. Супернатант культуральной жидкости получали ее центрифугированием при 7000 g в течение 10 мин.

### **7.10.1. Поверхностное натяжение**

Значение поверхностного натяжения является качественным показателем, свидетельствующем о наличии ПАВ в культуральной жидкости. Измерение поверхностного натяжения ( $\sigma$ , мН/м) супернатанта проводили на полуавтоматическом тензиометре (LAUDA TD1C, Германия) методом отрыва платиново-иридиевого кольца (метод Дю Нуи) при 20°C. Перед испытанием супернатант культуральной жидкости отмывали гексаном от остатков гексадекана, который обладает поверхностно-активными свойствами и существенно снижает реальное значение поверхностного натяжения. В качестве контроля использовали чистую минеральную среду Раймонда.

### **7.10.2. Индекс эмульгирования**

Эмульгирующую активность определяли по методу Купера и Голденберга (Cooper, Goldenberg, 1987) встряхиванием в пробирке 4 мл культуральной жидкости с 4 мл эмульгируемого субстрата (подсолнечное масло, бензин, дизельное топливо, смазочное масло) в течение 10 мин с последующим отстаиванием при комнатной температуре в течение 24 ч для разделения водной и углеводородной фаз. После этого рассчитывали индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости пробирке (%).

### **7.11. Изучение способности к синтезу фитогормональных веществ**

Определение фитогормональной активности проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), основанном на способности культуральной жидкости микроорганизмов реагировать с антителами к индолил-3-уксусной кислоте (ИУК) и цитокинину зеатину (Кудоярова и др., 1986, 1990). В ходе исследований использовалась трехсуточная культуральная жидкость штаммов, полученная на питательном бульоне. Результаты подтверждали тестом на разведение (т.е. когда степень разведения не влияет на результаты анализа) и представляли в виде количества (нг) соответствующего гормона в 1 мл культуральной жидкости.

### **7.12. Определение токсических свойств чистых культур микроорганизмов**

Фитотоксичность изучаемых штаммов бактерий проверяли на семенах горчицы белой (*Sinapis alba*, сорт «Рапсодия»). Для этого отфильтрованную культуральную жидкость наливали в стаканчики на 100 мл и замачивали в каждом по 30 семян в течение 24 ч. Для контроля семена замачивали на тот же срок в водопроводной воде и стерильной питательной среде. Далее семена помещали на чашки Петри с увлажненной ватой, поверх которой накладывали фильтровальную бумагу, и при их подсыхании дополнительно увлажняли равным количеством водопроводной воды. Для определения токсичности через 3-4 дня подсчитывали количество проросших семян, а для установления способности к стимуляции роста растений измеряли длину проростков и корней.

Токсичными считали культуры микроорганизмов, вызывающие либо снижение всхожести семян, либо угнетение развития проростков и корней более чем на 30% по сравнению с контролем (Зенова и др., 2002).

### **7.13. Определение эффективности процесса биодеструкции нефти и нефтепродуктов**

С целью оценки результативности процесса разложения углеводородов в почве контролировали содержание нефтепродуктов, степень их деструкции и численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп.

#### **7.13.1. Измерение массовой концентрации нефтепродуктов в почве**

Содержание нефтепродуктов в почве и грунте определяли гравиметрическим методом в соответствии с ПНД Ф 16.1.41–04 (ПНД Ф ..., 2004) и выражали в процентах.

#### **7.13.2. Определение численности микроорганизмов основных эколого-трофических групп**

Численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп определяли посевом почвенной суспензии на твердые селективные питательные среды. Для гетеротрофных микроорганизмов – на питательный агар, для азотфиксирующих микроорганизмов – на среду Эшби, для углеводородокисляющих бактерий – на среду Раймонда с добавлением дизельного топлива или нефти в качестве единственного источника углерода и энергии.

#### **7.13.3. Степень деструкции нефтепродуктов**

Степень деструкции нефтепродуктов рассчитывали по формуле

$$(1 - C/C_0) \cdot 100, \text{ где}$$

$C$  – конечная концентрация нефтепродуктов, мг/л;

$C_0$  – исходная концентрация нефтепродуктов, мг/л

и выражали в процентах.



#### **7.14. Определение фитотоксичности отбеливающей глины**

Навеску отбеливающей глины массой 60 г (опыт проводили нестерильно), тщательно перемешивали, увлажняли водой до состояния густой пасты и равномерно распределяли по чашке Петри. На ее поверхность помещали 30 семян редиса (*Raphanus sativum*, сорт «Красный с белым кончиком»), предварительно замоченных в водопроводной воде на 24 ч. Контрольные семена раскладывали на увлажненной вате, покрытой фильтровальной бумагой. Семена проращивали в течение 5-7 дней при постоянной температуре во влажной камере. Опыт проводили в трех повторностях.

Степень токсичности отбеливающей глины определяли по разнице в количестве проросших семян в опыте и контроле (%). Токсичной считали отбеливающую глину, которая вызывала угнетение прорастания семян на 20-30% и более (Зенова и др., 2002).

#### **7.15. Лабораторные опыты по проверке эффективности применения изучаемых микроорганизмов для очистки от загрязнения нефтью и нефтепродуктами**

##### **7.15.1. Очистка сточной воды, содержащей нефтепродукты, с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

##### **7.15.1.1. Исследование возможности роста консорциума микроорганизмов на отдельных компонентах загрязнителя, присутствующих в сточной воде**

В чашки Петри с агаризованной средой Раймонда вносили по 0,1 мл одного из загрязняющих компонентов сточной воды как единственный источник углерода и по 0,1 мл культуральной жидкости консорциума микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (титр клеток  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл). Чашки помещали в термостат при 37°C на 5 сут. В качестве контроля использовали чашки без добавления источника углерода. Возможность

утилизации каждого компонента сточной воды определяли визуально по наличию или отсутствию роста микроорганизмов.

#### **7.15.1.2. Изучение эффективности процесса очистки сточной воды**

Опыт проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с минеральной средой Раймонда и сточной водой (1% масс.), куда вносили трехсуточную культуру консорциума микроорганизмов (титр  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл) и выращивали на лабораторной термостатируемой установке УВМТ-12-250 при скорости вращения 180 об/мин и  $28^\circ\text{C}$  в течение 15 сут. Общий объем системы 100 мл. В ходе эксперимента контролировали содержание нефтепродуктов и численность углеводородокисляющих микроорганизмов. В качестве контроля использовали образцы без внесения бактерий.

#### **7.15.1.3. Измерение массовой концентрации нефтепродуктов в сточной воде**

Массовую концентрацию нефтепродуктов определяли с помощью экстракции хлористым метиленом. В делительную воронку вместимостью 250 мл помещали 50 мл анализируемой пробы, добавляли 50 мл раствора хлористого метилена. Смесь энергично встряхивали 5 мин и затем отстаивали 20-30 мин до полного расслоения жидкости. Экстракт сливали в фарфоровые чашки и упаривали на водяной бане при  $80^\circ\text{C}$ . После испарения жидкости чашки взвешивали. Массу загрязняющих веществ находили по разнице массы пустых чашек и чашек с образцами.

#### **7.15.2. Биоремедиация грунтов, загрязненных нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов**

##### ***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

Объектом исследования служили образцы грунта месторождений Жетыбай и Каламкас (Республика Казахстан), загрязненные нефтью, содержание которой составляло 44,35% и 18,26% соответственно. Нефть месторождения Жетыбай

имеет следующие характеристики: плотность – 0,85-0,86 г/см<sup>3</sup>, содержание серы – 0,2-0,28% (малосернистая), смол – 4,53-15,5% (смолистая), парафинов – 17,2-25% (высокопарафинистая), асфальтенов – 0,9-3,4%. Нефть месторождения Каламкас имеет плотность 0,902-0,914 кг/м<sup>3</sup>, содержит серу – 0,1-0,3% (малосернистая), смолы – 20-33% (высокосмолистая), асфальтены – 3-5,5%. С учетом высокой концентрации загрязнителя, грунт месторождения Жетыбай перемешивали со стерильным песком в соотношениях 1:1 или 1:3, а образцы с территории месторождения Каламкас – в соотношении 1:1.

Эксперимент проводили в сосудах объемом 3 л, в которые помещали по 1 кг грунта или грунта, смешанного с песком. Влажность в течение всего срока инкубации поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости грунта, температуру – 20-25°C. Отбор почвенных проб осуществляли через каждые 14 сут. Длительность эксперимента – 42 сут. Консорциум микроорганизмов вносили дважды (в начале опыта и на 28-ые сут) в дозе  $2 \cdot 10^8$  КОЕ/г грунта. В качестве источника биогенного азота, фосфора и калия использовали комплексное минеральное удобрение «Нитроаммофоска» (ОАО «Невинномысский Азот», Россия, ТУ 113-08-10253378-02-96) в количестве 0,25 г/г нефтепродукта.

### **7.15.3. Очистка песка, загрязненного нефтью, штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>**

В пластиковые сосуды объемом 1 л помещали по 500 г песка, отобранного в окрестностях г. Жанаозен (Мангистауская обл., Республика Казахстан), в который вносили нефть месторождения Узень (Республика Казахстан) (плотность 0,864 г/см<sup>3</sup>, содержание серы – 0,18 %, парафинов – 19,3 %, смол – 20%) в концентрации 5 или 15% (50 и 150 г/кг) и 100 мл суспензии штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> с титром  $2,2 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Интродукцию бактерий осуществляли 1 раз в месяц, после чего модельную смесь тщательно перемешивали. Культивирование проводили при 4-8°C в течение 6 мес. Контролем служил песок, загрязненный нефтью, но не обработанный микроорганизмами. Опыт проводили в трех повторностях.

#### 7.15.4. Проверка способности комбинаций микроорганизмов с различной функциональной активностью к деструкции нефти и стимуляции роста и развития растений

В модельном эксперименте использовали чернозем глинисто-иллювиальный (общий гумус – 4,2%; общий азот – 0,5%; подвижный фосфор – 5,6 мг/100 г почвы, рН водной вытяжки – 6,3), который помещали по 3 кг в вегетационные сосуды объемом 5 л и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. В почву вносили нефть Туймазинского месторождения (плотность – 0,83 г/см<sup>3</sup> (легкая), содержание серы – 2,0% (малосернистая)), в количестве 3 или 6% (масс.) после чего инокулировали суспензией микроорганизмов (с титром  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл каждая) в объеме 10 мл/кг, поливали водой и тщательно перемешивали. Использовали следующие суспензии: консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; комбинация 3-х штаммов (клетки микроорганизмов консорциума и *P. koreensis* ИБ-4 в соотношении 1:1); комбинация 4-х штаммов (клетки микроорганизмов консорциума, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 в соотношении 1:1:1). Через 2 сут сажали предварительно замоченные в водопроводной воде семена овса посевного (*Avena sativa* L.) – 30 шт. на сосуд. Эксперимент проводили при комнатной температуре (22-26°C) в условиях естественной освещенности на протяжении 42 сут, осуществляя регулярный полив. Перед началом испытания и через каждые 3 недели определяли численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп в почве. На 21 сут измеряли высоту побегов. В конце опыта растения извлекали вместе с почвенным монолитом, отмывали корневую систему, сушили, а затем оценивали массу надземной части побега и корней. Каждый вариант закладывали в трех повторностях.

Схема опыта:

1. Почва + овес;
2. Почва + нефть (3%);
3. Почва + нефть (6%);
4. Почва + нефть (3%) + овес;

5. Почва + нефть (6%) + овес;
6. Почва + нефть (3%) + овес + консорциум микроорганизмов;
7. Почва + нефть (6%) + овес + консорциум микроорганизмов;
8. Почва + нефть (3%) + овес + комбинация 3-х штаммов;
9. Почва + нефть (6%) + овес + комбинация 3-х штаммов;
10. Почва + нефть (3%) + овес + комбинация 4-х штаммов;
11. Почва + нефть (6%) + овес + комбинация 4-х штаммов.

## **7.16. Полевые испытания технологий очистки почв, грунтов, водной поверхности от нефтяного загрязнения, а также обезвреживания нефтесодержащих отходов**

### **7.16.1. Обезвреживание нефтешлама с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

Промышленные испытания по обезвреживанию нефтешлама проводили на территории газонефтяного месторождения Каражанбас (Республика Казахстан) с 15 августа по 15 ноября 2013 г. Рекультивации с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 было подвергнуто 5 тыс. м<sup>3</sup> нефтешлама со средним содержанием нефтепродуктов 10,47%, складированного на участке с размерами 120 м × 35 м. Высота загрузки составляла приблизительно 0,40 м. Предварительно однократно вносили комплексное минеральное удобрение «Азофоска» (НРК) марки 15:15:15 (ОАО "ММУ", г. Мелеуз, Россия, по ТУ 2186-682-00209438-06) (0,26 кг/м<sup>3</sup> нефтяного шлама). До и после этого на участке проводили рыхление и вспашку. Консорциум применяли один раз в дозе 0,056 кг/м<sup>3</sup> нефтешлама. Для этого каждые 5 кг сухой формы биопрепарата и 0,5 кг минерального удобрения разводили в 1000 л технической воды, перемешивали и добавляли 1 л дизельного топлива для обеспечения бездефицитного питания, необходимого для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов, потом осуществляли полив методом дождевания этим раствором. В ходе биорекультивации регулярно производили

вспашку трактором «Беларусь» (1 раз в неделю) и выполняли частый полив (через 1-2 дня) в связи с засушливой погодой.

Пробы отбирались методом «конверта» в количестве 1 кг каждая. Контролем служили образцы нефтешлама, не обработанные консорциумом микроорганизмов.

#### **7.16.2. Очистка почвы от нефти в условиях низких положительных температур штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>**

Эксперимент по очистке почвы (глево-подзолистая, слой гумуса около 8 см, содержание органического вещества 52%, азота 2,1%) от свежего разлива нефти (плотность – 0,864-0,886 г/см<sup>3</sup>, содержание серы – 0,53-0,66%, парафинов – 2,40-3,03%, смол – 5,34-14,09%, асфальтенов – 0,68-3,12%) проводили на территории Барсуковского месторождения (Пуровский район Ямало-Ненецкого автономного округа) с 22 августа по 21 сентября 2012 г. На ровном обводненном участке площадью в 1,0 га с содержанием нефти 4,88% осуществляли обработку спецтехникой, внесение комплексного минерального удобрения «Нитроаммофоска» (НРК) марки 16:16:16 (АО «Минудобрения», г. Россошь, Россия, по ТУ 2186-030-00206486-2009) и биогенной добавки (дрожжевой автолизат), после чего его разделили на две равные части, одну из которых обработали 1000 л суспензии микроорганизмов психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> с титром  $2,0 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. В период испытания температура воздуха колебалась в интервале от 0 до 9°C.

#### **7.16.3. Биорекультивация нефтезагрязненной отбеливающей глины с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>**

Эксперимент проводили на полигоне промышленных отходов ОАО «Орскнефтеоргсинтез», расположенной в Гайском районе Оренбургской области. Свалка представляет собой дополнительно отчужденные огражденные территории общей площадью 35,4 га. Размер участка, отведенного под

неутилизируемые отходы, содержащие сырую нефть и нефтепродукты, составляет 13,5 га, из которых 6 га выделено под складирование нефтезагрязненной (отработанной) отбеливающей глины, которая применяется в качестве тонкодисперсного природного адсорбента в процессе контактной доочистки масел.

Для опыта были выбраны два одинаковых по площади, относительно ровных по рельефу и относительно однородных по содержанию загрязнителя участка с отвалами отработанной отбеливающей глины. Их очищали от мусора, рыхлили, выравнивали с помощью мотокультиватора «Урал» и разбивали на 9 делянок каждый (по три повторности на каждый вариант опыта, включая контроль без интродукции микроорганизмов). Размер делянок 1 м x 1 м, расстояние между ними около 0,5 м, расположение рандомизированное, удаление от границ участка не менее чем на 0,5 м. Среднее содержание нефтепродуктов (по массе) на первом участке составляло 7,12%, на втором – 22,76%. Низкая степень загрязнения на первом участке связана с тем, что несколькими годами ранее его уже подвергали рекультивации (туда в качестве разбавителя вносили активный ил биологических очистных сооружений ОАО «Орнефтеоргсинтез»). Каждую делянку обрабатывали 1 л бактериальной суспензии с концентрацией  $1 \cdot 10^8$  клеток/мл, содержащей или консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>.

Продолжительность опыта – с июня 2013 г. по июль 2014 г. Пробы грунта отбирали методом «конверта» в количестве 100 г непосредственно перед каждым внесением микроорганизмов (26.06.2013, 08.08.2013, 02.10.2013) и еще три раза дополнительно (10.07.2013, 13.11.2013 и 16.07.2014).

Перед началом эксперимента на обоих участках титр гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов составлял менее  $10^4$  КОЕ/г, а азотфиксирующих микроорганизмов – менее  $10^3$  КОЕ/г.

До начала и после окончания эксперимента проверяли степень фитотоксичности отбеливающей глины.

Для обеспечения микроорганизмов доступным кислородом и активизации микробного разложения углеводов участки периодически рыхлили. Лето 2013 г. было дождливым, поэтому дополнительный полив в ходе эксперимента не производили.

**7.16.4. Биорекультивация почвы после нефтяного разлива с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>**

Эксперимент проводили на месте нефтяного разлива годичной давности в Нефтеюганском районе ХМАО – Югры (Мамонтовское месторождение). Территория представляет собой заросшее лесом болото, лесная подстилка представлена в основном неперегнившим мхом, почва подзолистая, торфянистый горизонт расположен близко к поверхности. Непосредственно после порыва трубопровода летом 2012 г. верхний слой нефти (плотность – 0,871-0,885 г/см<sup>3</sup>, содержание серы – 1,2-1,5%, парафина – 2,9-3,8%, смол – 7,6-9,1%, асфальтенов – 2,2-3,1%) был собран механическим способом, после чего произвели вспашку трактором. Через год, в конце августа 2013 г., на упомянутой территории наметили относительно ровный по рельефу участок, который очистили от мусора, мёртвой растительности и перекопали вручную. Содержание органического вещества в почве составило 54%, азота – 2,8%, степень загрязнения нефтью очень высокая – в среднем 70,3%. На этой площади разбили 9 делянок (по три повторности на каждый вариант опыта, включая контроль без обработки микроорганизмами). Размеры делянок 1 м x 1 м, расстояние между ними 1 м, расположение рандомизированное, удаление от границ участка не менее, чем на 1 м. Каждую опытную делянку однократно обработали 1 л бактериальной суспензии с титром  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, содержащей или консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, потом произвели полив и рыхление. В дальнейшем никаких рекультивационных мероприятий не осуществляли. Продолжительность эксперимента – с сентября 2013 г. по июнь 2015 г.



### **7.16.5. Очистка водной поверхности, загрязненной нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов**

#### ***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

После аварии в мае 2015 г. содержание нефти в непроточном болоте площадью 400 м<sup>2</sup> и глубиной 1-1,2 м на территории Барсуковского месторождения (Пуровский район ЯНАО) составило 14,58%. Нефть имела следующие характеристики: плотность – 0,864-0,886 г/см<sup>3</sup>, содержание серы – 0,53-0,66%, парафинов – 2,40-3,03%, смол – 5,34-14,09%, асфальтенов – 0,68-3,12%. Для очистки объекта 4 л суспензии консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с титром  $1,8 \cdot 10^8$  КОЕ/мл разводили в 100 л водопроводной воды и помпой равномерно наносили (разбрызгивали) на поверхность водоема. После этого производили аэрирование водного объекта путем принудительного забора воды при помощи насоса со скоростью 20 м<sup>3</sup>/час, которую затем подавали через систему трубопроводов на поверхность загрязненной пленкой нефти болота. Дневная температура при проведении рекультивации была 14-20°C.

Содержание нефти в воде определяли гравиметрическим методом согласно ПНД Ф 14.1:2.116-97 (ПНД Ф ..., 1997) и выражали в процентах.

### **7.17. Статистические методы обработки результатов исследований**

Обработка результатов проводилась стандартными общепринятыми методами математической статистики. Оценку разброса данных в экспериментах проводили подсчетом средних величин и среднего квадратичного отклонения для выявления доверительного интервала при 95%-ном уровне значимости. Вычисления проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2003.

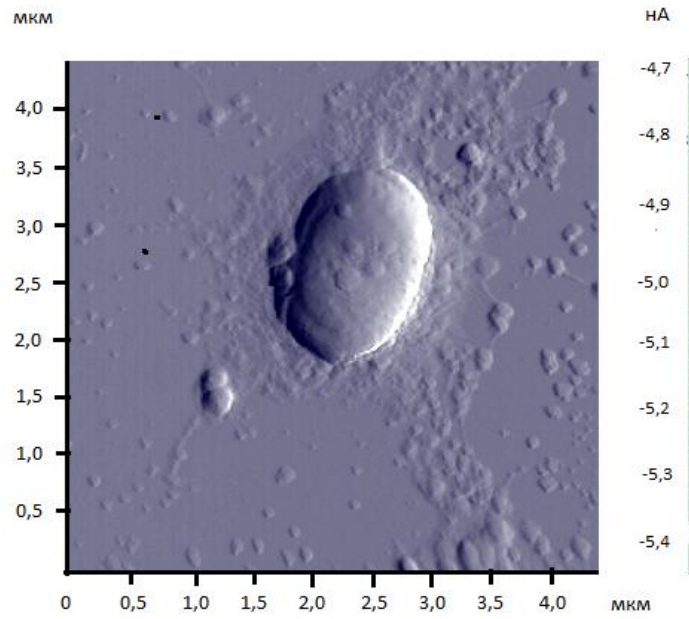
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### ГЛАВА 8. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

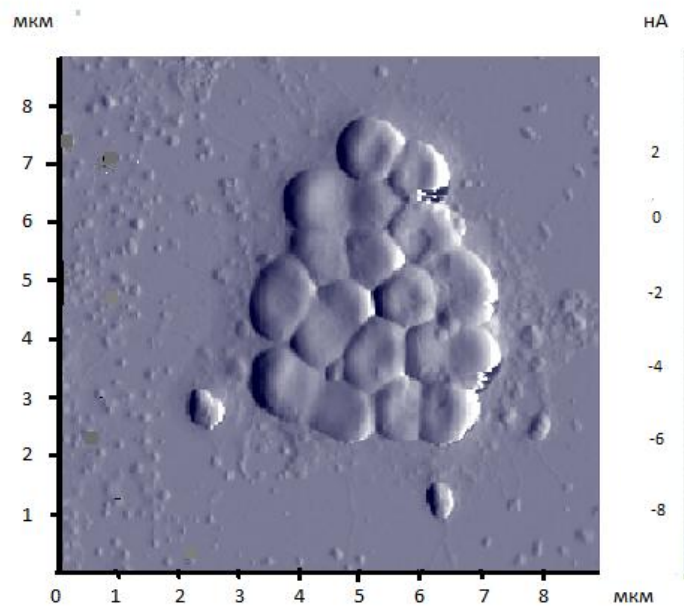
#### 8.1. Описание микроорганизмов консорциума

##### 8.1.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого- биохимические свойства микроорганизмов консорциума

Из загрязненной дизельным топливом серой лесной почвы Республики Башкортостан выделено 48 изолятов микроорганизмов, способных к росту и разложению нефти в жидкой среде. Среди них наибольшей активностью обладал образец ИБ ДТ-5, представляющий собой природный консорциум из двух штаммов. В результате изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств они были предварительно отнесены к родам *Acinetobacter* и *Ochrobactrum* (*Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2). Количественное содержание каждого из штаммов микроорганизмов, входящих в состав консорциума, составляло в культуральной жидкости порядка  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл (1:1) и не изменялось при длительном хранении. Фотографии клеток микроорганизмов консорциума представлены на рисунках 8.1 и 8.2.

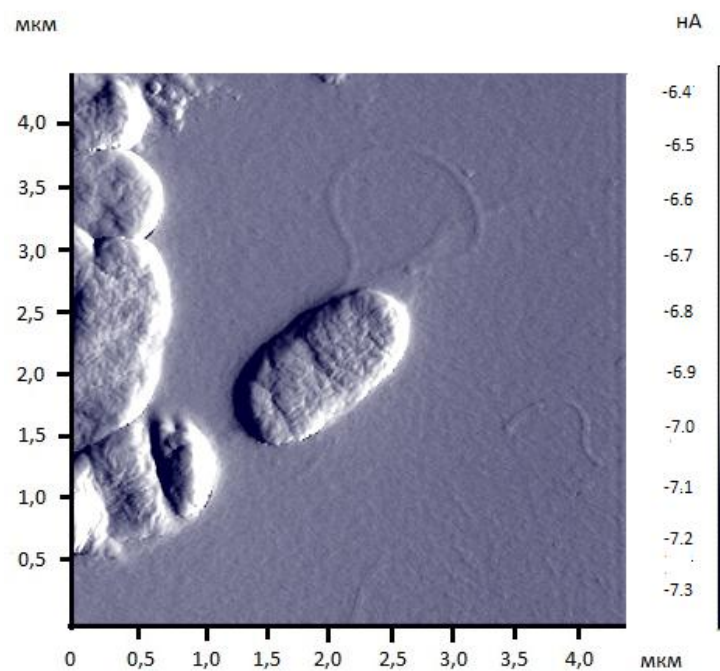


А)

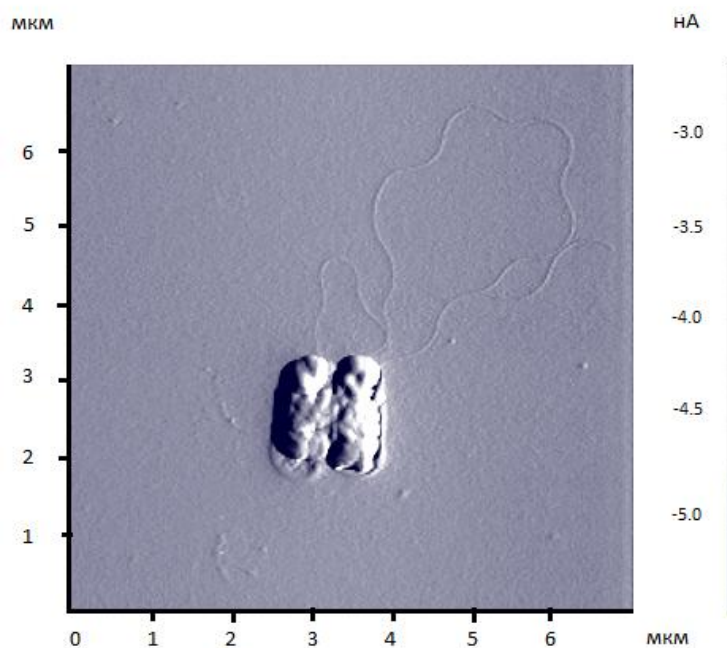


Б)

Рисунок 8.1. – Клетки штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1. А) одиночная клетка; Б) скопление клеток (сканирующая зондовая микроскопия)



А)



Б)

Рисунок 8.2 – Клетки штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2. А) одиночная клетка; Б) двойные клетки (сканирующая зондовая микроскопия)

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов, составляющих консорциум, представлены в таблице 8.1.

Таблица 8.1 – Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов консорциума

Признак	<i>Acinetobacter</i> sp. ИБ ДТ-5.1/1	<i>Ochrobactrum</i> sp. ИБ ДТ-5.3/2
Морфология клеток	Неподвижные толстые, короткие палочки, часто встречаются кокковидные одиночные или сдвоенные формы, иногда в скоплениях, 0,7-1,5 x 0,7-1,0 мкм	Короткие палочки, по мере старения культуры укорачивающиеся до кокков, одиночные, иногда в скоплениях, окруженные слизью, 1,2-1,3 x 0,5 мкм
Колонии на плотных питательных средах	<u>Белые, круглые, плоские, гладкие, блестящие, с ровными краями, профиль равномерно возвышающийся</u>	Бесцветные, круглые, плоские, гладкие, матовые, с ровными краями, по краям менее плотные чем в центре
Жгутики	–	1-3 жгутика
Клеточная стенка	Гр(-)	Гр(-)
Отношение к O <sub>2</sub>	Аэроб	Аэроб
Каталаза/оксидаза	+/-	+/+
Гидролиз: желатин	–	–
крахмал	–	–
казеин	–	–
твин 20	+	+
мочевина	+	+
Окисление лактозы с образованием: H <sub>2</sub> S, индола, 3-кетолактозы	– – –	– – –
Потребление цитрата, малоната	+ +	+ +
pH	4,6-8,6, оптимум 6,8-7,8	4,3-8,6, оптимум 5,8-7,8
Температура	8-42°C, оптимум 26-28°C	8-42°C, оптимум 26-28°C
NaCl	не более 3%	не более 2,5%

Примечание: «+» – наличие признака, «-» – отсутствие признака.

В качестве единственного источника углерода и энергии используют различные углеводы, спирты, аминокислоты. Утилизируют разнообразные органические вещества: нефть, дизельное топливо, углеводороды различных классов и их производные (табл. 8.2).

Таблица 8.2 – Органические соединения, утилизируемые микроорганизмами консорциума

Субстраты	<i>Acinetobacter</i> sp. ИБ ДТ-5.1/1	<i>Ochrobactrum</i> sp. ИБ ДТ-5.3/2
D-глюкоза	+	+
D-лактоза	+	–
L-рамноза	+	+
D-рафиноза	+	+
D-галактоза	+	+
D-мальтоза	+	+
D-ксилоза	+	+
L-арабиноза	+	+
D-манноза	+	–
Фруктоза	+	–
Сахароза	+	+
Сорбит	+	+
Маннит	+	+
Глицерин	+	+
D-аланин	+	+
D-тирозин	+	–
DL-серин	+	+
DL-триптофан	+	–
D-валин	+	–
D-лейцин	+	–
D-фенилаланин	+	+
DL-метионин	+	+
Нефть	+	+
Дизельное топливо	+	+
Алканы: декан, ундекан, тридекан	+++	+++
Циклогексан	+	+
Хлорпроизводные углеводов: пентахлорэтан, дихлорэтилен, хлористый изобутил, этиловый эфир треххлоруксусной к-ты	– – + +	+++ +
Арены: бензол, толуол, <u>о-ксилол</u>	+++	+++
Спирты: глицерин, изопропанол, диэтиленгликоль	+++	– ++
Кислоты: масляная, валериановая, капроновая	+++	++ –

Примечание: «+» – наличие признака, «–» – отсутствие признака.

Штаммы *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM В-2753D и VKM В-2754D соответственно) (Приложения № 1 и 2), консорциум штаммов

микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 запатентован в РФ (Патент РФ № 2553540).

## **8.1.2. Генотипическая характеристика штаммов, образующих консорциум**

### **8.1.2.1. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК**

На настоящий момент одним из основных молекулярно-генетических подходов для идентификации вида микроорганизма является определение и сравнительный анализ последовательности гена 16S РНК, который имеет высококонсервативные и вариабельные участки. Основное преимущество метода заключается в соответствии количества нуклеотидных замен в этом гене со степенью эволюционного родства микроорганизмов, что позволяет выяснить место объекта на филогенетическом древе.

Для штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 были определены и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК (1425 п.н., KJ461687 и 1379 п.н., KJ683734 соответственно). Их сравнительный анализ с последовательностями близкородственных видов свидетельствует о том, что штамм ИБ ДТ-5.1/1 относится к виду *A. calcoaceticus* (99,93% сходства со штаммом *A. calcoaceticus* DSM 30006<sup>T</sup>), а штамм ИБ ДТ-5.3/2 – к виду *O. intermedium* (99,93% сходства со штаммом *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup>).

Для уточнения филогенетического положения штаммов, составляющих консорциум, были построены дендрограммы, основанные на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК видов, относящихся к рр. *Acinetobacter* и *Ochrobactrum* (рис. 8.3 и 8.4). На рисунках видно, что бактерия *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, образует один кластер с типовым штаммом *A. calcoaceticus* DSM 30006<sup>T</sup>, а *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 – со штаммом *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup>.

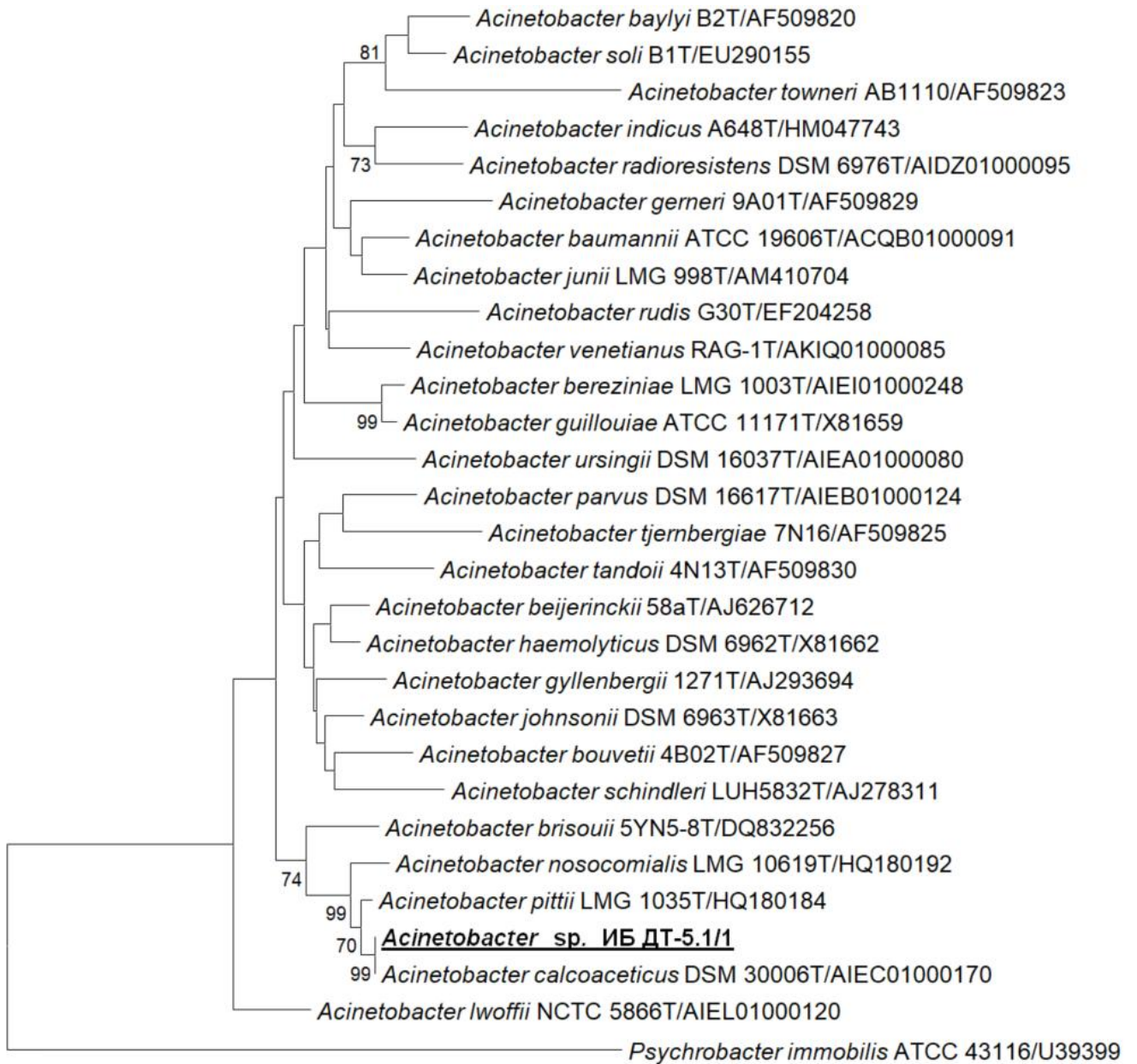


Рисунок 8.3 – Филогенетическое положение штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 основанное на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%).



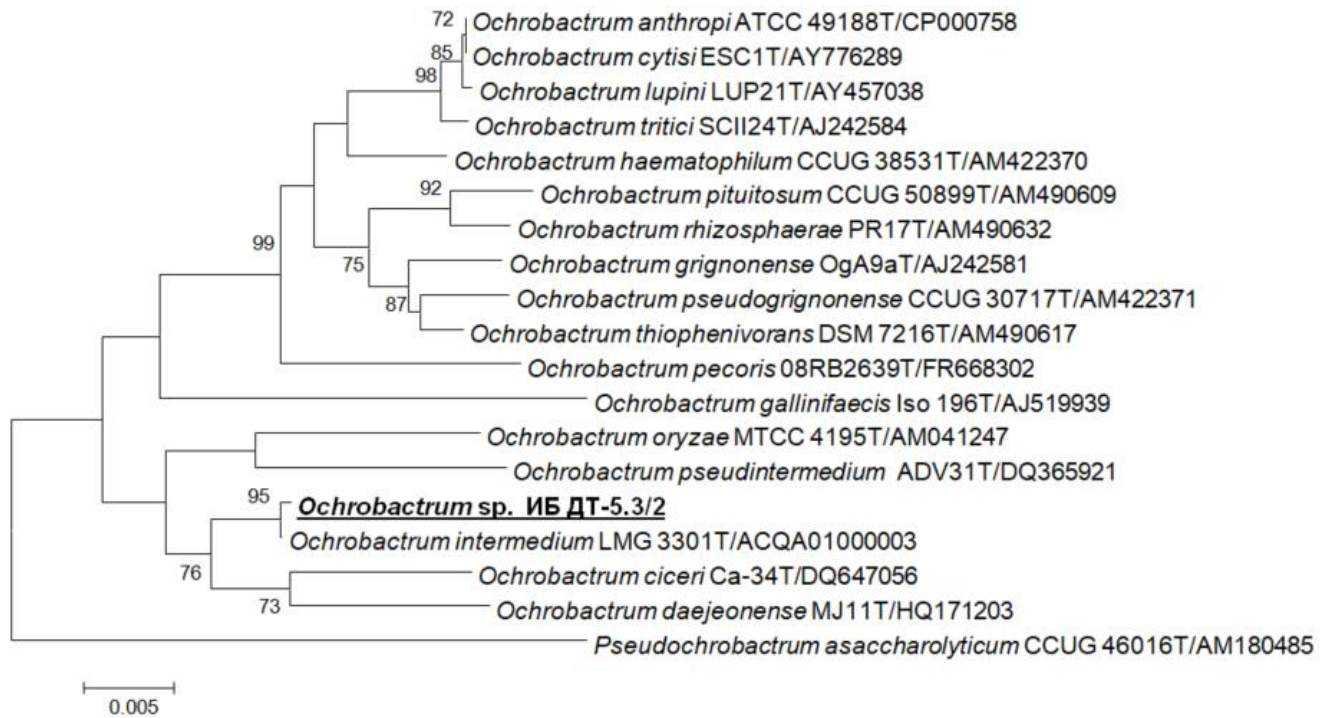


Рисунок 8.4 – Филогенетическое положение штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 основанное на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%)

### 8.1.2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*

В настоящее время все чаще в качестве альтернативных филогенетических маркеров для диагностики вида микроорганизмов используют так называемые гены «домашнего хозяйства» (от англ. «housekeeping genes») – *rpoB*, *rpoD*, *gyrA*, *gyrB*, *recA*, *secA* и т.д. (Назина и др., 2015; Weng et al., 2009; Iiyama et al., 2013; Das et al., 2014; Behera et al., 2017; Nemec et al., 2017; Oguntoyinbo et al., 2018; Passet, Brisse, 2018; Timilsina et al., 2018; Sudan et al., 2018), которые детерминируют основные процессы метаболизма и экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне. Как и гены 16S рРНК, они наследуются вертикально, обладают универсальностью распространения и

эволюционной консервативностью. У функциональных генов есть и ряд преимуществ: а) у некоторых из них, характеризующихся разной степенью консервативности, межвидовые различия в нуклеотидных последовательностях могут быть более значительными, чем у генов 16S рРНК; б) данными генами кодируются белки, поэтому анализ их нуклеотидных последовательностей позволяет учитывать синонимические замены для более точного определения таксономического положения; в) большинство таких генов присутствуют в геноме в единственной копии, в то время как у многих бактерий имеется несколько копий гена 16S рРНК (Wang et al., 2007; Турова и др., 2010). Использование генов «домашнего хозяйства» для установления видовой принадлежности микроорганизмов рекомендуется Международным комитетом по систематике прокариот (Stakebrandt et al., 2002).

Одним из наиболее перспективных филогенетических маркеров, альтернативных гену 16S рРНК, являются гены ДНК-топоизомераз II типа, осуществляющих изменение пространственной конфигурации молекулы ДНК на различных этапах ее репликации. Бактериальный геном содержит два гомологичных фермента этого типа, гиразу и топоизомеразу IV, состоящих из двух субъединиц каждый и содержащих в сумме 1200-1500 аминокислот, что статистически достаточно для филогенетического анализа (Huang, 1996). Одна из основных функций ДНК-гиразы заключается в снятии напряжения, возникающего впереди репликационной вилки в результате расплетания двойной спирали ДНК в ходе репликации. Для целей филогенетики чаще используется ген, кодирующий  $\beta$ -субъединицу ДНК-гиразы (*gyrB*), горизонтальный перенос которого у некоторых групп бактерий происходит со скоростью, равной скорости переноса рибосомных генов (Kasai et al., 1998), а скорость замены пар оснований в нем коррелирует с данными ДНК-ДНК-гибридизации (Suzuki et al., 2001; Weng et al., 2009). Секвенирование последовательности гена *gyrB* позволило идентифицировать вид у штаммов бактерий рр. *Pseudomonas* (Izumi et al., 2007,

Anuj et al., 2009), *Paenibacillus* (Wu et al., 2010), *Vibrio* (Luo, Hu, 2008), *Geobacillus* (Коршунова, 2014) и *Dietzia* (Назина и др., 2015).

Исходя из вышесказанного, были определены и проанализированы нуклеотидные последовательности гена *gyrB* у микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 (745 п.н., номер в GenBank KX034109) и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (719 п.н., номер в GenBank KU928130), входящих в состав консорциума. Степень гомологии последовательностей гена *gyrB* штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 с аналогичными последовательностями нескольких нетиповых штаммов р. *Acinetobacter* была невысокой (94% сходства со штаммом *A. oleivorans* DR1, 92% сходства со штаммом *A. calcoaceticus* PHEA-2). Результаты анализа и построенная дендрограмма (рис. 8.5) не позволяют достоверно определить вид у штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1. Можно сделать вывод только о его принадлежности к роду *Acinetobacter*.

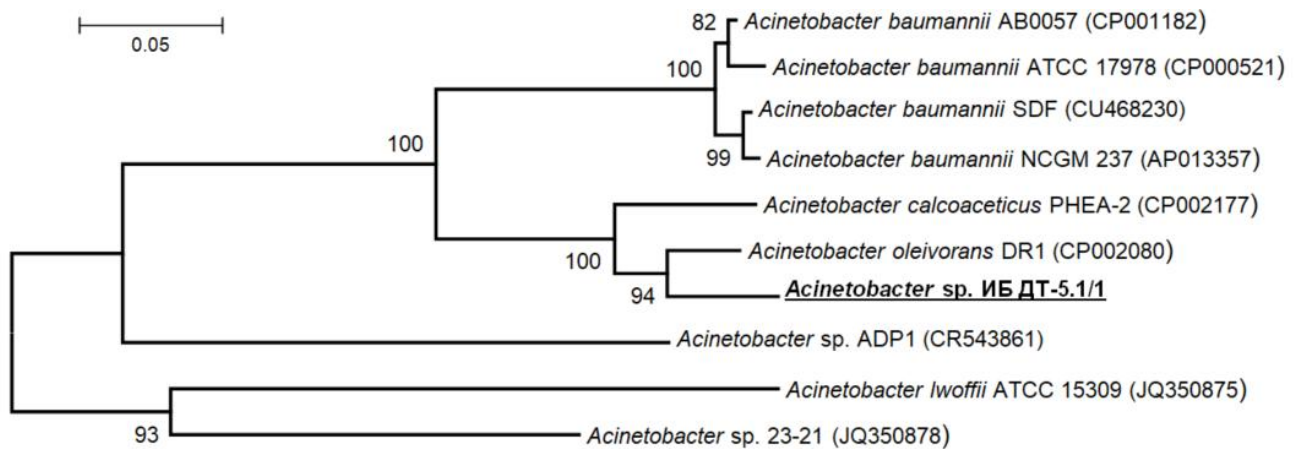


Рисунок 8.5 – Филогенетическое положение штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*. Дендрограмма построена методом Maximum Likelihood (Rogers, Swofford, 1998) по модели Tamura–Nei (Tamura, Nei, 1993). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Числами указана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%)

Уровень сходства последовательностей изучаемого гена между штаммом *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 и другими представителями р. *Ochrobactrum* составил 90% (со штаммами *O. anthropi* ATCC 49188<sup>T</sup> и *O. anthropi* OAB) и 87% (со штаммами *O. pituitosum* AA2 и *O. pseudogrignonense* K8). Остальные штаммы, участвующие в BLAST-анализе, относились к р. *Brucella* (который, как и р. *Ochrobactrum* принадлежит к семейству *Brucellaceae*) и обладали уровнем гомологии не более 85%. Поэтому, при построении филогенетического дерева для штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 на основании последовательностей гена *gyrB* в него были включены представители р. *Brucella*. Как и следовало ожидать, штаммы р. *Ochrobactrum* образуют отдельный кластер на дендрограмме, а исследуемый микроорганизм *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 занимает в нем отдельную ветвь (рис. 8.6).

Таким образом, с помощью сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена *gyrB* не удалось достоверно установить видовую принадлежность штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2.

Исследование филогенетических взаимоотношений внутри рр. *Ochrobactrum* и *Acinetobacter* выявило на данный момент низкую разрешающую способность гена *gyrB* в качестве дополнительного маркера для определения видовой структуры бактерий этих родов. Сложившаяся ситуация, возможно, связана с малыми размерами базы данных по последовательностям указанного гена у представителей р. *Ochrobactrum* и *Acinetobacter*, в которой отсутствуют сведения о большинстве типовых штаммов, а также с недостаточной универсальностью существующих систем праймеров, которые могут быть усовершенствованы при увеличении числа исследованных микроорганизмов рр. *Ochrobactrum* и *Acinetobacter*.

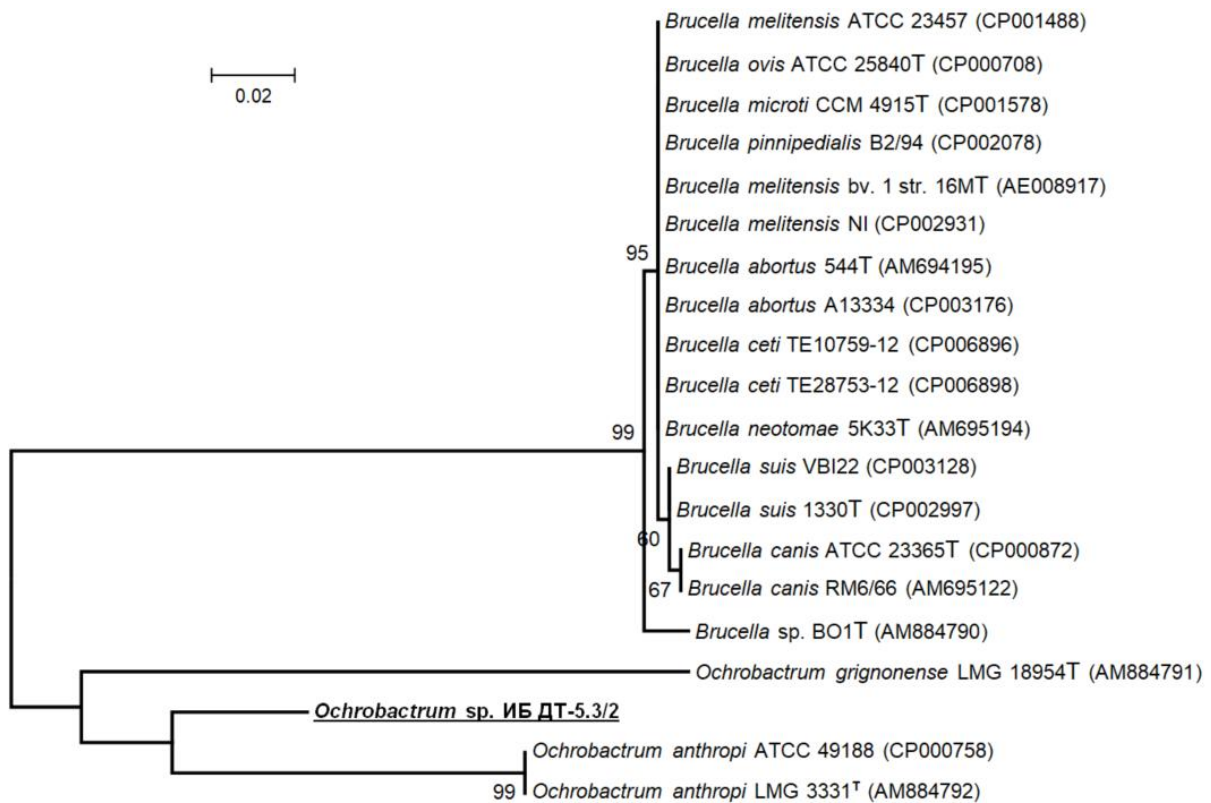


Рисунок 8.6 – Положение штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 на филогенетическом древе семейства *Brucellaceae* согласно анализу нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*. Дендрограмма построена методом Maximum Likelihood (Rogers, Swofford, 1998) по модели Tamura–Nei (Tamura, Nei, 1993). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 60%)

### 8.1.3. Хемотаксономические особенности микроорганизмов консорциума

#### 8.1.3.1. Состав жирных кислот клеточной стенки

Одно из направлений хемотаксономических исследований микроорганизмов – анализ метиловых эфиров жирных кислот клеточной стенки микроорганизмов с помощью газовой хромато-масс-спектрометрии. Состав этих соединений детерминирован в ДНК, поэтому у представителей разных систематических

групп он значительно различается как по соотношению основных, так и по наличию характерных минорных компонентов и может использоваться для определения видовой принадлежности бактерий (Buyer, 2002; Quezada et al., 2007; Компанцева и др., 2007; Струкова и др., 2009). И хотя спектр жирных кислот конкретного бактериального штамма может меняться в зависимости от условий культивирования (температура, возраст культуры и т.д.), общая характеристика жирнокислотного состава при этом сохраняется (Компанцева и др., 2007). Согласно требованиям полифазной таксономии, изучение профиля жирных кислот клеточной стенки микроорганизмов и его сопоставление с другими фено- и генотипическими характеристиками является обязательным условием описания таксономического статуса объекта (Tindall et al., 2010).

В составе клеточной стенки штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 идентифицировано 25 жирных кислот (табл. 8.3). Доминирующими соединениями являлись 9-*цис*-октадеценовая ( $C_{18:1w9c}$ ) (27,3%), гексадекановая ( $C_{16:0}$ ) (25,0%) и 9-*цис*-гексадеценовая ( $C_{16:1w7c}$ ) (18,9%), сходные с таковыми у штаммов *Acinetobacter* spp., описанных в работе Вейант (Вейант и др., 1999) и 32 штаммов *A. calcoaceticus*, выделенных из клинических образцов (слюна человека) китайскими исследователями (Yang et al., 2012). Выбор штаммов *A. calcoaceticus* в качестве объектов сравнения обусловлен тем, что представители именно этого вида оказались наиболее близки к исследуемому микроорганизму по результатам анализа последовательности гена 16S рРНК. Суммарное содержание доминирующих кислот у вышеперечисленных бактерий составляет 71,2-73,6%. В жирнокислотном профиле штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 в незначительном количестве присутствуют оксикислоты (2h- $C_{12:0}$  (1,7%), 3h- $C_{12:0}$  (1,7%), 3h- $C_{14:0}$  (0,2%), 3h- $C_{18:0}$  (0,3%)), а также одно вещество с *изо*-положением метильной группы (*изо*-гептадекановая (*iso*- $C_{17:0}$ )) – 0,4%.

Таблица 8.3 – Состав жирных кислот клеточной стенки штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, представителей р. *Acinetobacter* (Вейант и др., 1999) и среднее содержание жирных кислот для 32 штаммов *A. calcoaceticus* (Yang et al., 2012)

Жирная кислота	Содержание, % от суммарного		
	<i>Acinetobacter</i> sp. ИБ ДТ-5.1/1	<i>Acinetobacter</i> spp.	Среднее для 32 штаммов <i>A. calcoaceticus</i>
C <sub>10:0</sub>	–	Следы	0,1
C <sub>12:0</sub>	1,5	7	4,5
2h-C <sub>12:0</sub>	1,7	2	2,0
3h-C <sub>12:0</sub>	1,7	4	3,1
C <sub>13:0</sub>	–	н/д	0,2
3h- <i>iso</i> -C <sub>13:0</sub>	–	н/д	0,5
C <sub>14:0</sub>	0,8	1	2,0
3h-C <sub>14:0</sub>	0,2	1	2,6*
C <sub>15:0</sub>	0,6	1	1,1
<i>iso</i> -C <sub>15:1</sub> /3h-C <sub>13:0</sub> **	–	н/д	0,7
<i>iso</i> -C <sub>15:1</sub>	–	н/д	0,1
<i>anteiso</i> -C <sub>15:1</sub>	–	н/д	0,4
C <sub>16:0</sub>	25,0	20	20,5
C <sub>16:1w9c</sub>	1,0	1	0,1
C <sub>16:1w7c</sub>	18,9	16	25,1***
C <sub>16:1w7t</sub>	0,6	н/д	н/д
C <sub>16:0alc</sub>	1,2	н/д	н/д
C <sub>16:1alc</sub>	0,3	н/д	н/д
C <sub>17:0</sub>	1,8	2	1,2
<i>iso</i> -C <sub>17:0</sub>	0,4	н/д	н/д
C <sub>17:1w8c</sub>	1,4	4	2,9
C <sub>18:0</sub>	4,7	1	1,7
3h-C <sub>18:0</sub>	0,3	н/д	н/д
C <sub>18:1w9c</sub>	27,3	36	28,0
C <sub>18:1w7c</sub>	5,6	2	2,7
C <sub>18:1w7t</sub>	1,6	н/д	н/д
C <sub>18:2</sub>	0,2	2	н/д
C <sub>18:0alc</sub>	1,6	н/д	н/д
C <sub>18:1alc</sub>	1,2	н/д	н/д
C <sub>20:0</sub>	0,1	н/д	н/д
C <sub>22:1</sub>	0,4	н/д	н/д
Неидентифицированные	0,1	н/д	0,6

Примечание. “–” – не обнаружено. \* – для *iso*-C<sub>16:1</sub>/3h-C<sub>14:0</sub> (Yang et al., 2012). \*\* – обозначение Янг с соавт. \*\*\* – для *iso*-2h-C<sub>15:0</sub>/C<sub>16:1w7c</sub> (Yang et al., 2012). «н/д» – нет данных.

У изучаемого микроорганизма выявлены изомеры доминирующих насыщенных кислот – для  $C_{16:1w7c}$  это 7-*цис*-гексадеценовая ( $C_{16:1w9c}$ ) (1,0%) и 9-*транс*-гексадеценовая ( $C_{16:1w7t}$ ) (0,6%), для  $C_{18:1w9c}$  – 11-*цис*-октадеценовая ( $C_{18:1w7c}$ ) (5,6%) и 11-*транс*-октадеценовая ( $C_{18:1w7t}$ ) (1,6%). Наличие транс-изомеров у штаммов сравнения не отмечено.

У штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 обнаружены высшие спирты – насыщенные (*n*-гексадеканол и *n*-октадеканол) и ненасыщенные (гексадецен-9-ол и октадецен-9-ол), а также 13-докозеновая ( $C_{22:1}$ ), октадекадиеновая ( $C_{18:2}$ ) и следы эйкозановой кислоты ( $C_{20:0}$ ). Эти минорные компоненты отсутствуют как у *Acinetobacter* spp., исследованных Вейант (Вейант и др., 1999), так и у 32 клинически значимых штаммов *A. calcoaceticus* (Yang et al., 2012).

У некоторых штаммов *A. calcoaceticus* (Yang et al., 2012) в минорных или следовых количествах выявлены соединения ( $C_{10:0}$ ,  $C_{13:0}$ , 3*h-iso*- $C_{13:0}$ , *anteiso*- $C_{15:1}$ , *iso*- $C_{15:1}$  и/или 3*h*- $C_{13:0}$  и *iso*- $C_{15:1}$ ), не идентифицированные у штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Acinetobacter* spp. (Вейант и др., 1999). В клеточных стенках *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Acinetobacter* spp. (Вейант и др., 1999) найдена 7-*цис*-гексадекановая кислота (по 1%), присутствующая только у одного из штаммов, изученных Янг с соавт. (Yang et al., 2012).

В таблице 8.4 указан состав жирных кислот штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 и типовых штаммов *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> (Kämpfer et al., 2011) и *O. intermedium* КАСС 11952<sup>T</sup> (Woo et al., 2011). Выбор штаммов сравнения обусловлен тем, что представители именно этого вида оказались наиболее близки к исследуемому микроорганизму по результатам анализа последовательности гена 16S рРНК. Всего в клеточных стенках *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 было обнаружено 20 соединений с длиной цепи от 14 до 22 атомов углерода. Доминировали 11-*цис*-октадеценовая ( $C_{18:1w7c}$ ) (27,4%) и циклопропан-нонадекановая кислоты ( $C_{19:0}$  *cyclo*) (20,1%), характерные и для других представителей р. *Ochrobactrum* (Kämpfer et al., 2011; Woo et al., 2011), но при этом у штамма *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> циклопропан-нонадекановая кислота



превалировала над 11-*цис*-октадеценовой (57,4 и 25,7% соответственно) (Kämpfer et al., 2011).

Таблица 8.4 – Состав жирных кислот клеточной стенки штаммов *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, *O. intermedium* КАСС 11952<sup>Т</sup> (Woo et al., 2011) и *O. intermedium* LMG 3301<sup>Т</sup> (Kämpfer et al., 2011)

Жирная кислота	Содержание, % от суммарного		
	<i>Ochrobactrum</i> sp. ИБ ДТ-5.3/2	<i>O. intermedium</i> КАСС 1952 <sup>Т</sup>	<i>O. intermedium</i> LMG 3301 <sup>Т</sup>
C <sub>10:0</sub>	–	1,1	н/д
C <sub>12:1</sub>	–	3,8	н/д
3h-C <sub>14:0</sub>	0,2	н/д	н/д
C <sub>16:0</sub>	9,7	6,1	3,7
C <sub>16:1w9c</sub>	0,2	н/д	н/д
C <sub>16:1w7c</sub>	1,2	н/д	0,7
C <sub>16:1w7t</sub>	0,1	н/д	н/д
C <sub>17:0</sub>	1,4	2,1	3,1
<i>iso</i> -C <sub>17:0</sub>	0,2	н/д	н/д
<i>anteiso</i> -C <sub>17:0</sub>	0,2	н/д	н/д
C <sub>17:1w6c</sub>	–	н/д	1,1
C <sub>17:1w8c</sub>	0,4	н/д	н/д
C <sub>18:0</sub>	13,0	6,5	4,1
3h-C <sub>18:0</sub>	1,1	н/д	н/д
C <sub>18:1w11</sub>	1,1	н/д	н/д
C <sub>18:1w7c</sub>	27,4	н/д	н/д
C <sub>18:1w7</sub>	3,0	50,3	25,7
11- <i>Methyl</i> -C <sub>18:1</sub>	3,1	н/д	1,5
C <sub>18:2</sub>	3,1	н/д	н/д
2h-C <sub>18:1</sub>	8,1	1,8	1,8
2h-C <sub>19:1</sub>	3,3	н/д	н/д
C <sub>19:0</sub> <i>cyclo</i>	20,1	28,3	57,4
C <sub>20:2w6,9c</sub>	–	н/д	0,9
C <sub>22:1w8</sub>	3,1	н/д	н/д

Примечание. “–” – не обнаружено. «н/д» – нет данных.

Содержание октадекановой (C<sub>18:0</sub>), гексадекановой (C<sub>16:0</sub>) и 2-гидрокси-октадеценовой кислот (2h-C<sub>18:1</sub>) составило 13, 9,7 и 8,1% соответственно. Эти же соединения были минорными компонентами и в спектре жирных кислот штаммов сравнения, но в меньшем количестве: C<sub>18:0</sub> – 4,1 и 6,5% (*O. intermedium* LMG

3301<sup>T</sup> и *O. intermedium* КАСС 11952<sup>T</sup> соответственно), C<sub>16:0</sub> – 3,7 и 6,1% (*O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> и *O. intermedium* КАСС 11952<sup>T</sup> соответственно) и 2h-C<sub>18:1</sub> – по 1,8% у каждого микроорганизма (Kämpfer et al., 2011; Woo et al., 2011). Для штаммов ИБ ДТ-5.3/2 и LMG 3301<sup>T</sup> установлено наличие метилзамещенной ненасыщенной кислоты с 18 атомами углерода (11-Methyl-C<sub>18:1</sub>) – 3,1 и 1,5% (*Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 и *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> соответственно) (Kämpfer et al., 2011), отсутствующей у бактерий *O. intermedium* КАСС 11952<sup>T</sup> (Woo et al., 2011). В целом состав жирных кислот изучаемого микроорганизма был более разнообразным, чем у штаммов сравнения. Так, у *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 были идентифицированы 4 гидроксизамещенных соединения (3h-C<sub>14:0</sub>, 3h-C<sub>18:0</sub>, 2h-C<sub>18:1</sub>, 2h-C<sub>19:1</sub>), а также изомеры гексадеценовой (C<sub>16:1</sub>) и октадеценовой (C<sub>18:1</sub>) кислот. Кроме того, у штамма обнаружены 13-докозеновая кислота (C<sub>22:1w8</sub>) (3,1%), в следовых количествах *изо*- и *антеизо*-гептадекановые кислоты (*изо*-C<sub>17:1</sub> и *anteiso*-C<sub>17:1</sub>) (по 0,2% каждой) и одна кислота с двойной связью – октадекадиеновая (C<sub>18:2</sub>) (3,1%). Вместе с тем, у изучаемого микроорганизма не была детектирована другая кислота с двойной связью – 11-*цис*-14-*цис*-эйкозадиеновая (C<sub>20:2w6,9c</sub>), представленная у *O. intermedium* LMG 3301<sup>T</sup> (0,9%) (Kämpfer et al., 2011) и два короткоцепочечных соединения (C<sub>10:0</sub> и C<sub>12:1</sub>), выявленные у *O. intermedium* КАСС 11952<sup>T</sup> (1,1 и 3,8% соответственно) (Woo et al., 2011).

### 8.1.3.2. Белковые профили клеток микроорганизмов консорциума

Относительно новый метод матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной (МАЛДИ-ВП) масс-спектрометрии позволяет проводить прямой анализ белковой фракции бактериальных клеток (в основном состоящей из высококонсервативных и видоспецифичных рибосомальных белков) без разделения и очистки отдельных составляющих и получить уникальные масс-спектры, которые потом сравнивают с имеющимися в базе данных. Таким образом можно идентифицировать объекты на уровне вида и даже подвида (Присяжная и др., 2012; Демидов и др., 2013;

Welker, Moore, 2011; Singhal et al., 2015). Для МАЛДИ-ВП–масс-спектрометрии характерно множество преимуществ по сравнению с классическими методами микробиологии: однократный посев, широкий выбор сред и условий культивирования, прямой анализ материала, простота пробоподготовки, минимальное количество расходных материалов. Результаты, полученные этим методом, хорошо коррелируют с данными по определению нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и другими генотипическими признаками (Присяжная и др., 2012; Buchan et al., 2014; Starostin et al., 2015) и в ряде случаев даже превосходят по своей дискриминационной способности секвенирование гена 16S рРНК (Mellmann et al., 2008; Bizzini et al., 2011; Böhme et al., 2013; Angeletti et al., 2015). Однако сегодня отсутствуют конкретные критерии определения видовой принадлежности на основе анализа масс-спектров, которые были бы универсальны для всех микроорганизмов (Welker, Moore, 2011). В большинстве опубликованных работ по идентификации с помощью МАЛДИ-ВП–масс-спектрометрии рассматриваются клинически значимые виды и штаммы (Mellmann et al., 2008; Desai et al., 2012; Böhme et al., 2013; Burillo et al., 2014; Cabroler et al., 2015; Erler et al., 2015), и поэтому базы данных содержат мало сведений о МАЛДИ-масс-спектрах типовых штаммов известных видов. В то же время представляет большой интерес использование этого метода для экологических исследований (например, для изучения состава природных бактериальных сообществ) или в биотехнологии (поиск хозяйственно значимых штаммов-продуцентов или деструкторов токсических веществ).

Полученные масс-спектры белковой фракции клеток микроорганизмов консорциума (рис. 8.7 и 8.8) идентифицированы по стандартным настройкам программы Biotyper 3.0. В результате исследуемым спектрам были присвоены таксономический идентификатор род/вид и численный рейтинг идентификации, представленный в виде логарифмической шкалы от 0 до 3 (*score*). Согласно рекомендациям производителя, положительная идентификация на уровне рода возможна при  $score \geq 1,7$ , а на уровне вида – при  $score \geq 2,0$ ;  $score < 1,7$  обозначает отсутствие идентификации.

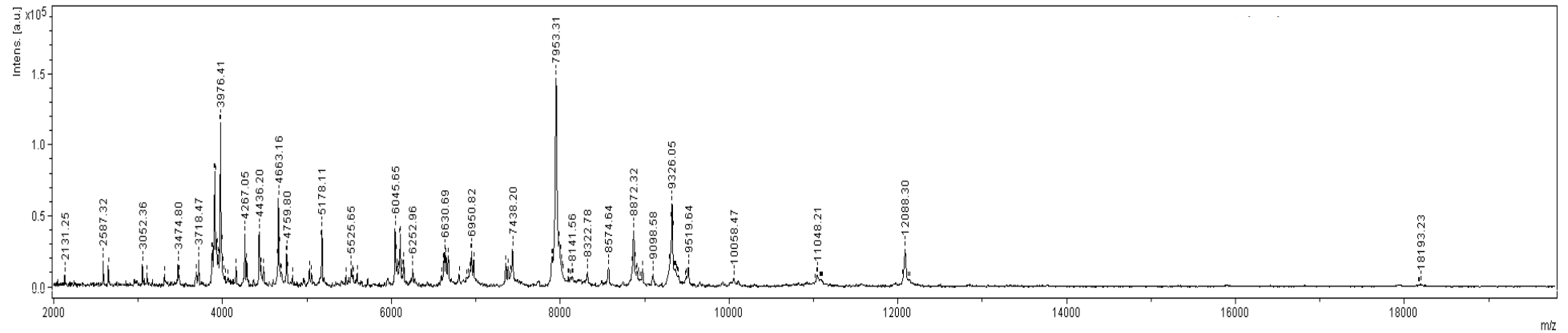


Рисунок 8.7 – МАЛДИ-масс-спектр клеточных белков штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1. Цифрами у пиков обозначены значения их масс (m/z)

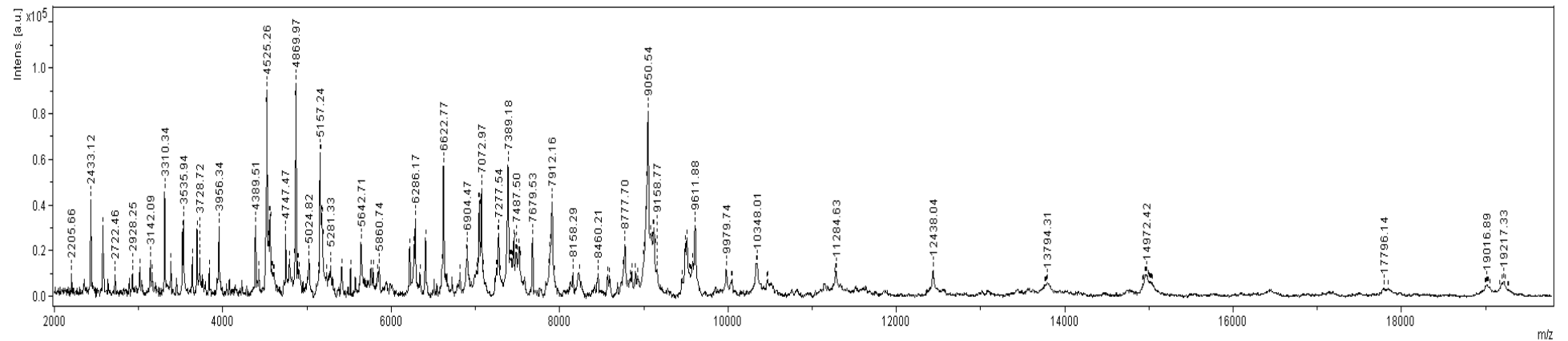


Рисунок 8.8 – МАЛДИ-масс-спектр клеточных белков штамма *Ochrobastrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2. Цифрами у пиков обозначены значения их масс (m/z)

У масс-спектра штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 значение *score* = 2,156, у штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 *score* = 2,263, что соответствует достоверному определению до рода и определению до вида. Таким образом, на основании изучения белковых профилей клеток микроорганизмов консорциума, штамм *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 был отнесен к виду *O. intermedium* (штамм LMG 3301<sup>T</sup>), а штамм *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 – к виду *A. calcoaceticus* (штамм ССМ 4503).

Таким образом, согласно требованиям современной систематики прокариот изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства, проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК и *gyrB*, исследованы качественный и количественный состав жирных кислот клеточной стенки и белковый профиль клеток микроорганизмов, образующих нефтеокисляющий консорциум и определена их видовая принадлежность. Консорциум состоит из штаммов *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3/2.

## **8.2. Описание штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1**

### **8.2.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства**

Из образцов почвы с территории нефтедобывающего предприятия Красноярского края было выделено 14 изолятов, разлагающих нефть в жидкой среде при низкой положительной температуре (4-6°C), среди которых наибольшую активность проявил штамм ИБ 1.1.

Клетки – прямые палочки размером 2,5-3,3×1,0-1,1 мкм, подвижные, имеют один полярный жгутик (рис. 8.9). Не образуют спор. Колонии на питательном агаре округлые, выпуклые, бежевые, полупрозрачные, диаметром около 2 мм. Образуют флуоресцирующий пигмент при выращивании на среде Кинг Б. Грамотрицательные, строго аэробные. Метаболизм – окислительный, обладают способностью к денитрификации. Каталазо- и оксидазоположительные. Растут в

интервале температур от 0 до 34°C, с оптимумом при 28°C. Диапазон pH – 6-8. Индол не образуют. Нитрат-редукция и гидролиз эскулина отсутствуют. Усваивают глюкозу, маннозу, маннит, капрат, адипат и малат. Не используют мальтозу, глюконат, цитрат и фенилацетат. Ассимилируют твин 40 и твин 80. Не разлагают декстрин, гликоген, L-фукозу, D-галактозу, *m*-инозитол,  $\alpha$ -D-лактозу, лактулозу, мальтозу, D-раффинозу, L-рамнозу. Штамм использует в качестве источника углерода углеводороды различных классов и их производные, а также нефть и продукты ее переработки. На основании изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм был предварительно отнесен к р. *Pseudomonas* и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ В-2831D) (Приложение № 3)

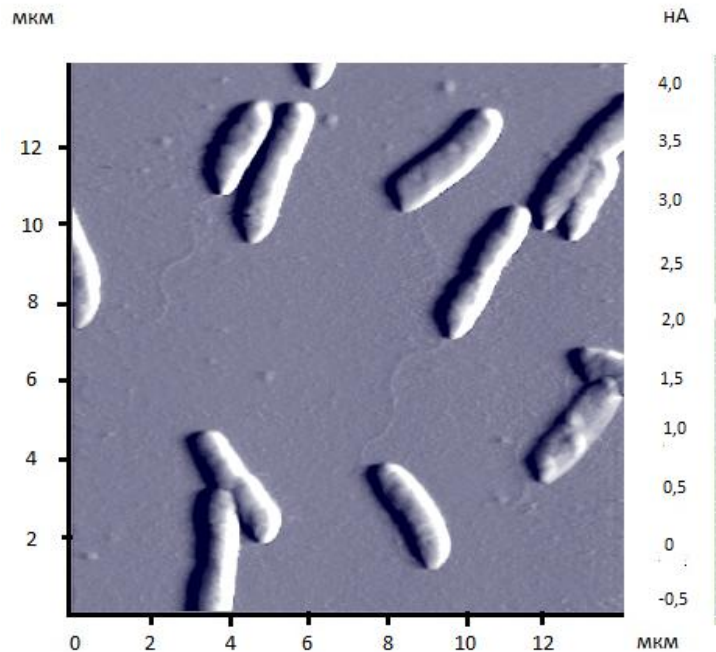


Рисунок 8.9 – Клетки штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 (сканирующая зондовая микроскопия)

## 8.2.2. Генотипическая характеристика штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1

### 8.2.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

В результате определения и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 (1412 п.н., номер в GenBank KP306892) наибольший уровень гомологии был обнаружен со штаммами *P. granadensis* F-278,770<sup>T</sup> (Pascual et al., 2015) (98,7% сходства) и *P. punonensis* LMT03<sup>T</sup> (Ramos et al., 2013) (98,6% сходства). Для уточнения филогенетического положения штамма ИБ 1.1 была построена дендрограмма (рис. 8.10).

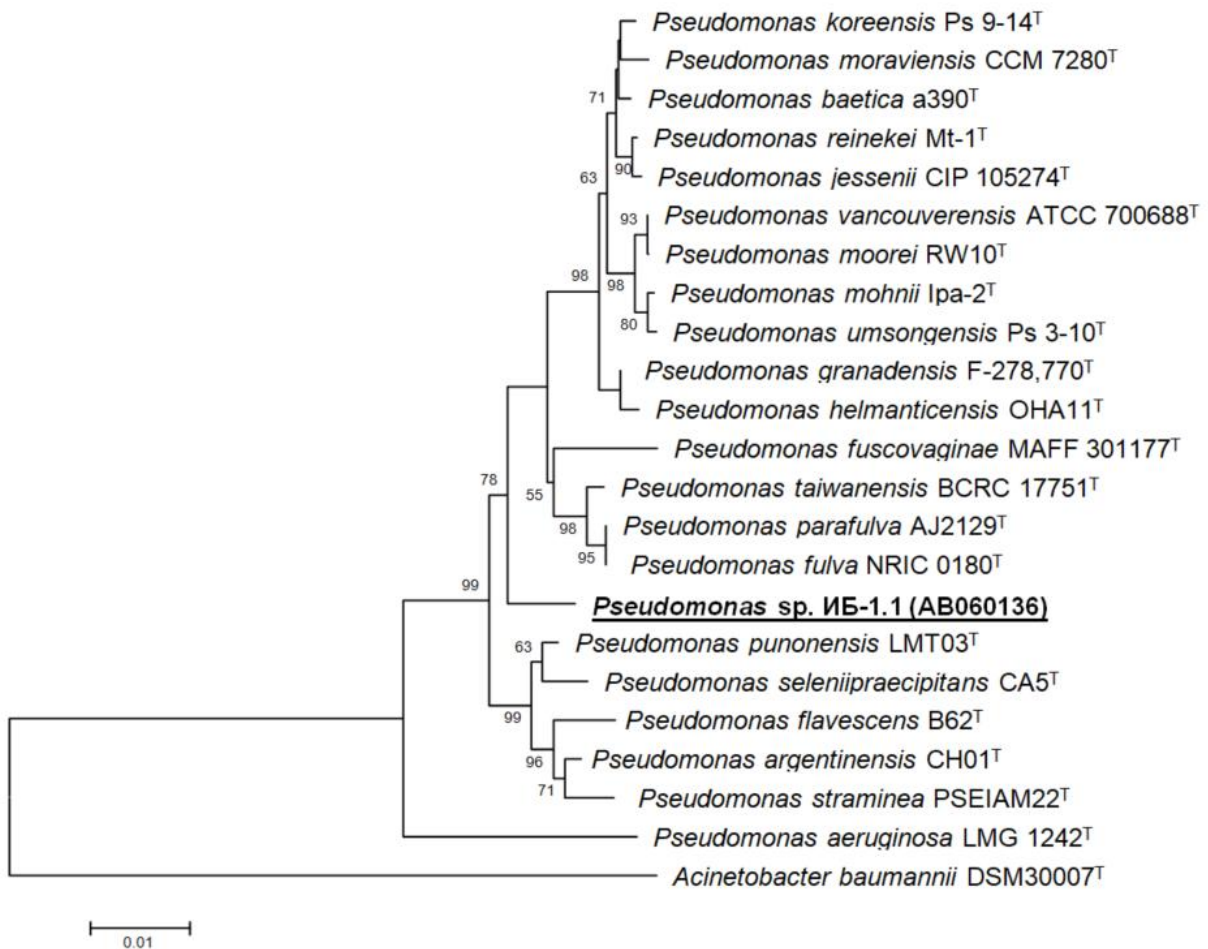


Рисунок 8.10 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 замене на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 50%)

На дендрограмме показано, что изучаемый микроорганизм не входит в один кластер с родственными штаммами *P. granadensis* F-278,770<sup>T</sup> и *P. punonensis* LMT03<sup>T</sup> и образует отдельную ветвь на древе. Поэтому было выдвинуто предположение о том, что штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 может являться представителем нового вида р. *Pseudomonas*.

### 8.2.2.2. Анализ нуклеотидных последовательностей

#### генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB*

Как уже говорилось выше (см. п. 8.1.2.2), наиболее часто применяемыми альтернативными филогенетическими маркерами являются гены *gyrB*, *rpoB*, *rpoD*. Ген *rpoB* кодирует  $\beta$ -субъединицу бактериальной РНК-полимеразы, а ген *rpoD* –  $\sigma$ -субъединицу этого фермента. С помощью секвенирования и анализа гена *rpoB* были идентифицированы фенотипически и генетические близкие виды р. *Lactobacillus* (Шевцов и др., 2011), р. *Geobacillus* (Meintanis et al., 2008; Weng et al., 2009), с помощью гена *rpoD* – бактерии р. *Streptococcus* (Вечерковская, 2015), актинобактерии р. *Frankia* (Berneche-D'Amours et al., 2011).

Поэтому для проверки гипотезы о том, что штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 является представителем нового вида микроорганизмов, были определены и проанализированы нуклеотидные последовательности трех генов «домашнего хозяйства» – *rpoB* (1129 п.н., номер в GenBank LT219439), *rpoD* (724 п.н., LT219438) и *gyrB* (1149 п.н., номер в GenBank LT219440). Сходство последовательностей генов «домашнего хозяйства» изучаемого штамма и *P. granadensis* F-278,770<sup>T</sup>, *Ps. punonensis* LMT03<sup>T</sup>, *Ps. argentinensis* CH01<sup>T</sup>, *Ps. reinekei* MT-1<sup>T</sup>, *Ps. vancouverensis* DhA-51<sup>T</sup>, *Ps. straminea* IAM 1598<sup>T</sup>, *P. moorei* RW10<sup>T</sup> и *P. helmanticensis* ОНА11<sup>T</sup> было около 90% для *rpoB*, 77-78% – для *rpoD* и 84-87% – для *gyrB*. Эти данные свидетельствуют о значительном филогенетическом расстоянии между штаммом *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и описанными видами р. *Pseudomonas*.



Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB* (процент гомологии вычисляли после попарного сравнения) согласовалось с деревом на основе анализа гена 16S рРНК, подтверждая принадлежность штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 к роду *Pseudomonas* (рис. 8.11). Таким образом, результаты анализа последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB* также позволяют предположить, что штамм ИБ 1.1 является представителем нового, неопisanного ранее вида р. *Pseudomonas*.

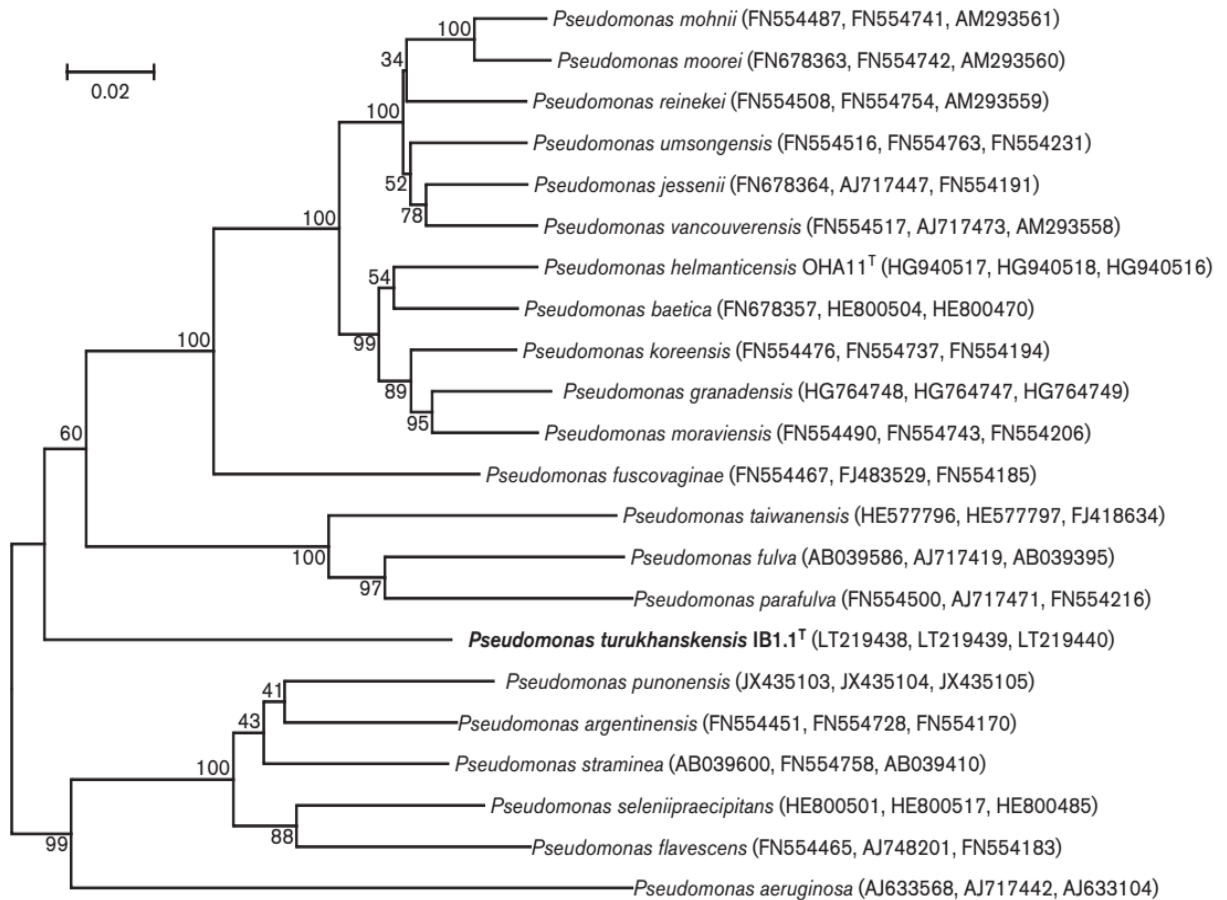


Рисунок 8.11 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB*. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Kimura (Kimura, 1980). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 30%)

### 8.2.2.3. ДНК-ДНК-гибридизация

Метод ДНК-ДНК-гибридизации является важным для оценки генетического родства бактерий. Считается, что штаммы относятся к одному виду, если величина гибридизации тотальных геномов составляет не менее 70% (Wayne et al., 1987; Stackebrandt et al., 2002).

Средние значения ДНК-ДНК-гибридизации штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и 8 штаммов р. *Pseudomonas*, показавших более 98% гомологии по гену 16S рРНК (*P. granadensis* F-278,770<sup>T</sup>, *P. punonensis* LMT03<sup>T</sup>, *P. argentinensis* CH01<sup>T</sup>, *P. reinekei* Mt-1<sup>T</sup>, *P. vancouverensis* DhA-51<sup>T</sup>, *P. straminea* IAM 1598<sup>T</sup>, *P. moorei* RW10<sup>T</sup> и *P. helmanticensis* ОНА11<sup>T</sup>) во всех случаях были меньше, чем 30%. Поэтому можно утверждать, что штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 не является представителем указанных видов р. *Pseudomonas*.

### 8.2.2.4. Содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК

Каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным средним содержанием гуанин-цитозиновых пар (ГЦ-пар) и эту величину можно рассматривать как один из важных признаков вида.

Содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 составило 58,5 мол.% и находилось в пределах диапазона, установленного для видов р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

## 8.2.3. Хемотаксономические особенности штамма

### *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1

#### 8.2.3.1. Анализ жирных кислот

Всего у штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 было выявлено 16 соединений с числом атомов углерода от 10 до 19. Доминирующими жирными кислотами являются гексадекановая (C<sub>16:0</sub>) (22,0%), изомеры гексадеценовой (C<sub>16:1w7c</sub>/C<sub>16:1w6c</sub>) (34,3%) и октадеценовой (C<sub>18:1w7c</sub>/C<sub>18:1w6c</sub>) (26,4%) кислот, а минорными компонентами – 3-гидроксидекановая (3h-C<sub>10:0</sub>) (12,4%), додекановая (C<sub>12:0</sub>) (7,6%) и 3-гидроксидодекановая (3h-C<sub>12:0</sub>) (3,5%) (табл. 8.5). Эти соединения

характерны для большинства представителей р. *Pseudomonas* (табл. 8.5) (Palleroni, 2005). Остальные вещества, среди которых 5 изокислот – 3h-iso-C<sub>11:0</sub>, iso-C<sub>13:0</sub>, iso-C<sub>16:0</sub>, iso-C<sub>17:0</sub>, iso-C<sub>19:0</sub>, выявлены в количестве менее 1%.

Таблица 8.5 – Состав жирных кислот клеточной стенки штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и других представителей р. *Pseudomonas*

Жирная кислота	Содержание, % от суммарного									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C <sub>10:0</sub>	0,2	0,1	0,1	0,1	–	0,7	0,2	0,1	0,1	сл
3h-C <sub>10:0</sub>	2,4	2,6	3,0	2,1	3,2	4,5	2,8	3,7	2,8	3,6
3h-iso-C <sub>11:0</sub>	0,1	сл	0,1	–	–	–	–	–	–	н/д
3h-C <sub>11:0</sub>	–	–	0,2	–	–	–	–	–	–	н/д
C <sub>12:0</sub>	7,6	1,5	8,2	7,8	5,2	3,2	8,3	3,5	1,7	4,8
2h-C <sub>12:0</sub>	0,3	5,6	–	–	2,3	3,9	–	4,5	5,4	3,7
3h-C <sub>12:0</sub>	3,5	4,0	3,4	3,2	3,6	4,9	3,4	4,7	3,4	4,5
iso-C <sub>13:0</sub>	0,2	–	сл	–	–	–	сл	–	–	н/д
C <sub>14:0</sub>	0,4	0,4	0,5	0,7	0,3	0,4	0,7	0,5	0,5	1,3
C <sub>15:0</sub>	0,1	0,2	1,1	0,6	0,1	0,3	0,9	–	0,2	сл
C <sub>16:0</sub>	22,0	31,3	13,9	17,5	29,0	28,5	17,6	32,1	33,0	20,5
iso-C <sub>16:0</sub>	0,1	–	0,3	–	–	–	0,1	сл	–	сл
C <sub>17:0</sub>	0,2	0,3	0,8	0,3	0,2	0,2	0,5	–	0,2	сл
iso-C <sub>17:0</sub>	0,7	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	–	0,2	сл
C <sub>17:0 cyclo</sub>	–	3,0	–	–	1,8	8,7	–	0,9	4,7	сл
C <sub>17:1w8c</sub>	0,2	0,2	1,2	0,4	0,1	–	0,7	–	0,1	сл
C <sub>18:0</sub>	1,0	0,8	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	0,4	1,0	сл
iso-C <sub>19:0</sub>	0,1	сл	–	–	–	–	–	–	0,1	сл
C <sub>19:0 cyclo w8c</sub>	–	0,2	–	–	–	0,3	–	–	сл	н/д
C <sub>16:1w7c</sub> /C <sub>16:1w6c</sub>	34,3	34,2	22,8	20,4	37,7	25,7	20,8	36,5	32,3	20,0
C <sub>18:1w7c</sub> /C <sub>18:1w6c</sub>	26,4	14,9	41,9	41,0	15,3	15,3	42,3	12,5	13,3	38,9

Примечание. 1 – *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1, 2 – *P. granadensis* LMG 27940<sup>T</sup>, 3 – *P. pinonensis* LMT 03<sup>T</sup>, 4 – *P. argentinensis* CH 01<sup>T</sup>, 5 – *P. reinekei* DSM 18361<sup>T</sup>, 6 – *P. vancouverensis* DSM 17555<sup>T</sup>, 7 – *P. straminea* IAM 1598<sup>T</sup>, 8 – *P. moorei* DSM 12647<sup>T</sup>, 9 – *P. helmanticensis* ОНА 11<sup>T</sup>, 10 – *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup>. Все данные получены в настоящей работе, за исключением состава жирных кислот *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup>, которые исследованы Xiao с соавт. (Xiao et al., 2009) с использованием стандартных условий. «сл» – следы, «н/д» – нет данных.

### 8.2.3.2. Анализ хинонов

Хиноны являются важными компонентами электротранспортной цепи бактерий, которые служат резервуаром для сбора водорода из различных субстратов в дыхательной цепи. Они локализируются в липидной фазе мембраны и у грамотрицательных бактерий представлены убихиноном (кофермент Q) или менахиноном (витамин K). Числами от 6 до 10 обозначают количество изопреноидных звеньев в убихиноне.

Доминирующим хиноном в клетках *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 является убихинон Q<sub>9</sub>, что характерно для бактерий р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

Таким образом, фенотипические особенности, содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК, хемотаксономические свойства штамма ИБ 1.1 свидетельствуют о его принадлежности к р. *Pseudomonas*. Однако он отличается от других видов рода по последовательности нуклеотидов гена, кодирующего 16S рРНК и трех генов «домашнего хозяйства» (*rpoD*, *rpoB* и *gyrB*), а также по уровню ДНК-ДНК-гибридизации. Принимая во внимание вышесказанное, штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 был классифицирован как типовой представитель нового вида р. *Pseudomonas*, для которого предложено название *Pseudomonas turukhanskensis*.

### 8.2.4. Описание вида *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov.

*Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov. (tu.ru.khansk.en'sis. N.L. fem. adj. – turukhanskensis) назван по территориальному источнику выделения штамма – Туруханскому району Красноярского края.

Клетки – прямые палочки размером 2,5-3,3×1,0-1,1 мкм, подвижные, имеют один полярный жгутик. Не образуют спор. Грамотрицательные, строго аэробные. Колонии на питательном агаре округлые, выпуклые, бежевые, полупрозрачные, как правило, диаметром 2 мм. Образуют флуоресцирующий пигмент при выращивании на среде Кинг Б. Растут в интервале температур от 0°C до 34°C, с оптимумом при 28°C. Диапазон pH – 6-8. Не растут при наличии в среде 5% NaCl. Каталазо- и оксидазоположительные. Метаболизм – окислительный, обладают

способностью к денитрификации. Не способны к ферментации сахаров в среде с пептоном. Не продуцируют аргининдегидролазу, уреазу и  $\beta$ -галактозидазу. Индол не образуют. Нитрат-редукция и гидролиз эскулина отсутствуют. Усваивают глюкозу, маннозу, маннит, капрат, адипат и малат. Не используют N-ацетилглюкозамин, мальтозу, глюконат, цитрат и фенилацетат. Ассимилируют твин 40, твин 80, L-арабинозу, D-фруктозу,  $\alpha$ -D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, сахарозу, D-трегалозу, метилпируват, моно-метилсукцинат, ацетат, *цис*-аконитат, цитрат, D-галактуронат, D-глюконат, D-глюкозамин, D-глюкуронат,  $\beta$ - и  $\gamma$ -гидроксibuтират,  $\alpha$ -кетоглутарат, D- и L-лактат, D-сахарат, сукцинат, бромсукцинат, L-аланинамид, D- и L-аланин, L-аланилглицин, L-аспарагин, L-аспартат, L-глутамат, L-гистидин, L-пролин, D- и L-карнитин,  $\gamma$ -аминобутират. Не разлагают  $\alpha$ -циклодекстрин, декстрин, гликоген, N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин, адонитол, *i*-эритритол, L-фукозу, D-галактозу, *m*-инозитол,  $\alpha$ -D-лактозу, лактулозу, мальтозу, D-мелибиозу,  $\beta$ -метил-D-глюкозид, D-психозу, D-раффинозу, L-рамнозу, туранозу, ксилитол, формиат,  $\alpha$ -гидроксibuтират, итаконат,  $\alpha$ -кетобутират,  $\alpha$ -кетовалерат, малонат, себацинат, сукцинат, глюкуронамид, глицил-L-аспартат, L-орнитин, L-фенилаланин, D-серин, L-треонин, инозин, уридин, тимидин, фенилэтиламин, 2-аминоэтанол, 2, 3-бутандиол, глицерин и глюкозо-6-фосфат. Слабо утилизируют D-арабитол, D-целлобиозу, гентиобиозу, D-галактонат лактон, *p*-гидроксифенилацетат, пропионат, гидрокси-L-пролин, L-лейцин, L-пироглутамат, L-серин, D- и L- $\alpha$ -глицерофосфат и глюкозо-1-фосфат. Доминирующим хиноном является убихинон Q9, основными жирными кислотами – C<sub>16:0</sub> и изомеры C<sub>18:1</sub> и C<sub>16:1</sub>. Содержание ГЦ-пар в ДНК составляет 58,5 мол. %.

Типовой штамм ИБ 1.1<sup>T</sup> выделен из нефтезагрязненной почвы с территории нефтедобывающего предприятия в Туруханском районе Красноярского края и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM В-2935<sup>T</sup>) и Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ 9091<sup>T</sup>) (Приложение № 4, 5). Описание нового вида микроорганизмов *Pseudomonas turukhanskensis* валидно опубликовано (Приложение № 6).

### 8.3. Описание штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4

#### 8.3.1. Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства

Из образцов пахотных почв Республики Башкортостан выделено 8 изолятов, способных к подавлению роста микроскопических грибов, среди которых только два одновременно обладали антагонистической активностью по отношению к *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* и представителям р. *Fusarium*. Один из таких штаммов по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств был предварительно идентифицирован как *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (В-2830D) (Приложение № 7).

Клетки – мелкие палочки 0,6-1,2 мкм, с закругленными концами, подвижные (рис. 8.12).

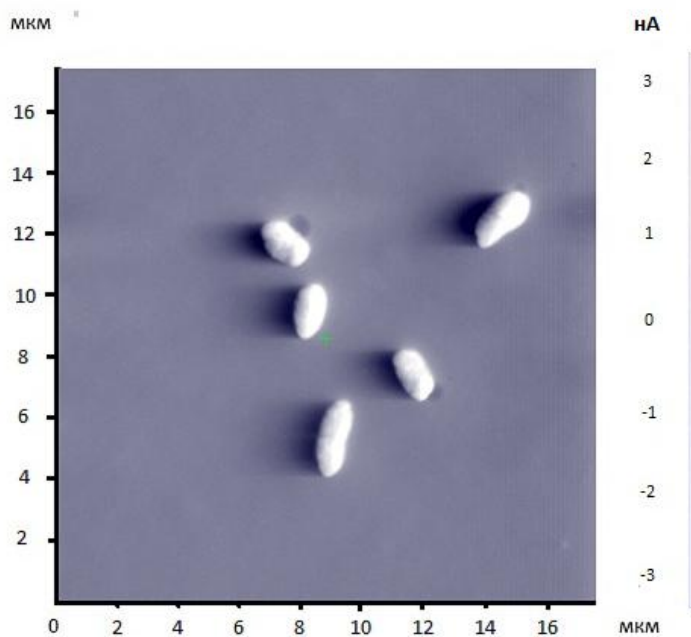


Рисунок 8.12 – Клетки штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 (сканирующая зондовая микроскопия)

Грамотрицательные, аэробные, неспорообразующие бактерии. Колонии на питательном агаре слизистые с блестящей поверхностью, прозрачные, слегка тянущиеся за петлей, круглые, выпуклые с ровными краями диаметром до 5 мм.

На картофельно-глюкозном агаре колонии плоские с неровными краями, непрозрачные, цвета слоновой кости, маслянистой и мягкой консистенции. Оптимальная температура роста 28°C. Образуют флуоресцирующий пигмент на среде Кинг Б. Метаболизм – дыхательный, способны к денитрификации. Каталазо- и оксидазоположительные. Гидролизуют казеин, не гидролизуют желатину и лецитин. Растут на среде с твин 80. Используют в качестве источника углерода D-глюкозу, D-сахарозу, маннит, фруктозу, глицерин, мальтозу, декстрин, D-ксилозу, D-маннозу, D-галактозу, лактозу, D-рамнозу, мезо-инозитол, капронат, капилат, манитол, малонат, L-инозит, цистеин, этанол, леван, крахмал, α-кетоглутарат, изомаляновую, малеиновую, сульфаниловую, пропионовую, лимонную и α-аминобензойную кислоты. Не утилизируют в качестве субстрата арабинозу, сорбит, пировиноградную, янтарную, щавелевую и муравьиную кислоты.

### **8.3.2. Генотипическая характеристика штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4**

#### **8.3.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК**

В результате сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 (1381 п.н., номер в GenBank КР306893) с последовательностями близкородственных видов наибольший уровень гомологии обнаружен со штаммом вида *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> (99,71% сходства). На филогенетическом древе на видно, что изучаемый штамм входит в один кластер со штаммом *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> (рис. 8.13).

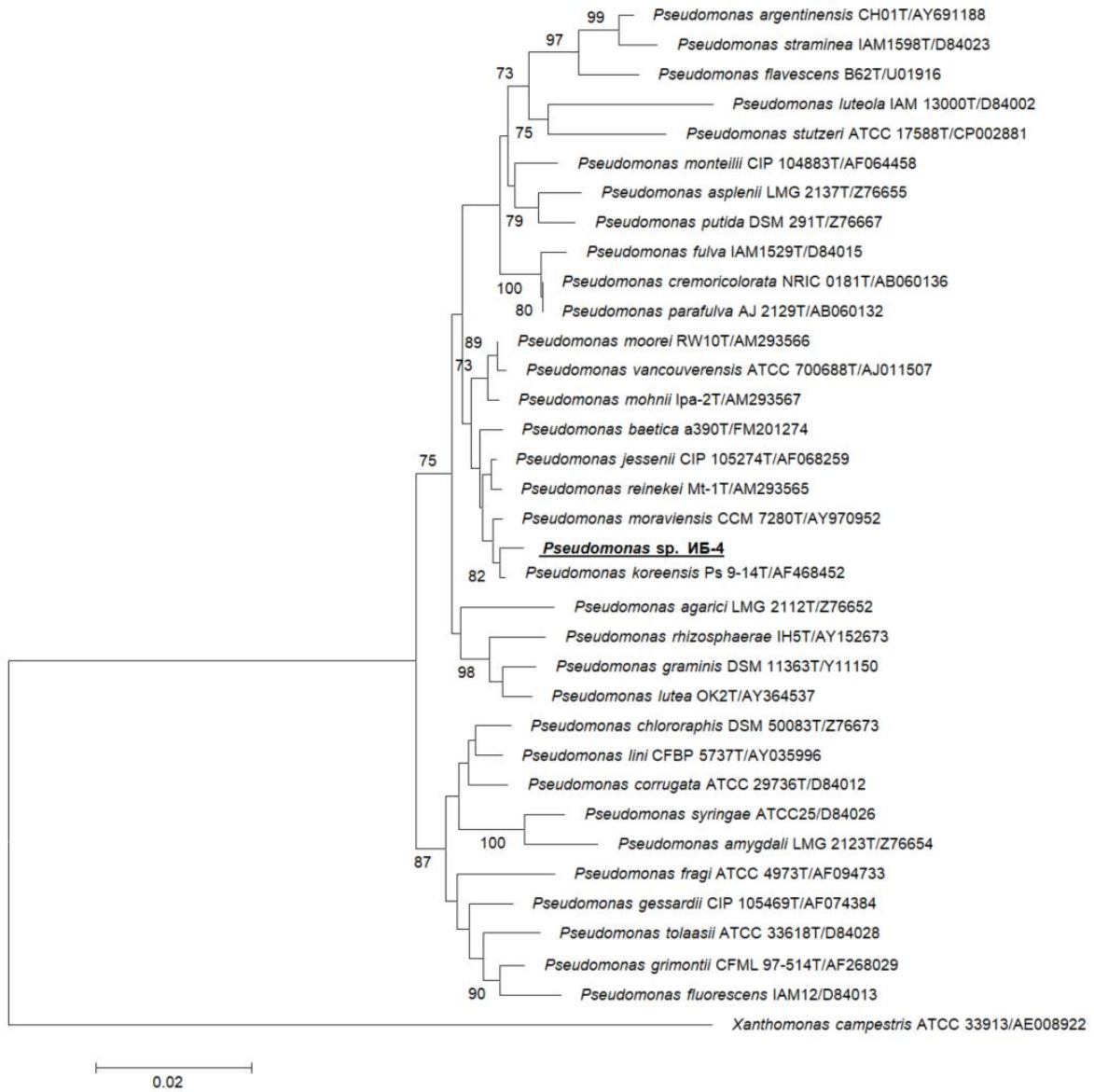


Рисунок 8.13 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. IB-4 на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 2 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%)



### 8.3.2.2. Анализ нуклеотидной последовательности гена *gyrB*

У штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 была определена, и проанализирована нуклеотидная последовательность гена *gyrB* (760 п.н., номер в GenBank MN074863). Выявлена невысокая степень гомологии с аналогичными последовательностями нетиповых штаммов вида *P. fluorescens* (97% сходства со штаммом 48D1 и 36F3). Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* видов р. *Pseudomonas*, демонстрирует, что изучаемый штамм образует один кластер со штаммом *P. fluorescens* Pf 0-1 (рис. 8.14). Т.о. с помощью указанного маркера принадлежность штамма ИБ-4 к виду *P. koreensis* не подтверждена.

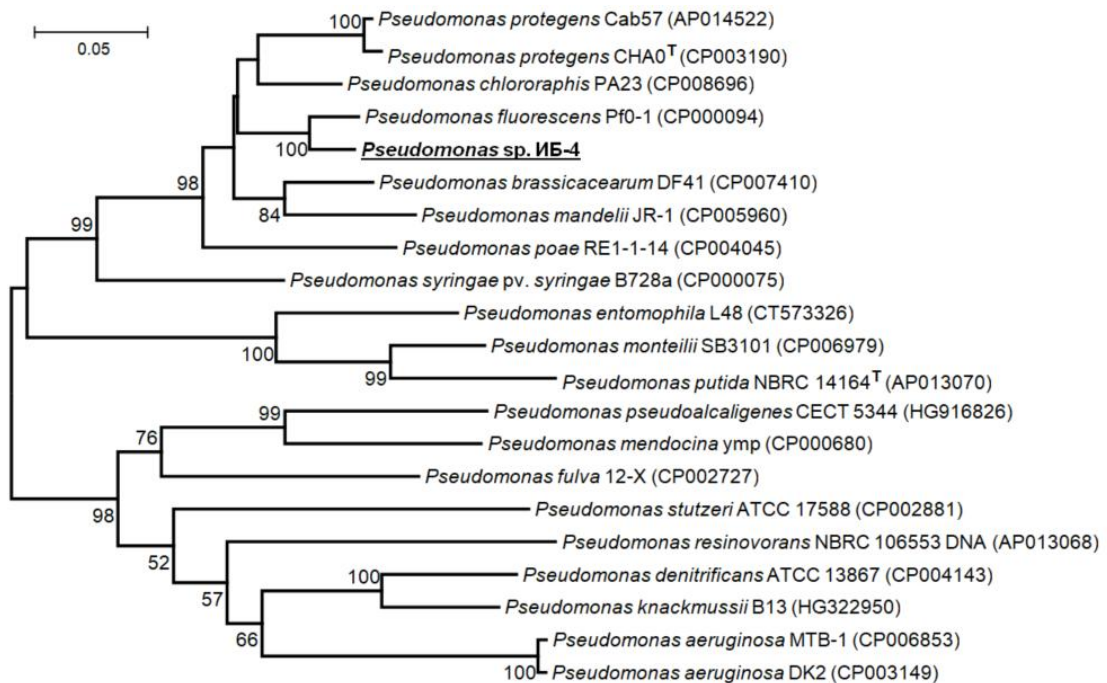


Рисунок 8.14 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 на основании анализа нуклеотидной последовательности гена *gyrB*. Дендрограмма построена методом Maximum Likelihood (Rogers, Swofford, 1998) по модели Tamura–Nei (Tamura, Nei, 1993). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 50%)

### 8.3.2.3. ДНК-ДНК-гибридизация

Уровень сходства тотальных геномов штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> (штамм из Корейской коллекции сельскохозяйственных культур (КАСС 10848) любезно предоставлен профессором Kwon S.W.) составил 71%, что свидетельствует о видовом сходстве этих микроорганизмов (Wayne et al., 1987; Stackebrandt et al., 2002).

### 8.3.2.4. Содержание ГЦ-пар

Содержание ГЦ-пар в ДНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 составило 61,5 мол.%, у штамма *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> – 60,7 мол.% (Kwon et al., 2003). Такие близкие значения свидетельствуют о вероятной принадлежности сравниваемых штаммов к одному виду.

## 8.3.3. Хемотаксономические особенности штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4

### 8.3.3.1. Анализ жирных кислот

Был исследован качественный и количественный состав жирных кислот клеточной стенки штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup>, выбранного в качестве объекта сравнения из-за высокой гомологии нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (табл. 8.6). Всего у штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 выявлено 15 соединений с числом атомов углерода от 10 до 19. Основными жирными кислотами являются гексадекановая (C<sub>16:0</sub>) (32,4%), *цикло*-гептадекановая (C<sub>17:0 cyclo</sub>) (29,92%) (это вещество не относится к числу доминирующих у представителей р. *Pseudomonas*), *цис*-11-октадеценная (C<sub>18:1w7c</sub>) (11,23%) и гексадеценная (C<sub>16:1</sub>) (8,27%). У штамма *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> эти соединения представлены в количестве 24,7, 16,73, 18,88 и 23,06% соответственно. Особенностью изучаемого микроорганизма является более высокое содержание циклических насыщенных кислот (*цикло*-гептадекановой и *цикло*-нанодекановой) и меньшее количество гексадеценной кислоты, чем у других представителей р. *Pseudomonas*. В целом, в жирнокислотном профиле у обоих сравниваемых штаммов выявлены отличия в составе и содержании

основных доминирующих соединений, зато обнаружено сходство в качестве и количестве компонентов с содержанием менее 5%.

Таблица 8.6 – Состав жирных кислот клеток штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14<sup>Г</sup>

Жирная кислота	Содержание, % от суммарного	
	<i>Pseudomonas</i> sp. ИБ-4	<i>P. koreensis</i> Ps 9-14 <sup>Г</sup>
3h-C <sub>10:0</sub>	0,25	0,22
C <sub>12:0</sub>	0,72	2,27
2h-C <sub>12:0</sub>	3,61	3,13
3h-C <sub>12:0</sub>	0,09	0,09
C <sub>14:0</sub>	1,44	1,52
C <sub>15:0</sub>	0,84	1,45
C <sub>16:0</sub>	32,4	24,7
C <sub>16:1</sub>	8,27	23,06
11-Methyl -C <sub>16:1</sub>	2,32	1,23
C <sub>17:0</sub>	0,96	2,32
C <sub>17:0 cyclo</sub>	29,92	16,73
C <sub>17:1</sub>	не обнаружено	0,68
C <sub>18:0</sub>	1,37	1,84
C <sub>18:1w7c</sub>	11,23	18,88
κ-C <sub>18:2</sub>	1,18	0,84
C <sub>19:0 cyclo</sub>	5,42	1,07

### 8.3.3.2. Анализ хинонов

Доминирующим хиноном штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 является убихинон Q<sub>9</sub>, что согласуется с результатами исследований других представителей р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

### 8.3.3.3. Профиль клеточных белков

В результате проведения МАЛДИ-ВП–масс-спектрометрии клеточных белков штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 получен МАЛДИ-масс-спектр, насчитывающий до 40 пиков (рис. 8.15). После идентификации по стандартным настройкам программы «Biotyper 3.0», ему был присвоен таксономический идентификатор род/вид и численный рейтинг идентификации, представленный в

виде логарифмической шкалы от 0 до 3 (*score*). Согласно рекомендациям производителя, положительная идентификация на уровне рода возможна при  $score \geq 1,7$ , а на уровне вида – при  $score \geq 2,0$ ;  $score < 1,7$  обозначает отсутствие идентификации. Установлено сходство МАЛДИ-масс-спектра штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 с таковыми у микроорганизмов *P. koreensis* Ps 9-14<sup>T</sup> ( $score=1,861$ ), *P. umsongensis* LMG 21317<sup>T</sup> ( $score=1,736$ ), *P. jessenii* CIP 105274<sup>T</sup> ( $score=1,727$ ). Полученные значения *score* находились в пределах 1,727-1,861, что соответствует достоверному определению принадлежности штамма ИБ-4 к р. *Pseudomonas*.

Таким образом, на основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК, процентного содержания ГЦ-пар в молекуле ДНК и ДНК-ДНК-гибридизации, штамм *Pseudomonas* sp. ИБ-4 был отнесен к виду *P. koreensis*.

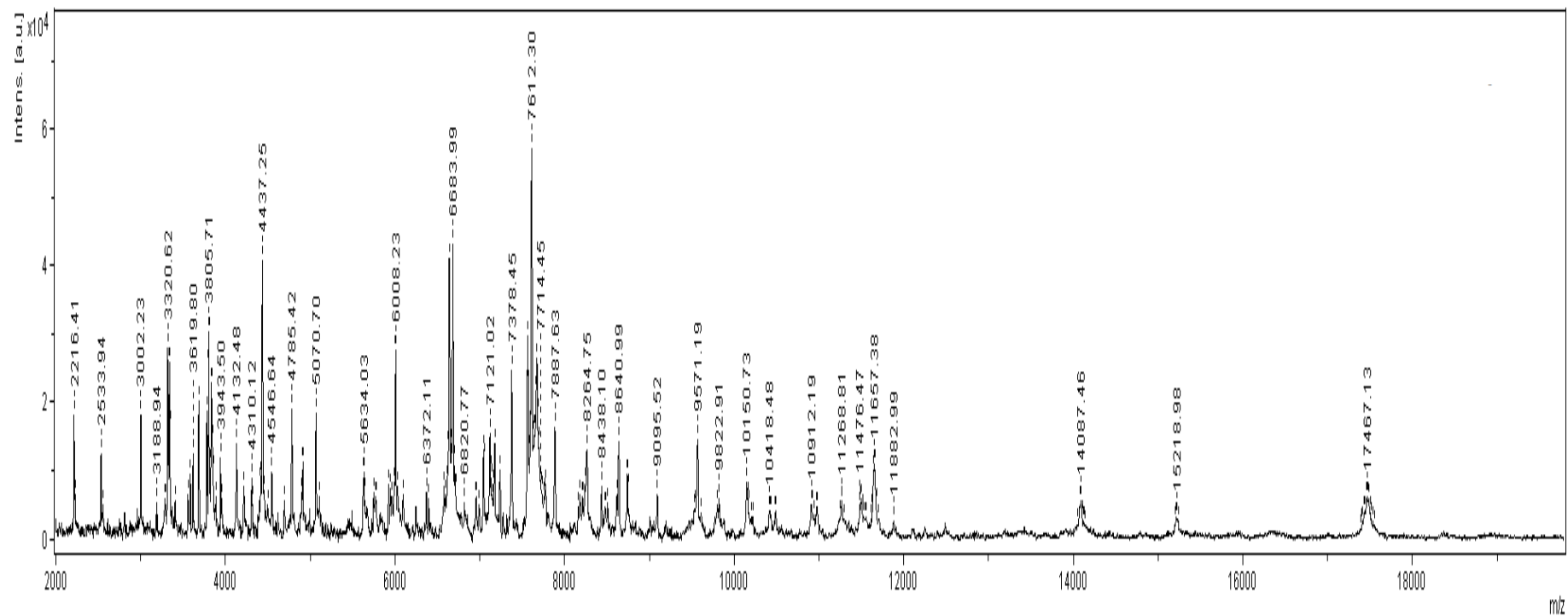


Рисунок 8.15 – МАЛДИ-масс-спектр клеточных белков штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4. Цифрами у пиков обозначены значения их масс (m/z)

#### 8.4. Профиль жирных кислот штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739

Штамм *Bacillus* sp. 739 был выделен из пахотной почвы Республики Башкортостан и обладает выраженной ЦГТ-азной активностью (Усанов и др., 1990). В дальнейшем, по совокупности фенотипических и биохимических признаков, а также на основании определения и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, указанный микроорганизм был отнесен к виду *Paenibacillus ehimensis* (Kuroshima et al., 1996; Lee et al., 2004; Федорова и др., 2012). Штамм продуцирует различные биологически активные вещества, такие как циклодестринглюканотрансферазы (Усанов и др., 1990; Федорова и др., 2011), хитиназу (Мелентьев, Актуганов, 1999), хитозаназу (Актуганов и др., 2003), внеклеточную гидролазу (Актуганов и др., 2007), экзополисахарид альгинатного типа (Худайгулов и др., 2011), фитогормоны (Архипова и др., 2006; Мелентьев, 2007; Arkhipova et al., 2007) и обладает антигрибной активностью (Мелентьев и др., 1994). Но таксономическое описание такого важного с практической точки зрения микроорганизма является неполным без сведений о составе жирных кислот клеточной стенки. В ходе настоящего исследования этот пробел был восполнен.

Всего у штамма *P. ehimensis* IB 739 идентифицировано 19 соединений с длиной цепи от 14 до 20 атомов углерода (табл. 8.7). Доминирующей являлась антеизо-пентадекановая (*anteiso*-C<sub>15:0</sub>) (что характерно для всего рода *Paenibacillus*) (Lee et al., 2004), составляющая 46,5% от суммы всех жирных кислот. Следующими по содержанию были антеизо-гептадекановая (*anteiso*-C<sub>17:0</sub>) – 20,5% и гексадекановая кислота (C<sub>16:0</sub>) – 9,0%. У типового штамма вида *P. ehimensis* КСТС 3748<sup>T</sup> также превалировала антеизо-пентадекановая кислота (52,9%), но количество гексадекановой кислоты и антеизо-гептадекановой было близко (7,1% и 8,0% соответственно) (Lee et al., 2004). Насыщенные кислоты, такие как, тетрадекановая (C<sub>14:0</sub>) (0,9%), пентадекановая (C<sub>15:0</sub>) (0,5%) гептадекановая (C<sub>17:0</sub>) (0,1%), октадекановая (C<sub>18:0</sub>) (2,3%) и эйкозановая (C<sub>20:0</sub>) (0,1%) выявлены только у штамма *P. ehimensis* IB 739.

Таблица 8.7 – Состав жирных кислот клеток штаммов *P. ehimensis* IB 739 и *P. ehimensis* КСТС 3748<sup>Т</sup> (Lee et al., 2004)

Жирная кислота	Содержание, % от суммарного	
	<i>P. ehimensis</i> IB 739	<i>P. ehimensis</i> КСТС 3748 <sup>Т</sup>
C <sub>14:0</sub>	0,9	н/д
<i>iso</i> -C <sub>14:0</sub>	0,4	н/д
C <sub>15:0</sub>	0,5	н/д
<i>iso</i> -C <sub>15:0</sub>	6,8	8,1
<i>anteiso</i> -C <sub>15:0</sub>	46,5	52,9
C <sub>16:0</sub>	9,0	7,1
<i>iso</i> -C <sub>16:0</sub>	2,4	8,6
C <sub>16:0alc</sub>	0,6	н/д
C <sub>16:1w11c</sub>	не обнаружено	5,2
<i>iso</i> -C <sub>16:1</sub>	0,2	н/д
C <sub>17:0</sub>	0,1	н/д
<i>iso</i> -C <sub>17:0</sub>	5,2	3,3
<i>anteiso</i> -C <sub>17:0</sub>	20,5	8,0
<i>iso</i> -C <sub>17:1</sub>	0,2	н/д
C <sub>18:0</sub>	2,3	н/д
C <sub>18:0alc</sub>	0,3	н/д
C <sub>18:1w9c</sub>	1,7	н/д
C <sub>18:1w7c</sub>	1,6	н/д
C <sub>18:2</sub>	0,9	н/д
C <sub>20:0</sub>	0,1	н/д

Примечание. «н/д» – нет данных.

Соединения с разветвленной углеродной цепью (*iso*-C<sub>15:0</sub>, *iso*-C<sub>16:0</sub> и *iso*-C<sub>17:0</sub>) присутствуют в спектре жирных кислот как у изучаемого (6,8%, 2,4% и 5,2% соответственно), так и у типового штамма *P. ehimensis* КСТС 3748<sup>Т</sup> (8,1%, 8,6% и 3,3% соответственно) (Lee et al., 2004). Также нами идентифицированы и минорные компоненты – это изомеры октадеценовой кислоты (C<sub>18:1</sub>) с разным положением двойной связи, содержание которых практически одинаково: (C<sub>18:1w9c</sub>) – 1,7% и (C<sub>18:1w7c</sub>) – 1,6% и октадекадиеновая кислота (C<sub>18:2</sub>) (0,9%). Еще одной характерной особенностью *P. ehimensis* IB 739 является наличие в жирнокислотном составе спиртов – (C<sub>16alc</sub>) (0,6%) и (C<sub>18alc</sub>) (0,3%).

\*\*\*

Таким образом, исходя из требований современной систематики прокариот изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства, проведены молекулярно-генетические исследования (определение и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего 16S рРНК и белок-кодирующих генов «домашнего хозяйства» (*gyrB*, *rpoB*, *rpoD*), выявление содержания ГЦ-пар в молекуле ДНК и уровня сходства тотальных геномов), исследованы филогенетическое положение и хемотаксономические особенности (состав жирных кислот клеточной стенки, белковый профиль и доминирующие хиноны клеток) и определена видовая принадлежность следующих микроорганизмов: *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, образующих нефтеокисляющий консорциум, выделенный из почвы, загрязненной дизельным топливом; психротолерантного штамма-нефтедеструктора *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, выделенного из нефтезагрязненной почвы Туруханского района Красноярского края, который является типовым представителем нового, таксономически узаконенного вида микроорганизмов *Pseudomonas turukhanskensis*; штамма *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, выделенного из пахотных почв и обладающего антигрибной активностью. Изучен состав жирных кислот клеточной стенки и тем самым дополнено таксономическое описание штамма *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН, обладающего способностью к синтезу различных биологически активных веществ, в т.ч. фитогормонов.



## ГЛАВА 9. СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗУЮЩИХ КОНСОРЦИУМ, А ТАКЖЕ ШТАММОВ *P. TURUKHANSKENSIS* ИБ 1.1<sup>Т</sup> И *P. KOREENSIS* ИБ-4

### 9.1. Окислительная активность консорциума, входящих в его состав микроорганизмов и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>

При попадании на поверхность почвы нефть может частично испаряться, разлагаться под действием ультрафиолета, удаляться поверхностными водами, аккумулироваться в растениях и других организмах и пр. Однако главным процессом разрушения нефтяных углеводородов является их биохимическое окисление при участии микроорганизмов, которое связано с наличием у них ферментной системы оксидаз смешанных функций (оксигеназ). Углеводороды нефти – это полностью восстановленные соединения, и первым этапом разложения является включение кислорода в их молекулу. Т.к. для начала этого процесса требуется наличие атмосферного кислорода в качестве акцептора электронов, то окисление углеводородов производится в основном аэробными микроорганизмами. Ферменты оксигеназы осуществляют введение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода, заменяя связи с малой энергией разрыва (С-С, С-Н) связями с большей энергией разрыва (С-О, Н-О) (Сваровская и др., 2007). В углеводородной смеси в первую очередь трансформируются молекулы, имеющие наименьшую энергию разрыва связей. Процесс происходит через серию каталитических реакций с образованием промежуточных продуктов метаболизма – спиртов, альдегидов, кетонов, жирных и карбоновых кислот, которые в конечном итоге окисляются до углекислого газа и воды. При этом для каждого микроорганизма характерен особый набор ферментов и свой путь окисления углеводородов.

Наличие способности к разложению углеводородов до конечных продуктов является очень важным с точки зрения экологической биотехнологии – благодаря этой особенности создаются предпосылки для использования таких микроорганизмов при разработке биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения.

Окислительная активность консорциума и входящих в его состав микроорганизмов оказалась значительной в отношении большинства использованных субстратов (табл. 9.1).

Таблица 9.1 – Окислительная активность консорциума и образующих его микроорганизмов

Источник углерода	Окислительная активность, мг CO <sub>2</sub> /г субстрата		
	Консорциум	<i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1	<i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2
Гептан	170±14	113±8	77±4
Декан	140±11	104±7	33±2
Ундекан	175±14	161±13	94±6
Додекан	181±15	153±12	116±8
Циклогексан	110±8	90±6	99±6
Изопропанол	89±5	71±4	62±3
Гексадеканол	219±18	215±18	91±6
Фенол	43±2	30±2	36±2
Бензол	96±6	69±3	85±5
Метилбензол	89±5	81±5	93±6
1,2-диметилбензол	100±7	92±6	76±4
Нафталин	92±6	53±2	88±5
Парафин	177±14	127±9	111±1
Нефть	144±11	112±8	84±5
Дизельное топливо	163±13	138±10	60±3
Смазочное масло	120±9	104±7	99±6

Способность к окислению углеводородов и их производных у штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 выше, чем у *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, за исключением циклических соединений и, скорее всего, является определяющей величиной для консорциума в целом. Вероятно, оксигенная система штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 более специфична для линейных углеводородов, чем для ароматических – его окислительная активность в отношении алканов

составляет 104-161 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата. Величина изучаемого показателя в отношении всех используемых соединений у индивидуальных штаммов ниже, чем у образуемого ими консорциума. Эти данные подтверждают мнение о том, что биопрепараты, состоящие из нескольких штаммов, в отличие от монокультур более полно утилизируют нефть и нефтепродукты (Делеган и др., 2016а, 2017; Mikesková et al., 2012).

Величина окислительной активности штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> оказалась достаточно высокой вне зависимости от используемого субстрата и температуры культивирования (исключение – фенол), хотя при 26°C этот показатель был ниже, чем при 8°C (табл. 9.2).

Таблица 9.2 – Окислительная активность штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>

Источник углерода	Окислительная активность, мг CO <sub>2</sub> /г субстрата	
	8°C	26°C
Гептан	134±10	88±4
Декан	130±9	102±5
Ундекан	148±11	127±9
Додекан	137±10	123±8
Гексадекан	141±10	113±7
Циклогексан	109±6	92±6
Изопропанол	116±7	92±5
Деканол	120±8	106±5
Фенол	74±4	39±2
Бензол	106±5	95±6
Метилбензол	137±10	95±6
1,2-диметилбензол	137±10	85±4
Нафталин	120±8	95±6
Нефть	169±12	155±12
Дизельное топливо	162±12	116±7
Смазочное масло	134±10	113±7

У изучаемого штамма обнаружена высокая способность к разложению парафиновых углеводородов (130-148 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при пониженной температуре и 88-127 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при комнатной температуре) и алкилированных ароматических соединений, несмотря на их токсичность для микроорганизмов (одинаковые значения 137 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 8°C и 95 и 85 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 26°C для метилбензола и 1,2-диметилбензола соответственно). Но наиболее полно идет биохимическое окисление нефти (169 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 8°C и 155 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 26°C) и дизельного топлива (162 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 8°C и 116 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 26°C), содержащих в своем составе сложные смеси углеводородов различных классов.

У штамма *P. koreensis* ИБ-4 способности к окислению углеводородных соединений, используемых в данном исследовании, обнаружено не было.

Т.к. почти все процессы аэробного метаболизма углеводородов включают в себя окисление субстрата при помощи ферментов оксигеназ, то можно предположить, что способность штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> к окислению углеводородов до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O связана с высокой активностью оксигеназного ферментного комплекса. Это очень важное в практическом плане свойство, благодаря которому изучаемые бактерии могут применяться в биотехнологии в качестве основы биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

## **9.2. Нитрогеназная активность штаммов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> и *P. koreensis* ИБ-4**

В процессе загрязнения нефтью в почву попадает большое количество углерода, которое вызывает резкое изменение соотношения C:N и приводит снижению обеспеченности нефтеокисляющих микроорганизмов таким важным микроэлементом как азот. Возникший дефицит чаще всего устраняют путем внесения больших объемов минеральных азотных удобрений, что является

экономически невыгодным, а, зачастую, и бесполезным т.к. не учитывается неодинаковое влияние различных форм удобрений и их количества на интенсивность азотфиксации (Терещенко и др., 2004). К тому же, высокие дозы минеральных удобрений могут приводить к солевой фитотоксичности и микробному токсикозу почв (Шаронова, 2009; Chaîneau et al., 2003, 2005).

Вместе с тем, в природных экосистемах баланс биогенных элементов сохраняется за счет деятельности азотфиксирующих микроорганизмов, которые обеспечивают до 90% содержания азота в почве (Емцев, Мишустин, 2006). Интенсивность поступления в почву атмосферного азота, осуществляемого диазотрофными микроорганизмами, напрямую влияет на активность углеводородокисляющих бактерий (Терещенко и др., 2004). Поэтому внесение в загрязненную нефтью и нефтепродуктами почву полифункциональных биопрепаратов, способных не только к деградации ксенобиотиков, но и к восстановлению плодородия почвы за счет обогащения ее азотом, является эффективным биотехнологическим приемом.

Известен целый ряд бактерий, усваивающих углеводороды, которые обладают способностью связывать молекулярный азот атмосферы. Так, существует много данных о способности представителей р. *Pseudomonas* к разложению нефтяных загрязнений; созданы биопрепараты-нефтедеструкторы на основе этих микроорганизмов (Филонов и др., 2010а; Рогозина и др., 2013а, 2013б). Азотфиксирующие свойства выявлены у штаммов *P. saccharophila*, *P. delafieldii*, *P. aurantiaca* и др. (Лысак, 2007). Также имеются сведения, что в холодных климатических зонах в ризосфере растений азотфиксирующие бактерии р. *Pseudomonas* доминируют над представителями других таксономических групп диазотрофов (Боронин, 1998; Моргун и др., 2009; Hoover, Pikuta, 2010).

Показано, что свободноживущие азотфиксаторы р. *Ochrobactrum* способны к разложению различных углеводов и нефти (Eraky et al., 2015; Abou-Shanab et al., 2016; Obi et al., 2016), к нодуляции корней растений (Trujillo et al., 2005;

Zurdo-Piñeiro et al., 2007; Imran et al., 2010) и обладают денитрифицирующей активностью (Song et al., 2000).

Принимая во внимание вышесказанное, была изучена способность к азотфиксации у микроорганизмов, образующих консорциум, а также у штаммов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> и *P. koreensis* ИБ-4 при культивировании в условиях комнатной и низкой положительной температуры (26°C и 8°C), при использовании различных источников углерода, таких как маннит (контроль), декан, метилбензол и 2-метилнафталин, а также степень биodeградации этих соединений и динамика численности микроорганизмов в ходе эксперимента.

Результаты исследования способности штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 к диазотрофии, изменению численности микроорганизмов и деструкции углеводов в ходе этого процесса представлены в таблице 9.3.

Таблица 9.3 – Численность микроорганизмов штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, его нитрогеназная активность и степень биodeградации углеводов в процессе азотфиксации

Источник углерода	Титр, КОЕ/мл		Нитрогеназная активность, мкг N <sub>2</sub> /мл/ч		Биodeградация углеводов, %	
	8°C	26°C	8°C	26°C	8°C	26°C
Маннит	(2,9±0,2)·10 <sup>6</sup>	(1,8±0,1)·10 <sup>7</sup>	0,14±0,01	0,19±0,01	–	–
Декан	(6,7±0,2)·10 <sup>6</sup>	(8,3±0,4)·10 <sup>6</sup>	0,31±0,02	0,06±0,005	53,7±1,5	88,6±3,5
Метилбензол	(9,6±0,4)·10 <sup>6</sup>	(3,0±0,2)·10 <sup>6</sup>	0,44±0,03	0,19±0,01	56,3±1,8	95,4±5,2
2-метилнафталин	(3,0±0,1)·10 <sup>6</sup>	(4,7±0,3)·10 <sup>6</sup>	0,24±0,01	0,02±0,001	18,5±1,1	25,0±1,8

Примечание: начальный титр бактериальной суспензии при 8°C – 3,3·10<sup>5</sup> КОЕ/мл, при 26°C – 2,8·10<sup>5</sup> КОЕ/мл.

При выращивании на среде с маннитом, нитрогеназная активность штамма была практически одинаковой как при комнатной (0,19 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч), так и при низкой положительной температуре (0,14 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч). При использовании метилбензола способность к фиксации азота при 26°C осталась такой же, как в случае с маннитом (0,19 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч), а при 8°C – увеличилась до 0,44 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч. На среде с деканом и 2-метилнафталином при комнатной температуре

бактерии *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 проявляют очень низкую азотфиксирующую активность (0,06 и 0,02 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч соответственно). При понижении температуры до 8°C этот показатель резко возрастает в 12 раз при применении 2-метилнафталина как источника углерода и энергии (с 0,02 до 0,24 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч) и увеличивается в 5 раз при культивировании на среде с деканом.

Происходящая в ходе азотфиксации деградация бактериями углеводородного субстрата, наоборот, увеличивалась с ростом температуры. Высокие показатели биодеструкции при 26°C были достигнуты для метилбензола (95,4%) и декана (88,6%) (табл. 9.3).

Во время опыта количество микроорганизмов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 увеличивалось на один порядок, и при 8°C, и при 26°C, за исключением варианта, когда бактерии культивировали на среде с маннитом при комнатной температуре. В этом случае численность возрастала с  $2,8 \cdot 10^5$  до  $1,8 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. (табл. 9.3).

Численность и нитрогеназная активность микроорганизмов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> при различных температурах и источниках углерода, а также степень биодegradации этих веществ в ходе эксперимента представлена в таблице 9.4.

Таблица 9.4 – Численность микроорганизмов штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, его нитрогеназная активность и степень биодegradации углеводов в процессе азотфиксации

Источник углерода	Титр, КОЕ/мл		Нитрогеназная активность, мкг N <sub>2</sub> /мл/ч		Биодegradация углеводов, %	
	8°C	26°C	8°C	26°C	8°C	26°C
Маннит	$(7,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	0,17±0,01	0,08±0,005	–	–
Декан	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^6$	0,09±0,006	0,03±0,001	71,2±4,3	56,3±3,3
Метилбензол	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^6$	0,26±0,02	0,12±0,01	67,3±4,1	52,0±4,6
2-метилнафталин	$(9,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(7,7 \pm 0,3) \cdot 10^6$	0,35±0,02	0,25±0,02	43,0±2,5	22,0±1,3

Примечание: начальный титр бактериальной суспензии при 8°C –  $1,4 \cdot 10^5$  КОЕ/мл, при 26°C –  $7,7 \cdot 10^5$  КОЕ/мл.

Рост численности микроорганизмов в ходе опыта составил один порядок, как при комнатной, так и при низкой положительной температуре. При выращивании на среде с маннитом, нитрогеназная активность штамма при 26°C (0,08 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч) была в два раза ниже по сравнению с таковой при 8°C (0,17 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч). Аналогичная картина наблюдалась для данного показателя и при потреблении в качестве субстрата метилбензола – 0,12 N<sub>2</sub>/мл/ч при 26°C и 0,26 N<sub>2</sub>/мл/ч при 8°C. Наиболее низкая способность к азотфиксации при комнатной температуре обнаружена при применении декана как источника углерода и энергии (0,03 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч), а самая высокая – 2-метилнафталина (0,25 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч). Также на среде с этим углеводородом бактерии *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> проявляют самую высокую способность к diazотрофии и при низкой положительной температуре (0,35 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч). Таким образом, нитрогеназная активность изучаемого штамма с понижением температуры возрастает.

Происходящая в процессе азотфиксации деградация углеводородного субстрата также увеличивалась с понижением температуры (табл. 9.4). Наиболее значительные показатели биодеструкции были достигнуты для декана – 71,2% при 8°C и 56,3% – при 26°C.

В целом, можно отметить, что при использовании в качестве субстратов углеводов, нитрогеназная активность штаммов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> с понижением температуры возрастает что, возможно, свидетельствует о наличии у них альтернативной ванадий-содержащей нитрогеназы, способствующей эффективной фиксации азота в условиях низкой положительной температуры (Igarashi, Seefeldt, 2003; Bellenger et al., 2008). В ходе эксперимента численность микроорганизмов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> возрастала на один порядок и при 8°C, и при 26°C. В процессе азотфиксации происходила биодegradация углеводов, причем у штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 она была эффективнее при комнатной, а у штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> – при низкой положительной температуре, еще раз подтверждая психротолерантные свойства этого микроорганизма.



В связи с тем, что у штамма *P. koreensis* ИБ-4 не было обнаружено способности к окислению углеводов, то при исследовании нитрогеназной активности в качестве источника углерода и энергии использовали только маннит. Установлено, что штамм *P. koreensis* ИБ-4 обладал значительной нитрогеназной активностью при комнатной температуре –  $(0,65 \pm 0,02)$  мкг  $N_2$ /мл/ч, сопоставимой с таковой у известных азотфиксаторов из коллекции ВКМ – *Azotobacter vinelandii* В-1617 и *A. chroococcum* В-1616 ( $(0,64 \pm 0,03)$  и  $(0,66 \pm 0,02)$  мкг  $N_2$ /мл/ч соответственно). Азотфиксирующей активности при низкой положительной температуре у штамма *P. koreensis* ИБ-4 не выявлено.

У штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 способности к азотфиксации обнаружено не было.

### **9.3. Потенциальная нитрогеназная активность почвы, инокулированной штаммом *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>**

Потенциальная нитрогеназная активность почвенных проб с внесенными бактериями *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 как при 8°C, так и при 26°C была значительно выше, чем у контрольных образцов, содержащих только эндогенные микроорганизмы (табл. 9.5). Причем, при низкой положительной температуре при использовании в качестве субстрата маннита, азотфиксирующая способность инокулированной почвы возрастала незначительно (в 1,12 раза), а при применении углеводов различной химической природы азотфиксация увеличивалась в 1,87-2,47 раза (метилбензол и 2-метилнафталин, соответственно). При 26°C самое высокое значение потенциальной нитрогеназной активности в контроле было у образцов с 2-метилнафталином (1646 мкг  $N_2$ /кг/ч), которое при инокулировании почвы *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 возросло в 1,35 раза (2222 мкг  $N_2$ /кг/ч). При комнатной температуре наивысший показатель потенциальной нитрогеназной активности наблюдался у почвы, загрязненной метилбензолом – 2523 мкг  $N_2$ /кг/ч (в контроле – 1173 мкг  $N_2$ /кг/ч, увеличение в 2,15 раза).

Таблица 9.5 – Потенциальная нитрогеназная активность почвенных образцов с эндогенной микробиотой и инокулированных бактериями *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Источник углерода	Потенциальная нитрогеназная активность почвы, мг N <sub>2</sub> /кг/ч			
	8°С		26°С	
	До инокуляции	После инокуляции	До инокуляции	После инокуляции
Маннит	1165±95	1303±101	990±76	2040±140
Декан	1016±75	2075±156	959±77	1852±115
Метилбензол	1074±84	2011±150	1173±84	2523±159
2-метилнафталин	950±68	2349±168	1646±126	2222±146

В случае с маннитом и деканом потенциальная нитрогеназная активность была схожей как у почвы с аборигенной микробиотой (990 и 959 N<sub>2</sub>/кг/ч, соответственно), так и у проб с внесенными бактериями (2040 и 1852 N<sub>2</sub>/кг/ч, соответственно).

При низкой положительной температуре при применении в качестве субстратов углеводов различной химической природы азотфиксирующая способность почвы, инокулированной бактериями *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, по сравнению с неинокулированной увеличивалась в 1,73 (метилбензол), 1,83 (декан) и 2,16 раза (2-метилнафталин) (табл. 9.6). При использовании маннита в тех же условиях этот показатель возрастал незначительно (в 1,19 раза). При комнатной температуре наивысшее значение потенциальной нитрогеназной активности наблюдалось у почвы, загрязненной 2-метилнафталином – в контроле оно составило 1646 мг N<sub>2</sub>/кг/ч, а после обработки бактериями увеличилось в 1,36 раза (2235 мг N<sub>2</sub>/кг/ч). Но наиболее полно при 26°С происходит возрастание потенциальной способности к фиксации азота у почвы с метилбензолом после внесения в нее штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> (в 1,65 раза). Потенциальная нитрогеназная активность при 26°С у почвы с маннитом и деканом была схожей и при наличии только аборигенной микробиоты (990 и 959 N<sub>2</sub>/кг/ч соответственно), и в случае инокулирования бактериями (1425 и 1340 N<sub>2</sub>/кг/ч соответственно).

Таблица 9.6 – Потенциальная нитрогеназная активность почвенных образцов с эндогенной микробиотой и инокулированных бактериями *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>

Источник углерода	Потенциальная нитрогеназная активность почвы, мг N <sub>2</sub> /кг/ч			
	8°С		26°С	
	До инокуляции	После инокуляции	До инокуляции	После инокуляции
Маннит	1165±95	1384±99	990±76	1425±102
Декан	1016±75	1858±123	959±77	1340±103
Метилбензол	1074±84	1858±123	1173±84	1936±148
2-метилнафталин	950±68	2049±148	1646±126	2235±178

Таким образом, штаммы бактерий *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> имеют значительный биотехнологический потенциал. Они окисляют углеводороды, нефть и продукты ее переработки до конечных веществ – углекислого газа и воды, способны к diazotrophy, а также повышают потенциальную нитрогеназную активность почвы, способствуя увеличению в ней содержания азота. Эти бактерии можно использовать для разработки полифункциональных микробных препаратов, очищающих почву от нефтяного загрязнения и способствующих ее восстановлению за счет фиксации атмосферного азота. Штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> обладает указанными свойствами и при низкой положительной температуре. Помимо прочего, его применение будет способствовать удлинению биорекультивационного периода, что особенно важно в районах с умеренным и холодным климатом и коротким вегетационным сезоном.

#### 9.4. Способность штамма *P. koreensis* ИБ-4 к продукции фитогормонов

Ранее показано, что некоторые представители р. *Pseudomonas* способны продуцировать цитокининоподобные вещества, гиббереллины и гетероауксины, стимулирующие рост и развитие растений (Pattern, Glick, 2002). Нами установлено, что штамм *P. koreensis* ИБ-4 вырабатывает такие фитогормоны, как

ИУК и цитокининоподобные вещества на уровне  $(40\pm 2)$  и  $(119\pm 6)$  нг/мл культуральной жидкости соответственно. ИУК стимулирует рост корней растений и кущение, а цитокинины способствуют росту побегов, замедляют старение листьев и ингибируют развитие корней.

### **9.5. Поверхностно-активные свойства штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1**

Важнейшим механизмом, благодаря которому микроорганизмы разлагают слабо-растворимые или нерастворимы в воде нефтяные углеводороды, является образование ими поверхностно-активных веществ (биоПАВ или биосурфактантов). Эти соединения снижают натяжение поверхности у границы раздела фаз, как в водных растворах, так и смесях углеводородов. Они способствуют солюбилизации углеводородов, образованию мелкодисперсной эмульсии, в результате чего увеличивается поверхность контакта микробных клеток с гидрофобным субстратом и облегчается его поступление внутрь клетки. Биосурфактанты нетоксичны, не наносят вред окружающей среде, обладают высокой биоразлагаемостью, а также не теряют активность при экстремальных значениях температуры, солёности, pH (Desai, Banat, 1997; Lima et al., 2011; Marchant, Banat, 2012). Благодаря этим качествам биоПАВ применяются в экологической биотехнологии для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения (Pirog et al., 2017).

Наличие у микроорганизмов способности к синтезу биоПАВ в первую очередь оценивается по снижению поверхностного натяжения на границе раздела жидкая среда – воздух и по эмульгированию жидких гидрофобных субстратов (Willumsen, Karlson, 1997). Уменьшение поверхностного натяжения более чем на 40 мН/м (Cooper, 1986) или по другим данным более чем на 20 мН/м (Willumsen, Karlson, 1997) свидетельствует о том, что микроорганизм является перспективным продуцентом биосурфактантов.

Эта особенность достаточно широко распространена среди микроорганизмов (Cameotra et al., 2010). Например, бактерии р. *Acinetobacter* образуют высокомолекулярные и низкомолекулярные ПАВ, обладающие

эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами (Антонюк, Конон, 2012; Павлюковец и др., 2014; Walzer et al., 2006; Pirog et al., 2013a, 2013b, 2015b, 2015c, 2017; 2018). Многие микроорганизмы р. *Pseudomonas* способны к синтезу низкомолекулярных ПАВ (Desai, Banat, 1997; Monteiro et al., 2007; Abdel-Mawgoud et al., 2010; Soberon-Chavez, 2011). Есть сведения о бактериях о. *Ochrobactrum*, продуцирующих биосурфактанты гликолипидной природы (Bezza et al., 2015; Bezza, 2016; Ibrahim, 2018).

Исходя из вышесказанного, была изучена способность к образованию поверхностно-активных веществ у штаммов, входящих в состав консорциума, а также у микроорганизмов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> и *P. koreensis* ИБ-4.

У бактерий *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> и *P. koreensis* ИБ-4 способность к синтезу биосурфактантов не была обнаружена.

Клетки штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 в процессе роста на среде Раймонда с гексадеканом продуцировали внеклеточные ПАВ, снижающие поверхностное натяжение жидкости до  $39 \pm 1$  мН/м, в то время как в контроле (чистой минеральной среде) поверхностное натяжение было равно  $64 \pm 1$  мН/м. Кроме того, синтезируемые клетками штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 биосурфактанты солюбилизируют гидрофобные субстраты – индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ) при смешивании супернатанта культуральной жидкости с подсолнечным маслом был 72%, с бензином – 62%, а при использовании дизельного топлива или смазочного масла – 55%.

Таким образом, показано, что среди изучаемых микроорганизмов только бактерии *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 при культивировании на гексадекане способны к образованию внеклеточных биоПАВ, солюбилизирующих гидрофобные вещества. Это свойство в сочетании со значительной окислительной активностью (п. 9.1.1) свидетельствует о перспективности применения указанного штамма для очистки окружающей среды от нефтяных углеводородов.

### 9.6. Фитотоксичность бактериальных штаммов

К микроорганизмам, применяемым в экологической биотехнологии, предъявляются определенные эколого-гигиенические требования, одним из которых является отсутствие токсичности для живых организмов (Вельков, 2001). Поэтому штаммы *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИБ 739 были исследованы на предмет возможности их отрицательного влияния на растительные объекты.

Установлено, что ни один из исследуемых штаммов не обладает фитотоксичностью, о чем свидетельствуют данные по числу проросших семян и их морфометрические показатели (табл. 9.7).

Таблица 9.7 – Количество проросших семян горчицы белой и их ростовые характеристики

Варианты опыта	Количество проросших семян		Длина корня		Длина проростка	
	шт.	% к контролю	мм	% к контролю	мм	% к контролю
Контроль	29±1,0	100	48,5±1,5	100	33,0±1,3	100
<i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1	26±1,4	89,7	43,8±1,4	90,3	27,7±1,2	81,9
<i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2	27±1,1	93,1	47,2±1,5	97,3	30,8±2,2	91,3
<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	27±1,3	93,1	45,6±1,7	94,0	29,7±1,9	90,0
<i>P. koreensis</i> ИБ-4	28±1,0	96,6	46,7±1,2	96,3	31,1±1,9	94,2
<i>P. ehimensis</i> ИБ 739	27±1,8	93,1	44,4±2,1	91,5	32,1±1,5	97,3

\*\*\*

Т.о., в ходе исследований установлено, что консорциум и образующие его бактерии *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 обладают значительной окислительной активностью в отношении широкого круга углеводов, нефти и нефтепродуктов, причем величина этого показателя выше у консорциума. Высокая углеводородокисляющая активность выявлена и у штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, в т.ч. и при низкой положительной температуре. Обнаружена способность штаммов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P.*

*turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> к фиксации атмосферного азота и увеличению потенциальной нитрогеназной активности почвы, даже при низкой положительной температуре. Показано, что штамм *P. koreensis* ИБ-4 обладает значительной нитрогеназной активностью, а также продуцирует фитогормоны – ИУК и цитокининподобные вещества. Выявлено, что штамм *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 синтезирует внеклеточные ПАВ, эмульгирующие гидрофобные углеводородные субстраты. Доказано отсутствие фитотоксических свойств у всех бактериальных штаммов, используемых в настоящей работе, включая штамм *P. ehimensis* ИВ 739, продуцирующий фитогормоны, из коллекции УИБ УФИЦ РАН. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> в экологической биотехнологии в качестве основы биопрепаратов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтезагрязнения, а штаммов *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ – как дополнительных компонентов для ускорения этого восстановления. Для проверки выдвинутой гипотезы была проведена серия лабораторных и полевых экспериментов.

## **ГЛАВА 10. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ПРОВЕРКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗУЧЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТОВ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕФТЯНЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

В серии лабораторных экспериментов было проверено предположение о том, что выделенные в ходе настоящего исследования консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> могут применяться в качестве основы биопрепаратов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтезагрязнения, а штаммы *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИБ 739 (из коллекции УИБ УФИЦ РАН) – как дополнительные компоненты биопрепаратов для ускорения этого восстановления.

### **10.1. Очистка сточной воды, содержащей углеводороды, с помощью консорциума микроорганизмов**

#### ***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

На современных предприятиях, относящихся к нефтедобывающей, нефтехимической или другим отраслям промышленности, образуются значительные объемы производственных сточных вод, содержащих большие количества органических загрязнителей, в т.ч. и трудноокисляемых нефтепродуктов, представляющих серьезную угрозу для водных объектов. В связи с этим возникает необходимость в эффективной и качественной очистке сточных вод, которая является необходимым условием сохранения чистоты водоемов.

Биологическая очистка стоков производства активным илом в аэротенках не эффективна по отношению ко многим токсичным соединениям, которые поступают на очистные сооружения в количествах, значительно превышающих ПДК (Методические указания..., 2000). Поэтому задачей биотехнологического подхода является предварительное удаление из производственных сточных вод высоких концентраций загрязняющих веществ еще на подходах к основному



сооружению, т.е. на установках локальной очистки с помощью специально подобранных микроорганизмов.

ОАО «Стеклонит» (г. Уфа) изготавливает стеклониты, стеклосетки и стеклоткани. В производстве стеклянного волокна широко применяется замасливатель «парафиновая эмульсия», в состав которого входят следующие углеводородные компоненты (%): парафин – 1,6; стеарин или синтетические жирные кислоты ( $C_{16}$ - $C_{18}$ ) – 0,6-1,0; вазелин – 2,0; трансформаторное масло – 2,0; а также закрепитель ДЦУ-ТСТ (продукт взаимодействия дициандиамида с формалином в присутствии уксусной кислоты) – 2,0-2,5 и препарат ОС-20 (смесь полиэтиленгликолевых эфиров высших жирных спиртов) – 1,25; вода – до 100.

Перечисленные вещества попадают в сточные воды предприятия, которые собираются в отстойнике-накопителе.

#### **10.1.1. Исследование возможности роста консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 на индивидуальных загрязняющих компонентах, присутствующих в сточной воде**

В результате проведенных экспериментов обнаружено, что консорциум микроорганизмов способен утилизировать индивидуальные компоненты-загрязнители сточной воды (парафин, стеарин, вазелин, трансформаторное масло, препарат ОС-20), за исключением препарата ДЦУ-ТСТ (АО «Пигмент», г. Тамбов, ТУ 6-38-05800142-270-98), что вероятно, связано с токсичностью входящих в его состав избыточных количеств свободного формальдегида и уксусной кислоты.

#### **10.1.2. Изучение эффективности процесса очистки сточной воды с помощью консорциума микроорганизмов**

Сточная вода ОАО «Стеклонит» (г. Уфа) характеризуется высокой мутностью, низкой численностью УОМ ( $1,7 \cdot 10^3$  КОЕ/мл) и перед началом испытания содержала загрязняющие вещества в количестве 6,77 масс.%.

Внесение в сточную воду консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 привело к снижению содержания загрязняющих веществ на 83,16% и увеличению численности углеводородокисляющих микроорганизмов на один порядок к концу эксперимента. Под действием аборигенных микроорганизмов после завершения опыта степень биодеструкции составила только 37,22%, возрастания численности УОМ не отмечено (табл. 10.1).

Таблица 10.1 – Степень биодegradации загрязняющих веществ и численность УОМ в сточной воде ОАО «Стеклонит»

Время культиви-рования, сут	Вариант опыта			
	Сточная вода + консорциум		Сточная вода (контроль)	
	Титр УОМ, КОЕ/мл	Степень биодegradации, масс. %	Титр УОМ, КОЕ/мл	Степень биодegradации, масс. %
3	$(6,1 \pm 0,8) \cdot 10^3$	48,30	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^3$	7,24
5	$(4,0 \pm 1,2) \cdot 10^4$	73,85	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^4$	11,82
7	$(5,3 \pm 0,2) \cdot 10^5$	76,07	$(7,9 \pm 0,9) \cdot 10^4$	11,96
9	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$	77,25	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	20,09
11	$(8,0 \pm 2,2) \cdot 10^6$	80,94	$(8,3 \pm 2,6) \cdot 10^4$	23,34
13	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$	82,86	$(3,2 \pm 1,1) \cdot 10^4$	29,39
15	$(1,6 \pm 2,5) \cdot 10^4$	83,16	$(8,7 \pm 1,9) \cdot 10^3$	37,22

Таким образом, в условиях лабораторного эксперимента показана возможность биологической очистки от углеводородсодержащего загрязнения сточной воды ОАО «Стеклонит» под действием консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2.

## 10.2. Биоремедиация нефтезагрязненных грунтов месторождений Жетыбай и Каламкас с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Нефтезагрязненные (замазученные) грунты в больших количествах образуются в результате проливов нефтепродуктов на земную поверхность в процессе производства либо при аварийных ситуациях, очистке технологического оборудования, демонтаже резервуаров и пр. После выемки и складирования в специальных шламонакопителях они превращаются в крупнотоннажные промышленные отходы (нефтешламы), которые занимают площади в десятки квадратных километров, уродуют ландшафты и загрязняют окружающую среду, что делает проблему их обезвреживания очень актуальной.

Эксперимент проводили в сосудах объемом 3 л, в которые помещали по 1 кг загрязненного грунта или загрязненного грунта в смеси с песком. С учетом высокой концентрации загрязнителя (44,35%), грунт месторождения Жетыбай перемешивали со стерильным песком в соотношениях 1:1 или 1:3, а образцы с территории месторождения Каламкас (содержание поллютанта 18,26%) – в соотношении 1:1. Консорциум микроорганизмов вносили дважды в дозе  $2 \cdot 10^8$  КОЕ/г грунта.

Микробиологические анализы исходных проб показали, что численность гетеротрофных микроорганизмов в образцах нефтезагрязненных грунтов, находилась в интервале  $(3-5) \cdot 10^7$  КОЕ/г, УОМ –  $(5-7) \cdot 10^6$  КОЕ/г.

Проведение комплекса рекультивационных мероприятий (внесение консорциума микроорганизмов, минеральных удобрений, разбавление песком) способствовало повышению численности гетеротрофных микроорганизмов в обоих грунтах на 3 порядка – до  $(3-4) \cdot 10^{10}$  КОЕ/г и увеличению количества бактерий-нефтедеструкторов на 2 порядка до  $(5-8) \cdot 10^8$  КОЕ/г. Также в ходе эксперимента удалось снизить содержание загрязнителя в грунтах обоих месторождений (табл. 10.2).

Таблица 10.2 – Изменение концентрации нефтепродуктов и степень биодegradации загрязнения в грунтах месторождений Жетыбай и Каламкас

Вариант опыта (добавки к грунту)	Концентрация нефтепродуктов, %				Степень биодegradации, %
	Исходное	14 сутки	28 сутки	42 сутки	
Месторождение Каламкас					
Контроль (только грунт)	18,26±1,81	18,04±1,62	18,00±1,92	17,95±1,61	1,7
Песок (1:1) + консорциум	9,90±0,77	7,45±0,68	6,52±0,62	5,30±0,49	46,5
Консорциум	17,55±1,79	14,48±1,13	12,62±1,18	10,14±0,99	42,2
Месторождение Жетыбай					
Контроль (только грунт)	44,35±4,46	44,31±4,20	44,28±4,02	44,11±4,33	0,5
Песок (1:3) + консорциум	10,00±0,83	5,39±0,29	3,40±0,18	2,51±0,20	74,9
Песок (1:1) + консорциум	22,18±2,09	20,20±1,60	18,39±1,70	15,48±1,40	30,2
Консорциум	44,48±4,16	41,62±4,02	40,55±3,96	37,15±3,52	16,5

Степень биодеструкции загрязнителя в грунте месторождения Каламкас мало зависела от его разбавления песком и после 6 недель эксперимента составила 42,2 и 46,5%, тогда как в грунте месторождения Жетыбай степень разложения поллютанта достигала максимума (74,9%) при его перемешивании с песком в соотношении 1:3. Применение только консорциума незначительно снижало содержание поллютанта – его биодеструкция составила 16,5%.

С помощью аборигенной микробиоты количество поллютанта в грунте месторождения Каламкас снизилось незначительно – на 1,7%, а в грунте месторождения Жетыбай уменьшения концентрации загрязнителя практически не произошло – разница с исходным содержанием составила 0,5%.

Таким образом, в лабораторном опыте установлено, что проведение комплекса рекультивационных мероприятий с применением консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 способствовало очистке грунтов, загрязненных нефтепродуктами (степень биодеструкции поллютанта составила 42,2-46,5% и 16,5-74,9% для различных вариантов опыта) и повышению в них численности гетеротрофных микроорганизмов на 3 порядка и УОМ – на 2 порядка.

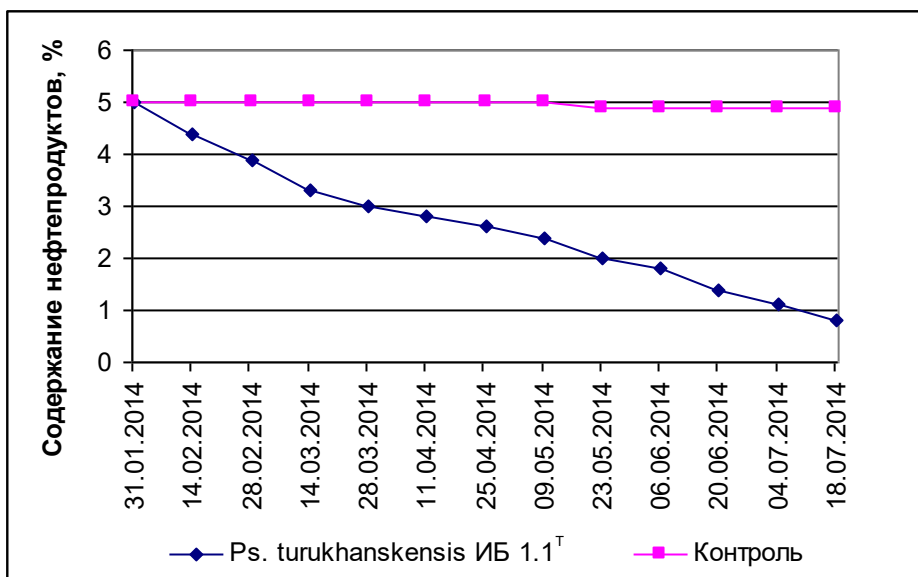
### 10.3. Биоремедиация нефтезагрязненного песка штаммом

#### *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Г</sup>

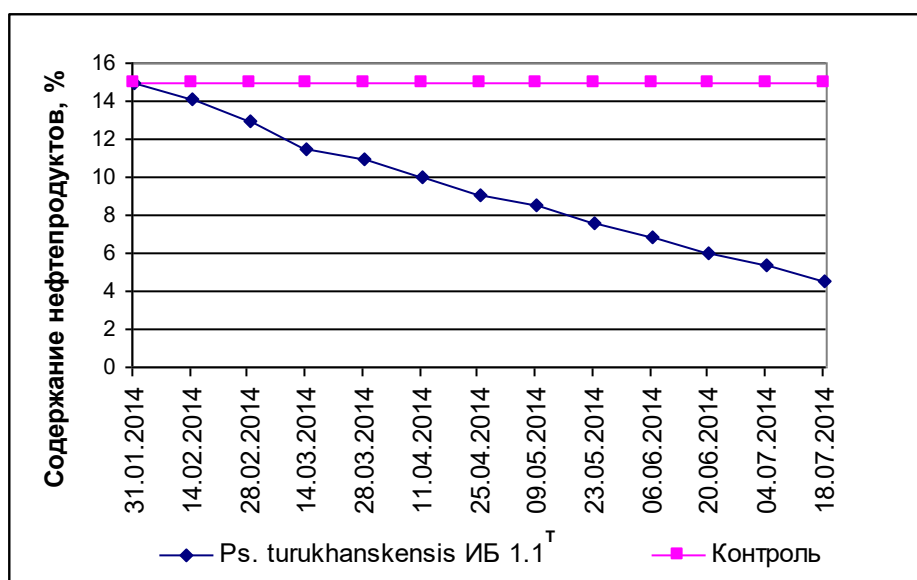
Мангистауская область расположена на юго-западе Республики Казахстан и является крупным промышленным и нефтедобывающим регионом. Почвы Мангистау относятся к пустынной ландшафтной зоне и характеризуются очень ограниченным содержанием гумуса, маломощностью и бесструктурностью перегнойного горизонта, а также высокой засоленностью. Среди них преобладают пески, которые легко поддаются эрозии, хорошо проводят воздух и влагу, но не способны ее удержать, быстро прогреваются, но также стремительно остывают. Для региона характерна крайняя засушливость, сильные ветры и частые пыльные бури. Все это приводит к тому, что экосистемы данной местности отличаются высокой уязвимостью и низким потенциалом самоочищения. В таких условиях применение высокоэффективных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов способствует более эффективной очистке нефтезагрязненных территорий и позволяет сократить сроки восстановления нарушенных экосистем.

В сосуды помещали по 500 г песка, отобранного в окрестностях г. Жанаозен (Мангистауская обл., Республика Казахстан), в который вносили нефть в концентрации 5 или 15% (50 и 150 г/кг) и 100 мл суспензии штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Г</sup> с титром  $2,2 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Культивирование проводили при 4-8°C в течение 6 месяцев. Интродукцию бактерий осуществляли 1 раз в месяц.

Благодаря внесению штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Г</sup> по завершении опыта содержание нефти в песке снизилось до 0,8%, а степень биодеструкции поллютанта достигла 84% при исходном 5% уровне загрязнения (рис. 10.1А). При 15%-ом загрязнении содержание поллютанта упало до 4,5%, а степень биоразложения составила 70% (рис. 10.1Б).



А)



Б)

Рисунок 10.1 – Содержание нефти в песке. А) – исходный уровень загрязнения 5%; Б) – исходный уровень загрязнения 15%.

Дробное внесение бактерий позволило стабилизировать численность гетеротрофных микроорганизмов и УОМ в песке на достаточно высоком уровне –  $10^7$  КОЕ/г (при начальном титре для обеих групп микроорганизмов менее  $10^3$  КОЕ/г), независимо от начального содержания нефти (табл. 10.3).



В образцах песка только с аборигенной микробиотой убыль загрязняющих веществ была крайне незначительной – 0,1% (в обоих случаях), а биodeградация нефтепродуктов составила всего 2 и 0,7% (при 5 и 15% содержании поллютанта соответственно), количество гетеротрофных микроорганизмов увеличилось только на 1 порядок (с  $10^2$  до  $10^3$  КОЕ/г), а численность УОМ под влиянием контаминации нефтью в начале эксперимента возросла на 1-2 порядка, но потом снизилась до прежнего уровня – менее  $10^3$  КОЕ/г.

Таким образом, в лабораторных условиях при низкой положительной температуре благодаря внесению штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> удалось уменьшить содержание нефти в песке до 0,8 и 4,5% (при 5 и 15% уровне загрязнения соответственно) и увеличить численность в нем гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов на 5 порядков (при начальном титре обеих групп микроорганизмов менее  $10^3$  КОЕ/г). Данные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> для очистки нефтезагрязненного песка в сложных почвенно-климатических условиях Западного Казахстана.

#### **10.4. Проверка возможности применения комбинаций бактерий с различной функциональной активностью для снижения содержания нефти в почве и активизации роста и развития растений**

Наиболее эффективным, экологически чистым и экономически выгодным методом реабилитации нефтезагрязненных земель является биоремедиация. Она заключается в обработке грунтов биопрепаратами углеводородокисляющих микроорганизмов, что позволяет значительно снизить содержание поллютанта в очищаемом объекте. Часто после этого производят посев дернообразующих сортов растений для того, чтобы они своей корневой системой содействовали предотвращению эрозионных процессов механического состава, улучшали газо-воздушный режим рекультивируемой почвы и обогащали ее различными активными соединениями. Это, в свою очередь, приводит к росту численности микроорганизмов прикорневой зоны и интенсификации разложения нефти и



нефтепродуктов и, в конечном итоге, способствует восстановлению плодородия почв (Емельянова и др., 2010; Kitamura, Maranhо, 2016; Yadav et al., 2016). Поэтому разработка полифункциональных биопрепаратов, обладающих эффектом очистки почвы от загрязнения нефтью с одновременной стимуляцией роста растений-фитомелиорантов, представляется актуальным направлением биотехнологических исследований.

В вегетационные сосуды помещали по 3 кг чернозема и увлажняли до 60% от полной влагоемкости, после чего вносили нефть в количестве 3 и 6% (масс). Далее почву инокулировали суспензией микроорганизмов (с титром  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл каждая) в объеме 10 мл/кг, поливали водой и тщательно перемешивали. Использовали следующие суспензии: консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; комбинация 3-х штаммов (клетки микроорганизмов консорциума и *P. koreensis* ИБ-4 в соотношении 1:1); комбинация 4-х штаммов (клетки микроорганизмов консорциума, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 в соотношении 1:1:1). Потом высевали семена овса (*Avena sativa* L.), который часто используют как фитомелиорант.

Разница в содержании нефти в почве не оказывала какого-либо существенного влияния на численность почвенной микробиоты, размерные и массовые показатели растений овса. Всхожесть семян была приблизительно одинаковой во всех сосудах – 94-96%, но более дружной и ранней (на 2 сут) в вариантах с инокуляцией бактериями. Начальный титр гетеротрофных микроорганизмов в используемой почве составлял  $(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$ , азотфиксирующих –  $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$ , УОМ –  $(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$  КОЕ/г. Обработка консорциумом микроорганизмов и комбинацией 3-х штаммов, приводила к увеличению количества гетеротрофных и азотфиксирующих микроорганизмов на 1 порядок спустя 3 недели после начала эксперимента ( $\sim 10^6$  КОЕ/г) и еще на 1 порядок – к окончанию опыта ( $\sim 10^7$  КОЕ/г). Комбинация 4-х штаммов способствовала возрастанию численности этих групп микроорганизмов на 2 порядка через 3 недели экспозиции ( $\sim 10^7$  КОЕ/г) и еще на 1 порядок – в конце испытания ( $\sim 10^8$  КОЕ/г) (табл. 10.4 и 10.5).

Таблица 10.4 – Численность гетеротрофных микроорганизмов, КОЕ/г

Вариант опыта, добавка к почве	1 сут	21 сут	42 сут
овес	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$
нефть 3%	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(9,3 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$
нефть 6%	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3%	$(5,8 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^6$
овес + нефть 6%	$(5,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$
овес + нефть 3% + консорциум	$(6,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(7,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(8,2 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + консорциум	$(8,6 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(6,9 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 3-х штаммов	$(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(5,8 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(7,8 \pm 0,4) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + комбинация 3-х штаммов	$(6,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(6,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 4-х штаммов	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$
овес + нефть 6% + комбинация 4-х штаммов	$(6,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$	$(4,4 \pm 0,1) \cdot 10^8$

Таблица 10.5 – Численность азотфиксирующих микроорганизмов, КОЕ/г

Вариант опыта, добавка к почве	1 сут	21 сут	42 сут
овес	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$
нефть 3%	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,8 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(5,6 \pm 0,3) \cdot 10^5$
нефть 6%	$(6,0 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3%	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(5,4 \pm 0,4) \cdot 10^5$
овес + нефть 6%	$(8,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3% + консорциум	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(4,5 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + консорциум	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 3-х штаммов	$(7,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(8,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + комбинация 3-х штаммов	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 4-х штаммов	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^8$
овес + нефть 6% + комбинация 4-х штаммов	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(2,8 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^8$

Титр УОМ во всех вариантах с интродукцией микроорганизмов менялся одинаково – увеличивался на 2 порядка к середине опыта ( $\sim 10^6$  КОЕ/г) и достигал показателя  $10^7$  КОЕ/г на 42 сутки (табл. 10.6).

Таблица 10.6 – Численность углеводородокисляющих микроорганизмов, КОЕ/г

Вариант опыта, добавка к почве	1 сут	21 сут	42 сут
овес	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,0 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^4$
нефть 3 %	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(6,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$
нефть 6 %	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$
овес + нефть 3%	$(5,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(7,5 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(7,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$
овес + нефть 6%	$(7,0 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(4,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$
овес + нефть 3% + консорциум	$(4,1 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(5,3 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + консорциум	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(7,3 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 3-х штаммов	$(3,4 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(5,0 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + комбинация 3-х штаммов	$(5,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^7$
овес + нефть 3% + комбинация 4-х штаммов	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^7$
овес + нефть 6% + комбинация 4-х штаммов	$(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,1) \cdot 10^7$

Известно, что нефть оказывает неоднозначное влияние на растения и способна как угнетать, так и активизировать их рост и развитие (Цулаия, 2011; Усманов и др., 2015; Кольцова и др., 2016; Мязин, Редькина, 2016а; Дмитриева, Петухова, 2017; Zamani et al., 2018). В нашем случае, она подавляла длину побегов, но не оказывала отрицательного воздействия на массу надземной части и стимулировала развитие корней в вариантах без обработки бактериями (табл. 10.7). Внесение бактерий ускорило на 6-7 сут начало каждой стадии развития растений овса, а также оказывало положительное влияние на рост надземной части по сравнению с растениями в загрязненной почве, не инокулированной микроорганизмами.

Такое быстрое накопление биомассы может содействовать нефтеструкции за счет интенсификации как фитоиспарения – способности растений поглощать углеводороды в процессе поддержания своего водного баланса, т.е. вместе с водой «выкачивать» из почвы загрязняющее вещество и испарять его с поверхности наземных органов, так и фитодеградации – свойства растений разлагать органические поллютанты (в частности, нефть и нефтепродукты) с

помощью своих ферментов, обычно внутри тканей, до неорганических соединений или до стабильных интермедиатов, накапливающихся в растении (Frick et al., 1999; Materac et al., 2015; Lim et al., 2016). Самый значительный эффект на длину и массу побегов оказывала комбинация из 4-х штаммов. Благодаря ее применению длина проростков увеличивалась на 27,4 и 23,4% (при 3 и 6% уровне загрязнения соответственно) по сравнению с проростками овса в незагрязненной почве и на 77,8 и 54,0% – по сравнению с растениями в почве с 3 и 6% содержанием нефти соответственно.

Таблица 10.7 – Средние массовые и размерные показатели растений овса

Вариант опыта, добавка к почве	Длина проростков, см	Масса, г	
		корень	надземная часть
овес	20,1±1,2	0,34±0,03	0,81±0,03
овес + нефть 3%	14,4±0,7	0,76±0,02	0,73±0,02
овес + нефть 6%	16,1±0,8	0,66±0,04	0,86±0,04
овес + нефть 3% + консорциум	19,4±1,1	0,35±0,01	0,85±0,06
овес + нефть 6% + консорциум	18,5±1,3	0,30±0,02	0,77±0,06
овес + нефть 3% + комбинация 3-х штаммов	22,3±0,6	0,67±0,05	1,43±0,06
овес + нефть 6% + комбинация 3-х штаммов	21,7±1,0	0,68±0,03	1,39±0,05
овес + нефть 3% + комбинация 4-х штаммов	25,6±0,9	0,44±0,02	1,91±0,08
овес + нефть 6% + комбинация 4-х штаммов	24,8±1,1	0,38±0,02	1,95±0,06

Особый интерес при выращивании растений представляет изучение роста корней, поскольку именно они находятся в непосредственном контакте с загрязненной почвой и, соответственно, с углеводородами и почвенными микроорганизмами. Комбинация 4-х штаммов не вызывала прироста массы корней, но увеличивала массу надземной части растений в 2,4-2,7 раза по сравнению с растениями овса в почве без нефти, и по сравнению с растениями в почве с нефтезагрязнением (независимо от его содержания), но не обработанной микроорганизмами. Это можно объяснить тем, что бактерии *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739, входящие в состав данной комбинации, обладают

способностью к продукции фитогормонов цитокининового ряда в количестве 119 (см. раздел 9.4) и 190 (Архипова и др., 2006) нг/мл культуральной жидкости соответственно, которые, как известно, способствуют росту и развитию побегов, но ингибируют эти процессы у корней (Архипова и др., 2006; Kurakawa et al., 2007).

Комбинация 3-х штаммов также увеличивала длину и массу побегов овса по сравнению с растениями в загрязненной почве без инокуляции, но в меньшей степени – на 11,0 и 8,0% (при 3 и 6% уровне загрязнения соответственно) по сравнению с проростками овса в незагрязненной почве и на 54,9 и 34,8% – по сравнению с растениями в почве с 3 и 6% содержанием нефти соответственно. Также эта комбинация вызывала увеличение массы надземной части растений в 1,6-2,0 раза и по сравнению с растениями овса в почве без нефти, и по сравнению с растениями в почве с нефтезагрязнением (независимо от его содержания), но не обработанной суспензией. При этом ингибирования развития корней не происходило. Это, вероятно, вызвано меньшим количеством цитокининов, образуемых только бактерией *P. koreensis* ИБ-4. Кроме того, штамм синтезирует в небольших количествах ИУК (40 нг/мл культуральной жидкости) – гормон, стимулирующий рост корней, поэтому после обработки указанной комбинацией их масса была в 1,5 и 1,8 раз выше (при 3 и 6% загрязнении соответственно), чем при инокуляции комбинацией из 4-х штаммов.

Консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 увеличивал длину проростков за счет уменьшения содержания нефти в почве, но не оказывал положительного влияния на массу подземной и надземной частей растений овса. Очевидно, это связано с отсутствием у микроорганизмов, входящих в его состав, фитогормональной активности. Применение консорциума снижало количество нефтепродуктов в почве с растениями в 3,3 и 3,6 раза (при исходном загрязнении в 3 и 6% соответственно).

Инокуляция загрязненной почвы комбинациями из 3-х и 4-х штаммов уменьшала содержание в ней поллютанта в 3,1-3,5 раза по сравнению с

вариантами с растениями, но без внесения бактерий (табл. 10.8). Посев растений овса без обработки почвы микроорганизмами снижал содержание нефтепродуктов почти также незначительно, как и эндогенная микробиота.

Таблица 10.8 – Содержание нефтепродуктов в почве

Вариант опыта, добавка к почве	Содержание нефтепродуктов, %	
	21 сут	42 сут
овес	0,0031±0,0007	0,0030±0,0008
нефть 3%	2,8114±0,1173	2,2240±0,1053
нефть 6%	5,4426±0,2425	5,1263±0,3144
овес + нефть 3%	2,8621±0,1865	2,0264±0,1411
овес + нефть 6%	5,3342±0,3522	4,9433±0,2950
овес + нефть 3% + консорциум	1,3934±0,0060	0,6182±0,0030
овес + нефть 6% + консорциум	2,3608±0,1414	1,3624±0,0084
овес + нефть 3% + комбинация 3-х штаммов	0,9841±0,0043	0,5811±0,0032
овес + нефть 6% + комбинация 3-х штаммов	2,2602±0,1310	1,4246±0,0073
овес + нефть 3% + комбинация 4-х штаммов	1,1005±0,0062	0,6450±0,0026
овес + нефть 6% + комбинация 4-х штаммов	2,7633±0,1608	1,4632±0,0061

Таким образом, интродукция бактериальных суспензий, состоящих либо только из клеток микроорганизмов консорциума *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, либо из клеток микроорганизмов консорциума и *P. koreensis* ИБ-4, либо из клеток микроорганизмов консорциума, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 способствовала более ранней (на 2 сут) всхожести семян и ускоряла (на 6-7 сут) начало всех стадий развития растений овса, используемого в качестве фитомелиоранта, а также положительно влияла на нефтезагрязненную почву, увеличивая в ней количество гетеротрофных, азотфиксирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов на 2-3 порядка и снижая содержание нефтепродуктов в 3,1-3,6 раза. Кроме того, комбинации, состоящие из бактерий с различной функциональной активностью, увеличивали на 34,8-77,8% длину проростков овса и в 1,6-2,7 раза – их массу по сравнению с растениями в

нефтезагрязненной почве, не обработанной микроорганизмами, а также снижала в почве содержание нефтепродуктов в 3,1-3,5 раза. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности применения комбинаций, содержащих бактерии-нефтедеструкторы и микроорганизмы с ростстимулирующей активностью, для очистки почвы от нефти и ускорения ее восстановления.

\*\*\*

Таким образом, в результате проведения лабораторных экспериментов установлено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может эффективно применяться для очистки производственных сточных вод, содержащих углеводороды, а также грунта и почвы, загрязненных нефтью. Комбинации консорциума микроорганизмов с бактериями *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739, обладающими фитогормональной активностью, не только способствуют удалению поллютанта, но и стимулируют рост и развитие растений-фитомелиорантов. Показана эффективность применения психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> для снижения содержания нефти в песке в условиях низкой положительной температуры. И консорциум, и штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> увеличивают численность гетеротрофных, углеводородокисляющих и азотфиксирующих микроорганизмов, участвующих в трансформации различных веществ, в т.ч. загрязняющих. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования выделенных микроорганизмов-нефтедеструкторов в качестве основы биопрепаратов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтяного загрязнения, а бактерий *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 – как дополнительных составляющих для ускорения этого процесса и стимуляции роста растений-фитомелиорантов. Правильность этого утверждения была проверена в ряде полевых экспериментов.

# ГЛАВА 11. ПОЛЕВЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ПРОВЕРКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ, ГРУНТОВ, ВОДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ ОТ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ, А ТАКЖЕ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ

## 11.1. Обезвреживание нефтешлама с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

В процессах добычи и переработки нефтяного сырья неизбежно образуются шламы – сложные гетерофазные системы, куда входят тяжелые нефтяные остатки, содержащие (по массе) 10-56% нефтепродуктов, 30-85% воды, 1,3-46% твердых примесей (песок, глина, ил и т.д.), соотношение которых колеблется в очень широких пределах (Херрера-Альварадо, 2015; Юльtimiрова, 2018). Сбор и хранение таких нефтеотходов, как правило, осуществляется на открытых площадках или в бункерах без какой-либо сортировки и классификации. В шламонакопителях происходят естественные явления – накопление атмосферных осадков, развитие микроорганизмов, протекание химических реакций. Со временем легкие фракции испаряются, нефть и нефтепродукты окисляется, смолы переходят в другое качество. Кроме того, в шлам попадают твердые примеси и он упрочняется и уплотняется. В результате образуются дисперсные системы, которые отличаются значительной устойчивостью к разрушению. К настоящему времени значительное число хранилищ из средства предотвращения загрязнения превратилось в источник крупномасштабной контаминации компонентов природной среды (почв, подземных и поверхностных вод, атмосферы (Каталитические..... 2013; Литвинова, 2016; Соколов, 2017). Поэтому проблема создания высокоэффективных и экологически чистых технологий обезвреживания нефтешламов и ликвидации мест их хранения приобретает все большее значение.

Промышленные испытания по обезвреживанию нефтешлама проводили на территории газонефтяного месторождения Каражанбас (Республика Казахстан). Рекультивации с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ



ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 было подвергнуто 5 тыс. м<sup>3</sup> грунта (нефтешлама) со средним содержанием нефтепродуктов 10,47%, складированного на участке площадью 4200 м<sup>2</sup>.

Климат Мангистауской области (Западный Казахстан), на территории которой расположено месторождение Каражанбас, относится к резко континентальным, с жарким сухим летом и холодной малоснежной зимой, со значительными амплитудами сезонных и суточных температур. Для него характерна большая сухость воздуха – среднегодовое количество осадков менее 200 мм. Во время проведения эксперимента среднемесячная температура составила в августе 28,4°C, в сентябре 20,5°C, в октябре 16,3°C, в первой половине ноября 13,2°C. В сентябре трижды выпадали кратковременные дожди, в остальные месяцы осадков не наблюдалось, поэтому ходе рекультивации осуществлялся частый полив (через 1-2 дня).

После завершения эксперимента по обезвреживанию нефтешлама, содержание нефтепродуктов в контрольной пробе снизилось только на 0,39%, а в пробах, обработанных консорциумом, произошло уменьшение концентрации загрязнителя на 4,99-8,64% (рис. 11.1).

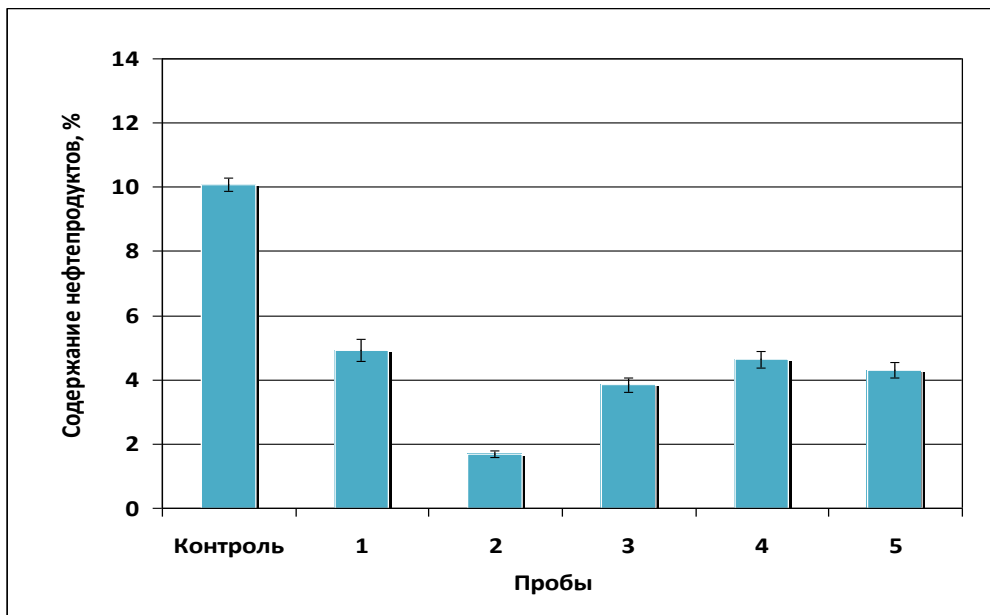


Рисунок 11.1 – Содержание нефтепродуктов в нефтешламе после окончания эксперимента

Концентрация биомассы как гетеротрофных микроорганизмов, так и УОМ в контрольной пробе за время эксперимента практически не изменилась, в то время как в образцах, обработанных консорциумом микроорганизмов, численность гетеротрофных микроорганизмов увеличилась на 2-4 порядка, а количество УОМ возросло на 1-2 порядка (табл. 11.1).

Таблица 11.1 – Численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтешламе

Проба	Количество микроорганизмов, КОЕ/г			
	гетеротрофные		углеводородокисляющие	
	1 сут	90 сут	1 сут	90 сут
Контроль	$(8,1 \pm 1,4) \cdot 10^4$	$(8,5 \pm 0,9) \cdot 10^4$	$(7,9 \pm 0,9) \cdot 10^3$	$(8,4 \pm 1,6) \cdot 10^3$
1	$(9,0 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(9,6 \pm 1,8) \cdot 10^3$	$(8,2 \pm 1,1) \cdot 10^4$
2	$(7,1 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(7,7 \pm 0,9) \cdot 10^5$
3	$(7,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(7,6 \pm 1,4) \cdot 10^3$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$
4	$(7,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(8,1 \pm 1,5) \cdot 10^3$	$(3,0 \pm 0,1) \cdot 10^4$
5	$(9,8 \pm 1,1) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^6$

Несмотря на то, что мероприятия по утилизации нефтеотхода были непродолжительными, начались в самом конце рекультивационного сезона и длились до глубокой осени при постепенном понижении среднесуточной температуры, а также включали в себя лишь однократное внесение бактерий-нефтедеструкторов, использованный консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 хорошо зарекомендовал себя при рекультивации такого трудноразлагаемого субстрата как нефтешлам в сложных погодных-климатических условиях Западного Казахстана.

## 11.2. Очистка почвы от нефти в условиях низких положительных температур штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Г</sup>

Ямало-Ненецкий автономный округ (ЯНАО) расположен в арктической зоне Западно-Сибирской равнины и относится к районам Крайнего Севера. Более

половины его территории находится за Полярным кругом, а небольшая часть занимает восточные склоны Полярного и Приполярного Урала. Климат ЯНАО резко-континентальный и определяется наличием многолетней мерзлоты, близостью холодного Карского моря, пологим равнинным рельефом, обилием заливов, рек, болот и озер. В целом для округа характерна длительная, относительно сухая зима (до 8 месяцев), короткое нежаркое лето, сильные ветра, небольшая величина снежного покрова. Средняя температура самого холодного месяца (январь) составляет  $-25,7^{\circ}\text{C}$ , самого жаркого (июль) –  $15,4^{\circ}\text{C}$ .

ЯНАО входит в состав Западно-Сибирской нефтегазоносной провинции и занимает одно из ведущих мест в России по запасам углеводородного сырья. На его территории расположено более 236 месторождений нефти и газа, из которых 77 находятся в промышленной разработке, 19 месторождений подготовлены к эксплуатации и на 140 месторождениях ведутся разведочные работы (Доклад об экологической ..., 2015). Округ является самым перспективным регионом нашей страны в отношении добычи этих полезных ископаемых. Начальные суммарные ресурсы нефти оцениваются в 17,9 млрд. т, из которых на сегодняшний день извлечено 0,9 млрд. т. По объемам добычи нефти с конденсатом автономный округ является вторым после ХМАО – Югры. Сегодня там добывается порядка 7% от добычи России и 1% мировой добычи нефти и конденсата (Доклад об экологической ..., 2015). Только за первое полугодие 2017 г. извлечено из недр 15,12 млн. т "черного золота», что на 25% больше, чем за аналогичный период 2016 г. (Добыча нефти ..., 2017). Мощный нефтегазовый комплекс, сформировавшийся в ЯНАО и являющийся основной его экономики, оказывает сильное негативное воздействие на окружающую среду. Согласно сведениям Управления Росприроднадзора по ЯНАО в 2015 г. площадь нарушенных земель составила 10,74 тыс. га. Около 80% нарушений почвенного покрова связано с разработкой месторождений полезных ископаемых. Площадь рекультивированных земель составила 4,64 тыс. га (Доклад об экологической ..., 2015).

Пуровский район – основной нефтегазодобывающий район ЯНАО. На его территории разведано 117 месторождений нефти и газа, из них в разработке находятся 39. Поэтому для этой местности особенно остро стоит проблема загрязнения почвенного покрова нефтью и нефтепродуктами. Согласно оценке геохимических ландшафтов по условиям разложения и миграции нефтепродуктов (Экологический паспорт..., 2007), почвы Пуровского района имеют самые плохие показатели в ЯНАО (застойный или чрезвычайно застойный режим биологического круговорота, очень низкая или чрезвычайно низкая скорость разложения продуктов нефтедобычи, высокая или очень высокая поглотительная способность почвы, слабый или очень слабый латеральный и радиальный вынос загрязнителей). Все эти данные указывают на весьма значительную способность почв удерживать поллютанты, консервировать тяжелые фракции нефти при условии крайне низкого темпа их разложения. К тому же, равнинный рельеф и высокая обводненность создают условия для быстрого распространения загрязнений, которые пропитывают прежде всего мохово-лишайниковую дернину. Снежный покров уменьшает, но не предотвращает проникновение нефти в моховой покров и почву. Основное ее количество, как правило, остается в слое до 10 см при глубине промачивания около 30 см. В переувлажненных торфянисто-глеевых болотных почвах высокий уровень грунтовых вод удерживает загрязнитель в верхнем 20-ти сантиметровом слое (Экологический паспорт..., 2007).

Эксперимент по очистке почвы от свежего разлива нефти проводили на территории на территории Пуровского района ЯНАО с 22 августа по 21 сентября 2012 г. Содержание нефти в почве составило 4,88%. В период испытания температура воздуха колебалась в интервале от 0 до 9°C.

Через две недели после начала эксперимента содержание нефтепродуктов в почве опытной части участка, обработанной суспензией микроорганизмов психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, уменьшилось до 2,61%, а еще через две недели – до 0,44%. На контрольной части количество загрязнителя к концу испытания существенно не изменилось (4,80%). Таким образом,

суспензия микроорганизмов штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> может использоваться для биорекультивации нефтезагрязненных грунтов в Западной Сибири. Способ очистки почвы от нефти в условиях низкой положительной температуры указанным психротолерантным штаммом бактерий запатентован в Российской Федерации (Патент РФ № 2539148).

### **11.3. Биологическая рекультивация отхода нефтехимического предприятия с помощью консорциума микроорганизмов**

***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2,  
а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>**

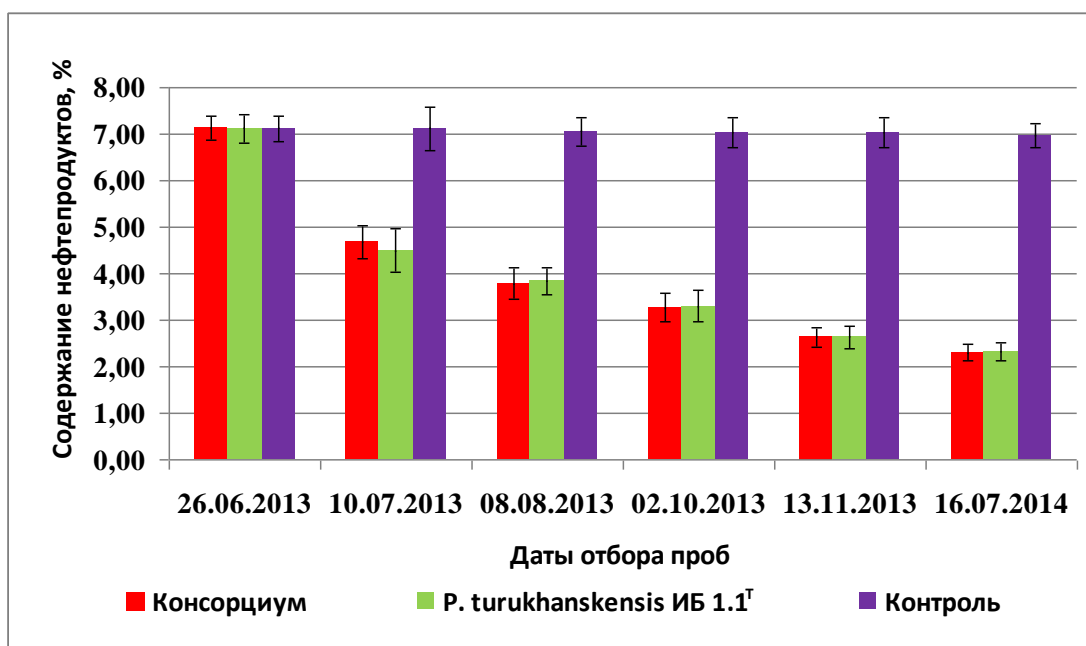
На большинстве нефтеперерабатывающих предприятий в качестве природного адсорбента в процессе регенерации минеральных масел и для их контактной доочистки используют отбеливающую глину. Она является продуктом неполного выветривания изверженных горных пород (базальтов, вулканических шлаков, туфов) и их разложения под действием воды, двуокиси углерода и других факторов. В результате образуются породы более рыхлой и пористой структуры, с заметными сорбционными свойствами (бентониты, опоки, гумбрин, фуллеровы земли и др.), представляющие собой гидроалюмосиликаты различного состава. Поглощительная способность отбеливающих глин связана с их пористой структурой, обуславливающей высокоразвитую поверхность. Преимуществом таких адсорбентов является их относительная доступность и дешевизна, связанные с наличием большого числа месторождений и простотой добычи. Отработанная (нефтезагрязненная) отбеливающая глина по степени вредного воздействия на окружающую среду относится к отходам 3 класса опасности – умеренно опасные отходы (код по Федеральному классификационному каталогу отходов 30822101333) (ФККО, 2017). Самоочищение таких субстратов идет крайне медленно и лимитируется высоким содержанием поллютантов, недостатком биогенных элементов и низкой численностью микроорганизмов, участвующих в процессах биотрансформации

поллютантов. Отвалы нефтезагрязненной отбеливающей глины занимают обширные территории, уродуют ландшафт и могут служить источником вторичного загрязнения окружающей среды. Например, только в результате деятельности ПАО «Орскнефтеоргсинтез» накоплено около 100 тыс. т этого отхода (Логинов и др., 2009).

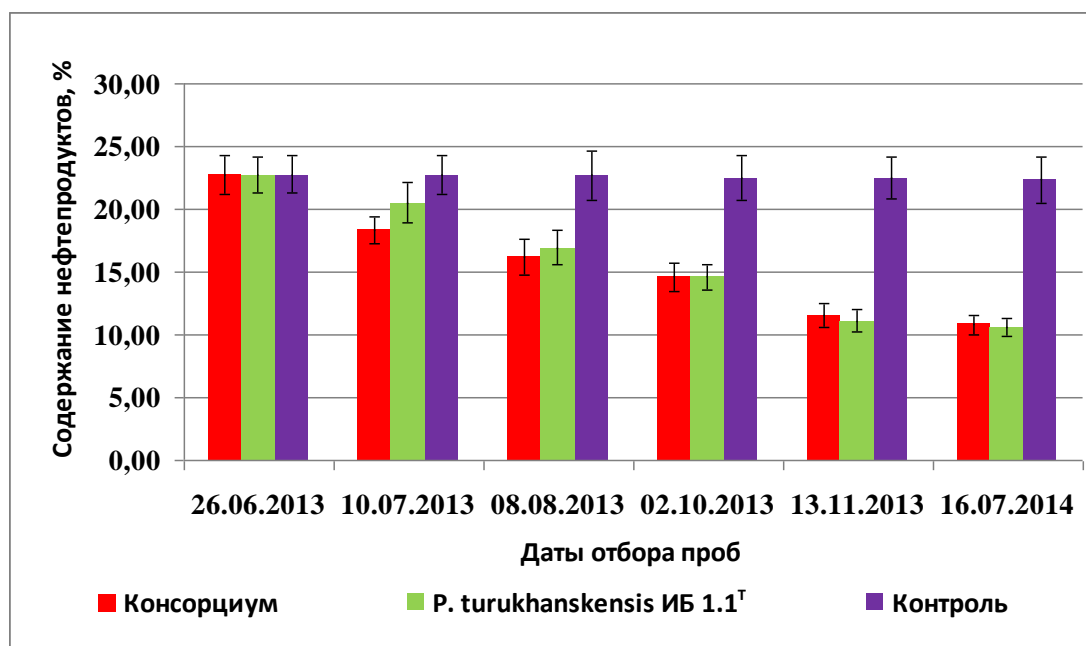
Полевой эксперимент по биорекультивации нефтезагрязненной отбеливающей глины проводили на полигоне промышленных отходов ПАО «Орскнефтеоргсинтез» (Оренбургская обл.) с июня 2013 по июль 2014 г. В климатическом отношении рассматриваемый район относится к степной зоне Южного Урала. Климат континентальный, засушливый. Его основными чертами являются холодная зима, жаркое сухое лето, короткий весенний период с быстрым переходом от весны к лету. С ноября по март поверхность почвы имеет отрицательную температуру. В период с июля по ноябрь 2013 г. выпало много дождей и среднемесячные нормы осадков были значительно превышены, но температура воздуха соответствовала среднемесячным показателям. Погода с декабря 2013 г. по апрель 2014 г. соответствовала климатическим нормам. В мае и июле 2014 г. средняя температура была близка к норме (19 и 19,9°С соответственно), но количество осадков было в несколько раз ниже нормы (8 и 5 мм соответственно). В июне 2014 г. средняя температура была 20,8°С, влажность незначительно превышала норму (42 мм).

Перед началом эксперимента среднее содержание нефтепродуктов по массе составляло на первом участке 7,12%, на втором – 22,76%. Участки были разбиты на делянки, каждую из которых несколько раз обрабатывали или консорциумом микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>.

С помощью указанных биопрепаратов за год эксперимента удалось уменьшить количество нефтепродуктов на первом участке с 7,12% до 2,30-2,33%, на втором – с 22,76% до 10,57-10,82% (рис. 11.2).



А)



Б)

Рисунок 11.2 – Содержание нефтепродуктов в отработанной отбеливающей глине на слабозагрязненном (А) и сильнозагрязненном (Б) рекультивируемых участках. Консорциум – консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Загрязненная отбеливающая глина является техногенным отходом и характеризуется низкой численностью микроорганизмов основных эколого-

трофических групп. На обоих участках исходный титр гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов составлял менее  $\sim 10^4$  КОЕ/г, а азотфиксирующих микроорганизмов – менее  $\sim 10^3$  КОЕ/г. Внесение нефтеокисляющих бактерий (как консорциума, так и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>) способствовало увеличению численности гетеротрофных микроорганизмов, которая в августе 2013 г. составила на первом участке  $\sim 10^7$  КОЕ/г, а на втором  $\sim 10^6$  КОЕ/г (табл. 11.2). В ноябре численность этой группы микроорганизмов снизилась на обоих участках до  $\sim 10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, а к концу эксперимента составила  $\sim 10^4$ - $10^5$  КОЕ/г. На контрольных делянках обоих участков количество гетеротрофных микроорганизмов в ходе опыта ни разу не превысило  $\sim 10^4$  КОЕ/г, а к моменту его завершения (июль 2014 г.) вернулось на уровень менее  $10^4$  КОЕ/г.

Таблица 11.2 – Динамика численности гетеротрофных микроорганизмов в отработанной отбеливающей глине, КОЕ/г

Участок	Вариант опыта	Даты отбора проб				
		10.07.13	08.08.13	02.10.13	13.11.13	16.07.14
1	Консорциум	$(8,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(9,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(8,3 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(7,2 \pm 0,4) \cdot 10^5$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(5,0 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(5,7 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(9,3 \pm 0,3) \cdot 10^5$
	Контроль	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$	менее $10^4$
2	Консорциум	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(6,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(8,3 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(9,2 \pm 0,4) \cdot 10^4$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	$(8,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(4,0 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(4,1 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(7,3 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^5$
	Контроль	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,3 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^4$	менее $10^4$

Интродукция дополнительного количества бактерий-нефтедеструкторов позволила увеличить количество углеводородокисляющих микроорганизмов на обоих участках (табл. 11.3).



Таблица 11.3 – Динамика численности углеводородокисляющих микроорганизмов в обработанной отбеливающей глине, КОЕ/г

Участок	Вариант опыта	Даты отбора проб				
		10.07.13	08.08.13	02.10.13	13.11.13	16.07.14
1	Консорциум	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(8,4 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(9,6 \pm 0,3) \cdot 10^4$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup>	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(9,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(4,8 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^5$
	Контроль	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$
2	Консорциум	$(7,7 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(6,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup>	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(3,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(9,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(5,3 \pm 0,5) \cdot 10^5$
	Контроль	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$	менее $10^4$

Численность УОМ на первом участке стабильно возрастала в течение лета, достигнув максимума в августе 2013 г. ( $\sim 10^7$  КОЕ/г). На втором участке наибольшее значение этого показателя установлено в начале октября ( $\sim 10^6$  КОЕ/г). На обоих участках к концу опыта наибольший титр углеводородокисляющих микроорганизмов был зафиксирован на делянках, обработанных бактериями *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> –  $\sim 10^5$  КОЕ/г. На контрольных делянках обоих участков титр УОМ за время эксперимента всегда был менее  $\sim 10^4$  КОЕ/г.

Обработанная отбеливающая глина обладает крайне низкой численностью diazotrophic микроорганизмов. За период с июня по ноябрь 2013 г. включительно, в результате периодического внесения биопрепаратов она возросла на первом участке до  $\sim 10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, а на втором – до  $\sim 10^5$  КОЕ/г (табл. 11.4). В пробах, отобранных с двух участков в июле 2014 г. обнаружено, что число азотфиксирующих микроорганизмов снизилось по сравнению с таковым в ноябре 2013 г. ( $\sim 10^4$ - $10^5$  КОЕ/г), но, по-прежнему, было выше, чем в контроле.

Таблица 11.4 – Динамика численности азотфиксирующих микроорганизмов в обработанной отбеливающей глине, КОЕ/г

Участок	Вариант опыта	Даты отбора проб				
		10.07.13	08.08.13	02.10.13	13.11.13	16.07.14
1	Консорциум	$(4,0 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(2,2 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(2,3 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^5$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup>	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(7,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(6,9 \pm 0,5) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$
	Контроль	менее $10^3$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^3$	менее $10^3$	менее $10^3$	менее $10^3$
2	Консорциум	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(4,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>T</sup>	$(7,0 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(6,6 \pm 0,5) \cdot 10^4$
	Контроль	менее $10^3$	менее $10^3$	менее $10^3$	менее $10^3$	менее $10^3$

Показатель остаточного содержания углеводов не всегда напрямую указывает на степень фитотоксичности субстрата, так как в процессе разложения нефтепродуктов могут накапливаться промежуточные продукты обмена, негативно воздействующие на растения. Семена редиса очень плохо прорастали в загрязненной отбеливающей глине (всхожесть на первом участке составила 30%, на втором – 16%). Внесение микроорганизмов позволило снизить фитотоксичность субстрата (табл. 11.5). К концу эксперимента (июль 2014 г.) применение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> почти полностью нейтрализовало отрицательное воздействие обработанной отбеливающей глины на растения на первом участке. Всхожесть семян редиса в этих вариантах опыта составила  $(95 \pm 6,6)$  и  $(92 \pm 13,1)\%$  соответственно. На сильнозагрязненном участке использование биопрепаратов значительно снижало вредное влияние нефтепродуктов на семена редиса, хотя и в меньшей степени. При обработке консорциумом проросло  $(86 \pm 12,1)\%$  семян, а при инокуляции штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> –  $(85 \pm 8,2)\%$ . В то же время на контрольных делянках на

первом участке всхожесть увеличилась незначительно, а на сильнозагрязненном участке практически не изменилась.

Таблица 11.5 – Влияние интродукции микроорганизмов на всхожесть семян редиса

Участок	Вариант опыта	Всхожесть семян редиса, %				
		10.07.13	08.08.13	02.10.13	13.11.13	16.07.14
1	Консорциум	54±4,8	80±12,1	90±5,8	92±7,5	95±6,6
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	50±7,1	76±3,5	84±11,4	90±8,6	92±13,1
	Контроль	31±3,5	34±4,6	39±3,8	40±4,5	40±5,3
2	Консорциум	40±6,5	62±3,4	77±6,9	84±4,3	86±12,1
	<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	35±5,3	60±4,7	70±10,2	83±9,7	85±8,2
	Контроль	16±2,6	17±1,8	18±2,1	18±3,2	17±2,9

Таким образом, внесение биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов позволяет снизить содержание углеводов в отработанной отбеливающей глине, способствует увеличению в ней численности гетеротрофных, углеводородокисляющих и азотфиксирующих микроорганизмов, создает условия для роста и развития растений. Как с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, так и с помощью бактерии *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> получены практически одинаково хорошие результаты на обоих участках.

Полученные данные позволяют рекомендовать консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> для обезвреживания углеводородсодержащих отходов нефтехимической промышленности.

#### **11.4. Биорекультивация почвы после нефтяного разлива с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Г</sup>**

Ханты-Мансийский автономный округ – Югра (ХМАО – Югра), занимает первое место в России по добыче «черного золота» (около 43% от общероссийской добычи) (Добыча нефти в Ханты-Мансийском..., 2017; Информация о добыче ..., 2018). К сожалению, округ лидирует также и по числу чрезвычайных ситуаций, связанных с выбросами нефти и нефтепродуктов, причём не только в стране, но и во всём мире. Хотя в последнее время и наметилась устойчивая положительная тенденция к уменьшению объёмов и количества аварий в этом регионе (Доклады об экологической ...), задача очистки почвы от этих поллютантов по-прежнему остается очень актуальной – площадь загрязненных земель на конец 2016 г. в автономном округе составила 3982 га (Доклады об экологической ...). Для этого региона с суровыми природно-климатическими условиями (резко континентальный климат, пониженные среднегодовые температуры, недостаток аэрации, отсутствие необходимого количества биогенных элементов, скудность флоры и фауны и др.) характерны почвы с высокой степенью заболоченности, повышенной концентрацией соли, низкими значениями рН, слабым гумусовым слоем и крайне малой скоростью микробиологических процессов. Естественное самоочищение таких территорий от нефтяного загрязнения с помощью эндогенных микроорганизмов является очень длительным процессом, который может растянуться на десятилетия. Все это усугубляется очень незначительной активностью физико-химических факторов разложения (солнечное излучение, ферменты микроорганизмов, растений и химические окислители) (Чижов и др., 2008; Алексеев, 2011).

Помимо количества разлитой нефти, размеры загрязнённых участков зависят и от почвенно-географических особенностей местности, на которой произошла авария. Общая выравненность рельефа и высокий уровень грунтовых вод, характерные для болотных ландшафтов ХМАО – Югры, способствуют

обширному распространению поллютанта в разные стороны от места попадания его в окружающую среду. Иногда за счёт значительной сорбционной способности торфа формируются локальные участки с очень высокой степенью загрязнения. Поэтому, в первую очередь, для ликвидации нефтяных разливов применяют сбор и откачку нефти. Потом, в зависимости от конкретных условий, проводится рекультивация торфом с подсыпкой песка, либо рыхление торфогрунта, либо обработка биопрепаратами, содержащими микроорганизмы, утилизирующие широкий спектр углеводов (Казанцева и др., 2001). Последний приём является наиболее эффективным способом восстановления экологически чистой обстановки в природных условиях без нарушения естественного биоценоза.

Полевой эксперимент по очистке нефтезагрязненной торфянистой почвы осуществляли на территории Нефтеюганского района Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в период с сентября 2013 г. по июнь 2015 г. На месте нефтеразлива годичной давности (содержание загрязнителя очень высокое – в среднем 70,3%) разбили делянки, каждую из которых однократно обработали 1 л бактериальной суспензии с титром  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, содержащей или консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>.

Нефтеюганский район характеризуется резко-континентальным климатом с суровой долгой зимой (период с устойчивыми морозами длится 150-160 дней, средняя температура воздуха в январе  $-21^{\circ}\text{C}$ ), короткой и бурной весной, непродолжительным тёплым и влажным летом (среднемесячная температура июля  $17^{\circ}\text{C}$ ) и короткой осенью. Смена сезонов происходит быстро и резко. Количество атмосферных осадков умеренное – 450-500 мм в год. В сентябре 2013 г. стояла тёплая погода с кратковременными осадками (среднемесячные показатели в сентябре 2013 г.: температура –  $7,8^{\circ}\text{C}$ , количество осадков – 32 мм). В дальнейшем отбор проб производили уже в следующих вегетационных сезонах (03.06.2014, 29.08.2014 и 28.05.2015 г.). Зима 2013-2014 гг. была среднеснежная,

среднемесячная температура составила  $-19,9^{\circ}\text{C}$ . Весна 2014 г. была теплая (среднемесячная температура  $2,1^{\circ}\text{C}$ ), с большим количеством осадков. Лето 2014 г. было неоднородным по погодным условиям: теплый июнь ( $14,2^{\circ}\text{C}$ ) с недобором осадков, холодный ( $13,3^{\circ}\text{C}$ ) дождливый июль, относительно теплый ( $14,1^{\circ}\text{C}$ ) август с умеренным количеством осадков. Осень 2014 г. была холодной с большим количеством осадков. Зимой 2014-2015 гг. преобладала неустойчивая погода, теплее обычного по сравнению со средними многолетними характеристиками ( $-17,9^{\circ}\text{C}$ ), с частыми контрастными колебаниями температурного режима. Переходный период к летнему полугодю начался раньше своих средних многолетних сроков. Весна 2015 г. была ранней и теплой ( $2,6^{\circ}\text{C}$ ).

Динамика содержания нефтепродуктов в рекультивируемой почве в ходе эксперимента отражена на рисунке 11.3.

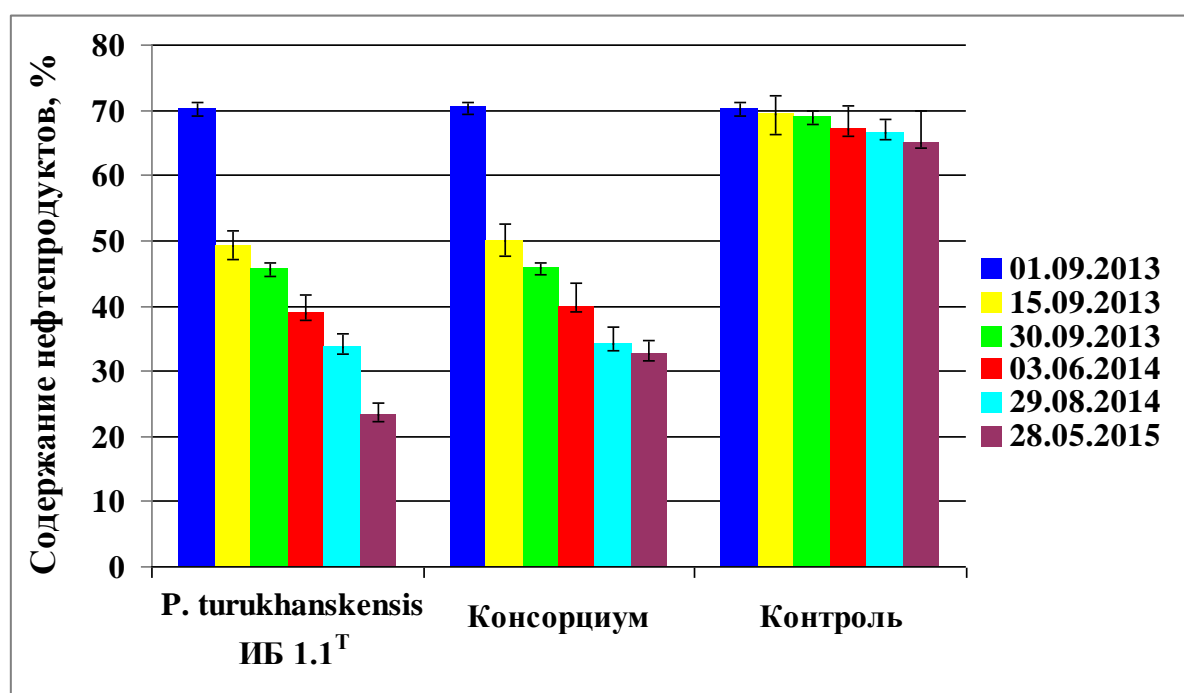


Рисунок 11.3 – Содержание нефтепродуктов в почве на месте разлива нефти. Консорциум – консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Эффективность консорциума и штамма *P. turukhanskensis* ИБ-1.1<sup>Т</sup> в начале эксперимента была одинаковой: интродукция каждого позволила через месяц к концу сентября сократить количество поллютанта в почве с 70,3 до 45,6%. Исследование проб, отобранных в начале следующего рекультивационного сезона (03.06.2014 г.) показало, что за период с октября 2013 г. по июнь 2014 г. в холодных почвенно-климатических условиях процесс разложения нефтепродуктов продолжался, хотя и медленными темпами. В целом, к июню 2014 г. на делянках, инокулированных биопрепаратами, количество нефтепродуктов уменьшилось до 38,9-40,0%. В тоже время в почве, содержащей только эндогенную микробиоту, убыль загрязняющих веществ была незначительной – 2,9%.

Спустя еще один год, в конце мая 2015 г. содержание нефтепродуктов на делянках, обработанных консорциумом, снизилось до 32,7%. Там же, где применяли штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, разложение поллютантов проходило более активно и количество углеводов уменьшилось до 23,3%. В тоже время, на контрольных делянках убыль загрязняющих веществ к концу эксперимента была незначительной – 5,2%.

Нефтезагрязнённая почва характеризовалась низкой численностью микроорганизмов – перед началом эксперимента титр гетеротрофных микроорганизмов составлял  $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$  КОЕ/г, а УОМ –  $(5,7 \pm 0,3) \cdot 10^3$  КОЕ/г. Анализ микробиологических параметров опытных делянок показал, что под влиянием интродукции бактериальных препаратов произошло увеличение численности микроорганизмов этих групп (табл. 11.6). К концу полевого испытания количество гетеротрофных микроорганизмов в обработанной почве возросло на 2-3 порядка. Наибольшее увеличение этого показателя произошло при применении штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>. Его эффективность нарастала постепенно: к началу рекультивационного сезона 2014 г. титр микроорганизмов изучаемой группы на делянках, инокулированных этим биопрепаратом, была на 1 порядок ниже ( $\sim 10^6$  КОЕ/г), чем там, где применялся консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 ( $\sim 10^7$

КОЕ/г); к сентябрю 2014 г. оба биопрепарата продемонстрировали одинаковую результативность ( $\sim 10^7$  КОЕ/г); к началу лета 2015 г. популяция гетеротрофных микроорганизмов на делянках, обработанных штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, сохранила свою численность на уровне  $10^7$  КОЕ/г, в то время как в варианте с консорциумом она составила  $\sim 10^6$  КОЕ/г.

Таблица 11.6 – Численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненной почве, КОЕ/г

Вариант опыта	Даты отбора проб				
	15.09.2013	30.09.2013	03.06.2014	29.08.2014	28.05.2015
Гетеротрофные микроорганизмы					
Консорциум	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(9,8 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(4,9 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(9,5 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(7,2 \pm 0,3) \cdot 10^6$
<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(3,4 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(8,7 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(8,2 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(5,9 \pm 0,2) \cdot 10^7$
Контроль	$(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(7,1 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$
Углеводородокисляющие микроорганизмы					
Консорциум	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(8,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$
<i>P. turukhanskensis</i> ИБ 1.1 <sup>Т</sup>	$(8,3 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(4,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$
Контроль	$(8,8 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(7,4 \pm 0,3) \cdot 10^3$

Инокуляция загрязненной почвы бактериями-нефтедеструкторами способствовала существенному (на 3-4 порядка) увеличению числа микроорганизмов, разлагающих углеводороды. Лучшие результаты были получены с помощью штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>, благодаря которому численность УОМ к концу рекультивационного периода 2014 г. и началу нового сезона 2015 г. держалась на стабильно высоком уровне ( $\sim 10^7$  КОЕ/г).

Рост плотности микробной популяции является одним из признаков активной биодеструкции нефти в почве. На контрольных делянках количество гетеротрофных микроорганизмов в течение опыта не превысило  $\sim 10^4$  КОЕ/г, а



численность УОМ в ходе эксперимента возросла на 1 порядок до  $\sim 10^4$  КОЕ/г, но к его завершению снизилась до исходного уровня  $\sim 10^3$  КОЕ/г.

Таким образом, в ходе проведения полевого эксперимента установлено, что однократная интродукция как консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, так и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> способствует биодegradации углеводов в высокозагрязненной почве и повышению в ней численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп. Лучшие результаты достигнуты за счет внесения психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, с помощью которого за 21 месяц экспозиции удалось снизить содержание нефтепродуктов в почве с 70,3 до 23,3% и увеличить численность гетеротрофных (на 3 порядка) и углеводородокисляющих микроорганизмов (на 4 порядка). Полученные данные позволяют рекомендовать этот штамм к применению для очистки нефтезагрязненных грунтов в зоне холодного и умеренного климата осенью и ранней весной с целью удлинения рекультивационного сезона.

### **11.5. Очистка водной поверхности болота, загрязненного нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов**

#### ***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2**

Равнинная часть ЯНАО почти на 90% лежит в пределах высот до 100 метров над уровнем моря, что в сочетании с избыточным увлажнением и наличием многолетней мерзлоты способствует образованию многочисленных болот и озер. Поэтому проблема загрязнения водной среды нефтью очень актуальна для ЯНАО. Очистка таких объектов является одной из самых сложных и трудоемких задач при ликвидации последствий аварийных нефтеразливов. Это связано с разнообразием процессов трансформации нефти, происходящих в воде (испарение, растворение, эмульгирование, окисление, образование агрегатов, седиментация, биодegradация), на которые влияют как состав и количество загрязнителя в водной среде, так и условия в водоемах

(наличие коллоидных и взвешенных частиц, планктона, температуры, солнечного освещения и т.д.).

После аварии в мае 2015 г. содержание нефти в непроточном болоте площадью 400 м<sup>2</sup> и глубиной 1-1,2 м на территории Пуровского района ЯНАО составило 14,6%. Для очистки объекта 4 л суспензии консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с титром  $1,8 \cdot 10^8$  КОЕ/мл разводили в 100 л водопроводной воды и равномерно разбрызгивали на поверхность объекта. После этого производили аэрирование путем забора и возврата воды. Такой прием – внесение биологических препаратов с одновременным аэрированием неглубоких водоемов с целью увеличения уровня растворенного в воде кислорода активизирует микробиологическую деструкцию нефти и позволяет существенно ускорить процесс восстановления загрязненных экосистем. Дневная температура при проведении рекультивации была 14-20°C.

Однократное внесение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 снизило содержание поллютанта через четыре недели до 0,4%. Степень биодеструкции нефти составила 97,3%. В водоеме появились водоросли, которые отсутствовали перед началом эксперимента, что является характерным свидетельством удаления загрязнителя. Способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 запатентован в Российской Федерации (Патент РФ № 2627598).

\*\*\*

Таким образом, в результате проведения полевых экспериментов установлено, что выделенные и изученные микроорганизмы-нефтедеструкторы могут эффективно использоваться для очистки различных объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения. Так, показано, что в резко-континентальном климате Западного Казахстана и континентальном климате Южного Урала применение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> является

эффективным приемом для обезвреживания нефтесодержащих отходов, таких как нефтяной шлам и отработанная отбеливающая глина. Доказано, что обработка штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> способствует удалению из почвы нефтяного загрязнения при низких положительных температурах в почвенно-климатических условиях Западной Сибири. Подтверждено предположение о том, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может использоваться для очистки природных водоемов от нефти.

Данные, полученные в лабораторных и полевых экспериментах, были использованы для дальнейших исследований, связанных с разработкой новых полифункциональных биопрепаратов-нефтедеструкторов и технологий их получения и применения.

## ГЛАВА 12. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ- НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СЕРИИ «ЛЕНОЙЛ»®

### 12.1. Описание биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®

В результате проведенных исследований была разработана серия биопрепаратов-нефтедеструкторов под торговой маркой «Ленойл»® и получено Свидетельство на товарный знак (Приложение № 8). Она включает в себя биопрепараты «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП, «Ленойл»® – гранд, СХП и «Ленойл»® – NORD, СХП, предназначенные для очистки различных объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП, помимо прочего, может применяться в условиях низких положительных температур Западной Сибири.

Биопрепараты представляют собой сухие порошки (СХП) от светло-кремового до коричневого цвета, со специфическим, свойственным микробному препарату запахом, основа которых – жизнеспособные клетки непатогенных штаммов микроорганизмов, растущие на нефти и дизельном топливе (титр не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г). Сухая препаративная форма пригодна для длительного хранения (срок годности 2 года) и перевозки на значительные расстояния.

Биопрепараты производятся также и в жидком виде, что удобно при использовании их на объектах, расположенных недалеко от места производства. Жидкая форма биопрепарата серии «Ленойл»® представляет собой культуральную жидкость с титром жизнеспособных клеток не менее  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл (срок хранения до 3-х месяцев).

В состав биопрепарата «Ленойл»®, СХП входят клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; в состав «Ленойл»® – супер, СХП – клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. koreensis* ИБ-4; в состав «Ленойл»® – гранд, СХП – клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИБ 739; в состав биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП входят клетки микроорганизма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>. Помимо

окислительной активности, свойственной биопрепарату «Ленойл»®), СХП, биопрепараты «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП обладают нитрогеназной, нитрогеназной и ростстимулирующей активностью соответственно. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП обладает окислительной активностью, в т.ч. при низких положительных температурах.

Штаммы, входящие в состав биопрепаратов, депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов, Испанскую коллекцию типовых культур и хранятся в Коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН.

В состав препаратов вместе с действующими микробными штаммами входит незначительное количество компонентов сред для выращивания микроорганизмов, а также наполнитель (в сухие препаративные формы).

По величинам токсических доз при однократном воздействии на организм биопрепараты серии «Ленойл»® в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) (Приложения №№ 9-12).

Биопрепараты должны храниться в сухих, чистых, вентилируемых и отапливаемых помещениях по ГОСТ 28471.

## **12.2. Технические условия на биопрепараты-нефтедеструкторы серии «Ленойл»®**

Разработаны и соответствующим образом зарегистрированы технические условия на биопрепараты-нефтедеструкторы «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – гранд, СХП и «Ленойл»® – супер, СХП (титр не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г) (ТУ 9291-001-33822935-2012) (Приложение № 13), которые состоят из следующих разделов:

### **1. Технические требования;**

1.1. Биопрепараты должны соответствовать требованиям технических условий и изготавливаться по утвержденному в установленном порядке технологическому регламенту;

1.2. Требования к физико-химическим и микробиологическим показателям биопрепаратов;

- 1.3. Требования к сырью;
- 1.4. Упаковка;
- 1.5. Маркировка;
2. Требования безопасности;
  - 2.1. Токсикологическая характеристика;
  - 2.2. Пожароопасные свойства;
  - 2.3. Меры профилактики;
  - 2.4. Охрана окружающей среды;
  - 2.5. Меры первой помощи;
3. Правила приемки;
4. Методы испытаний;
  - 4.1. Отбор точечных проб и приготовление объединенной пробы;
  - 4.2. Определение внешнего вида;
  - 4.3. Определение массовой доли влаги;
  - 4.4. Определение концентрации бактериальных клеток;
  - 4.5. Определение числа клеток посторонних микроорганизмов;
  - 4.6. Определение окислительной активности биопрепарата;
  - 4.7. Определение нитрогеназной активности;
  - 4.8. Определение ростстимулирующей активности;
5. Транспортирование и хранение;
6. Указания по применению;
7. Гарантии изготовителя.

Разработаны и соответствующим образом зарегистрированы технические условия на биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»® – NORD, СХП (титр не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г) (ТУ 9291-007-33822935-2014) (Приложение № 14), которые состоят из тех же разделов, что и технические условия на биопрепараты «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – гранд, СХП и «Ленойл»® – супер, СХП, за исключением того, что п. 4.7. «Определение нитрогеназной активности» заменен на п. 4.7. «Определение окислительной активности биопрепарата при низких

положительных температурах», а п. 4.8. «Определение ростстимулирующей активности» отсутствует.

Получены Сертификаты соответствия выпускаемой продукции требованиям нормативных документов (Приложения №№ 15, 16).

### **12.3. Внутренние технологические регламенты промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®**

Разработаны и утверждены внутренние технологические регламенты на получение биопрепарата «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – гранд, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП (титр не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г) (ТУ 9291-001-33822935-2012) и биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП (титр не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г) (ТУ 9291-007-33822935-2014) (Приложения №№ 17, 18), которые состоят из следующих разделов:

1. Общая характеристика производства;
2. Характеристика производимой продукции;
3. Характеристика сырья, материалов, полупродуктов и энергоресурсов;
4. Описание технологического процесса приготовления препарата и схемы производства;
  - 4.1. Прием, хранение и подготовка сырья;
  - 4.2. Приготовление питательных сред в лабораторных условиях;
  - 4.3. Стерилизация ферментера с питательной средой в автоклаве;
  - 4.4. Приготовление бактериальной суспензии клеток штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ 5.3/2 или *P. koreensis* ИБ-4 или *P. ehimensis* ИБ-739 или *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>;
  - 4.5. Стерилизация технологической системы для наработки биопрепарата;
  - 4.6. Приготовление и стерилизация питательной среды в ферментере;
  - 4.7. Засев ферментера и культивирование в нем микроорганизмов;
  - 4.8. Фасовка жидкой препаративной формы биопрепарата;
  - 4.9. Приготовление сухой препаративной формы биопрепаратов;

- 4.9.1. Сепарирование культуральной жидкости;
- 4.9.2. Лиофильная сушка замороженной смеси биомассы и криопротектора;
- 4.9.3. Приготовление сухой препаративной формы биопрепарата «Ленойл»®; СХП;
- 4.9.4. Приготовление сухой препаративной формы биопрепарата «Ленойл»® – гранд, СХП;
- 4.9.5. Приготовление сухой препаративной формы биопрепарата «Ленойл»® – супер, СХП;
- 4.10. Фасовка готового биопрепарата;
- 5. Материальный баланс;
  - 5.1. Стадия приготовления питательной среды;
  - 5.2. Стадия культивирования;
  - 5.3. Стадия сепарации;
  - 5.4. Стадия лиофилизации;
  - 5.5. Стадия смешивания с наполнителем;
- 6. Нормы расхода сырья и энергосредств;
- 7. Контроль производства и управление технологическим процессом;
- 8. Возможные неполадки в работе и способы их ликвидации;
- 9. Характеристика основного технологического оборудования;
  - 9.1. Характеристика реакторного и емкостного оборудования;
  - 9.2. Характеристика теплообменного оборудования;
  - 9.3. Характеристика сушильного оборудования;
  - 9.4. Характеристика оборудования для сепарации культуральной жидкости;
  - 9.5. Характеристика насосно-компрессорного оборудования;
- 10. Характеристика отходов, сточных вод. Технологические решения по охране окружающей среды;
- 11. Безопасная эксплуатация производства;
  - 11.1. Перечень основных нормативов;
  - 11.2. Мероприятия, предусмотренные в проекте по обеспечению безопасности технологического процесса;



- 11.3. Гигиеническая характеристика веществ, используемых в производстве;
- 11.4. Перечень взрыво- и пожароопасных веществ (материалов);
- 11.5. Перечень опасных мест производства;
- 11.6. Способы обезвреживания токсичных, взрывоопасных и пожароопасных продуктов в случае аварии и разливов;
- 11.7. Противопожарные мероприятия;
- 11.8. Санитарно-гигиенические требования;
- 12. Перечень обязательных инструкций.

Промышленное производство биопрепаратов серии «Ленойл»® в виде культуральной жидкости и сухого порошка осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа). Всего с июня 2012 г. было получено 75210 кг биопрепаратов в сухом виде и более 384200 л – в жидкой препаративной форме (Приложение № 19). Менеджмент качества производства биопрепаратов соответствует положениям и требованиям стандарта ГОСТ Р ИСО 9001-2015 (ISO 9001:2015) (Приложение № 20).

#### **12.4. Технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®**

На рисунке 12.1 представлена принципиальная технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®. Чистую культуру углеводородокисляющих микроорганизмов (консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>) из пробирки с агаризованной питательной средой Раймонда путем смыва стерильной водопроводной водой пересевают в ферментер объемом 12 л со стерильной жидкой средой Раймонда (9 л) и дизельным топливом (1%) и выращивают при температуре 28°C, перемешивании 180 об/мин, с подачей стерильного воздуха 5-6 л/мин в течение 24-48 ч. Конечный титр готового инокулята должен быть не менее  $4 \cdot 8 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

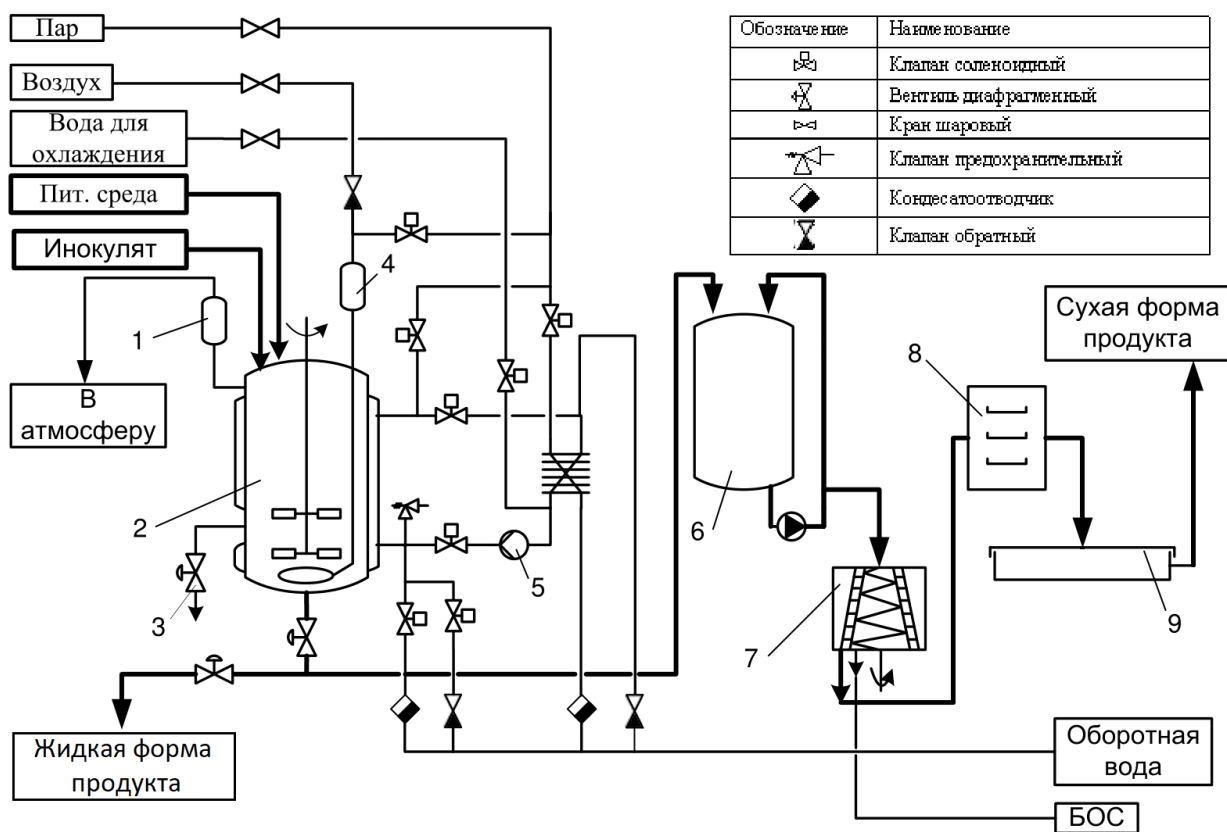


Рисунок 12.1 – Принципиальная технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкции серии «Ленойл»®. 1 – фильтр тонкой очистки на линии удаления воздуха; 2 – ферментер; 3 – пробоотборник; 4 – фильтр тонкой очистки на линии подачи воздуха в ферментер; 5 – циркуляционный насос; 6 – накопительная емкость для культуральной жидкости; 7 – сепаратор; 8 – морозильная камера; 9 – лиофильная сушилка

Далее осуществляют стерилизацию технологической системы для наработки биопрепарата. Для этого получают и стерилизуют сжатый воздух и готовят питательную среду (1000 л) для культивирования микроорганизмов в производственном ферментере (1350 л), которую затем стерилизуют в ферментере и добавляют расчетное количество дизельного топлива. Засевают ферментер и выращивают в нем микроорганизмы в течение 48 или 72 ч при 28°C, перемешивании 160 об/мин и с подачей воздуха не менее 450 л/мин. Температурный режим поддерживают подачей воды (35°C) в рубашку

ферментера. В дальнейшем, для контроля процесса культивирования, каждые 16-18 ч производят отбор проб для определения промежуточных значений pH среды и титра клеток. Готовый жидкий продукт (титр не менее  $4 \cdot 8 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) разливают в пластиковую тару. Для приготовления сухого биопрепарата бактериальную суспензию концентрируют сепарацией на бактофуге (9000 об/мин, производительность 130 л/ч). К полученной биомассе микроорганизмов с титром не менее  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ/г добавляют криопротектор и замораживают при  $-24^\circ\text{C}$ , после чего помещают в лифильную сушилку ( $-30 \dots -50^\circ\text{C}$ ). К лиофилизату с титром микроорганизмов не менее  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ/г добавляют наполнитель (отруби, сухие дрожжи или коалин). Готовый сухой продукт с титром микроорганизмов не менее  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/г расфасовывают в бумажные мешки.

Сухие препараты бактерий *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 производят по такой же схеме, внося при культивировании в лабораторном ферментере пеногаситель и не добавляя дизельное топливо. Для выращивания клеток *P. koreensis* ИБ-4 питательную среду Раймонда заменяют на среду Кинг Б, а для наработки жидкой культуры *P. ehimensis* ИВ 739 используют среду К1 и устанавливают температуру  $37^\circ\text{C}$ .

Биопрепарат «Ленойл»® – супер, СХП получают путем смешивания сухого препарата клеток микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и сухого препарата клеток микроорганизмов *P. koreensis* ИБ-4 в соотношении 1:1; биопрепарат «Ленойл»® – гранд, СХП – путем смешивания сухих препаратов клеток микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 в соотношении 1:1:1.

### **ГЛАВА 13. ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СЕРИИ «ЛЕНОЙЛ»®**

Биопрепараты-нефтедеструкторы серии «Ленойл»® широко применяются на территории Российской Федерации и за рубежом (Приложение № 21).

Разработана технология применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®, которая рекомендуется к использованию в следующих случаях:

- при разработке проектов рекультивации поверхностей и восстановлении ранее обработанных площадей как самостоятельный способ биологической очистки или как дополнительный (завершающий) этап после механического, физического либо другого способа очистки;
- для ликвидации старых (застарелых) загрязнений нефтепродуктами объектов окружающей среды;
- для обезвреживания нефтесодержащих отходов.

Технология применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»® заключается в их нанесении на загрязненную поверхность или их смешивании с загрязненными нефтепродуктами грунтами и отходами в присутствии биогенных элементов (азота, фосфора, калия и др.) в виде обычных минеральных удобрений при интенсивной аэрации. При очистке почв, извлеченных грунтов производят рыхление, а при очистке водных поверхностей и емкостей создают аэрацию путем рециркуляции жидкости. Внесение биопрепаратов производят с помощью разбрызгивающих и распылительных устройств.

Технология применения биопрепаратов серии «Ленойл»® способствует воссозданию естественных биологических процессов в природных средах за счет восстановления единого цикла обмена веществ, что достигается внесением микроорганизмов, разлагающих вредные и токсические вещества.

Наиболее эффективным способом применения биопрепарата из серии Ленойл»® является обработка им грунта в виде рабочей суспензии с

минеральными добавками с периодичностью 1 раз в 25-30 дней (1-4 раза за сезон) в зависимости от степени загрязнения и длительности вегетационного периода, под поверхностную обработку (вспашка, рыхление, дискование) методом дождевания с помощью любых предназначенных для этого агрегатов. Биопрепараты можно использовать при среднесуточных температурах воздуха 10-40°C («Ленойл»®), СХП, «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП) или 0-20°C («Ленойл»® – NORD, СХП).

Для интенсификации деструкции углеводов рекомендуется внесение в загрязненный грунт биогенных добавок (жидкий дрожжевой автолизат) из расчета 1 л на 1 кг сухого биопрепарата из серии Ленойл»®. Для создания оптимального водно-воздушного режима для микроорганизмов в рекультивируемом объекте полезно добавление органического субстрата (старая солома, силос и т.п.) из расчета 30% от массы нефтепродуктов, а также постоянное рыхление и полив участка. Для развития углеводородокисляющих бактерий необходима подкормка минеральными удобрениями, обеспечивающими содержание основных элементов питания, таких как азот, фосфор, калий. Наиболее оптимально использовать комплексное азотно-фосфорно-калийное минеральное удобрение (например, марки NPK 15:15:15 по ТУ 2186-181-00209438-01) из расчета 10 кг на 1 т нефтепродуктов. Минеральные удобрения, биогенные добавки и органический субстрат следует применять перед каждой обработкой рабочей суспензией биопрепарата. Рекомендуется посев на рекультивируемом участке травосмеси многолетних трав.

При незначительном слое загрязненной почвы – до 30 см и обеспечении кислородом, а также элементами минерального питания биопрепарат из серии Ленойл»® способен за летний период практически полностью разложить нефтяные углеводороды при их концентрации не более 10% и на 80-87% – при концентрации от 10 до 30%. При содержании нефтепродуктов свыше 30% необходимо снизить их концентрацию методом перемешивания загрязненной почвы с измельченной соломой, опилками.

Очистка водных поверхностей от нефти и нефтепродуктов заключается во внесении в загрязненную воду рабочей суспензии биопрепарата из серии «Ленойл»® с принудительной аэрацией водного объекта (Патент РФ № 2627598).

В процессе рекультивации очищаются грунт и песок, загрязненные нефтью или нефтепродуктами, а также обезвреживаются отходы нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности (отработанная отбеливающая глина, нефтесодержащий шлам).

### **13.1. Подготовительные мероприятия технологии применения биопрепарата-нефтедеструктора серии «Ленойл»®**

Для эффективного применения биопрепаратов-нефтедеструкторов необходимо произвести следующие подготовительные мероприятия:

- обследование загрязненного объекта и определение его площади;
- определение конкретных точек отбора проб с загрязненных объектов, отбор с них проб и их анализ с целью определения концентрации загрязнителя, физико-химических свойств загрязненного грунта, в том числе pH, наличия примесей и т.д., содержания минеральных веществ (азота, фосфора);
- утверждение вышестоящей организацией проекта рекультивации, иных восстановительных работ по очистке загрязненных объектов в соответствии с данной технологией, согласование его с природоохранными органами;
- определение потребности в минеральных и органических удобрениях;
- подготовка технических средств для приготовления и внесения удобрений и рабочей суспензии биопрепарата;
- приготовление рабочей суспензии биопрепарата.

### **13.2. Приготовление рабочей суспензии биопрепарата**

1 кг сухого биопрепарата из серии «Ленойл»® и 0,1 кг комплексной минеральной добавки для усиления процессов жизнедеятельности микроорганизмов-нефтедеструкторов (например, «Аммофос» ГОСТ 18918-85)

разводят в 200 л технической воды, тщательно перемешивают и вносят 0,2 л дизельного топлива для обеспечения бездефицитного питания, необходимого для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов. Выдерживают 24 ч при температуре 20-25°C, периодически перемешивая, потом разбавляют в 10 раз. Таким образом, из 1 кг сухого биопрепарата получают 2000 л рабочего раствора биопрепарата. Для микробиологического разложения 1 т нефтепродуктов необходим 1 кг сухого биопрепарата из серии Ленойл® на одно внесение. При использовании жидкого биопрепарата его предварительно разводят до титра  $10^8$  КОЕ/мл.

### **13.3. Технические средства для реализации технологии применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®**

При биорекультивации в качестве основного оборудования применяются выпускаемые серийно и сертифицированные в Российской Федерации устройства, обеспечивающие необходимую обработку и полив нефтезагрязненных объектов. Потребность в технике зависит от площади загрязненного участка – если она меньше 0,5 га используют мотоблок, мотопомпу, грузовой автомобиль; если больше 0,5 га – трактор, мотопомпу, грузовой автомобиль.

### **13.4. Воздействие природно-климатических и почвенно-географических условий при использовании биопрепаратов серии «Ленойл»® для биологической рекультивации почв, загрязненных нефтью**

При использовании биопрепаратов должны быть учтены следующие факторы:

– воздействие низких температур. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП активно окисляет углеводороды уже при 0°C, что немаловажно в условиях Западной Сибири, Крайнего Севера, где короткий период круглосуточных положительных температур окружающей среды. Этот биопрепарат сохраняет деструктивную активность и после воздействия отрицательных температур и рекомендуется для озимого внесения на нефтезагрязненные участки;

- влажность ниже 70% от полной влагоемкости. Полив улучшает агрохимические свойства почв и их ферментативную активность;
- заболоченность. На болотистых участках при условии высокой влажности биопрепарат можно вносить в сухом виде, без предварительной активации;
- загрязненность нефтью свыше 30%. Необходимо снизить концентрацию нефтепродуктов методом перемешивания загрязненной почвы с чистым грунтом или измельченной соломой, опилками;
- засоленность свыше 150 г/кг. Для снятия избыточного засоления обычно используют карбонатные соли, фосфогипс;
- высокое или низкое значение pH. Для раскисления почвы дополнительно можно вносить известь или доломитовую муку. В результате нефтезагрязнений дерново-подзолистые почвы могут превращаться в техногенные солончаки с высоким уровнем щелочности, избавиться от которой можно с помощью химической мелиорации в виде гипсования.
- сопутствующие загрязнения ксенобиотиками. Биопрепараты серии «Ленойл»® обладают окислительной активностью по отношению ко многим углеводородам и их производным, являющимися промышленными экотоксикантами.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ближайшем будущем человечество не готово оказаться от применения углеводородов в качестве основного источника энергии, поэтому темпы работ по разведке и эксплуатации месторождений, а также переработке этих полезных ископаемых будут только возрастать. К сожалению, на современном уровне развития нефтегазового комплекса не представляется возможным полностью исключить его негативное воздействие на экосистемы. Особенно остро данный вопрос стоит в нашей стране, для экономики которой нефтедобыча остается одной из главных отраслей промышленности и фундаментальной основой бюджетной системы, обеспечивая 51,3% доходов федерального бюджета (Нефтегазовый комплекс ..., 2015). Не менее важную роль эта отрасль играет в обеспечении энергетической безопасности и политических интересов России. Кроме того, большая часть нефтедобывающих предприятий страны сосредоточена в Западной Сибири, экосистемы которой обладают повышенной хрупкостью и низким потенциалом самоочищения, связанными с наличием многомерзлых пород и длительным периодом низких температур. Следует отметить, что в последнее время наметилась положительная тенденция к уменьшению числа аварийных ситуаций в нефтегазовом комплексе, что, вероятно, связано с ужесточением природоохранного законодательства и повышением уровня ответственности руководителей предприятий. Однако учитывая интенсификацию разведки и добычи углеводородного сырья, а также разнообразие почвенно-климатических условий, задача разработки и внедрения эффективных способов очистки и восстановления нефтезагрязненных территорий по-прежнему очень актуальна.

Наиболее перспективным, экологически чистым и экономически целесообразным решением данной проблемы является применение биологических технологий, основанных на использовании углеводородокисляющих микроорганизмов. Это подразумевает поиск и идентификацию микроорганизмов с высокой деструктивной активностью, а также всестороннее изучение их свойств.

Мировая тенденция перехода к органическому земледелию подразумевает отказ от использования агрохимикатов в пользу альтернативных экологически безопасных систем землепользования, в том числе биотехнологических способов защиты и стимулирования роста растений, основанных на применении микроорганизмов и их метаболитов. Как правило, эти микроорганизмы выделяют из природных биоценозов, тщательно изучают и разрабатывают на их основе биопрепараты для сельского хозяйства.

В ходе выполнения настоящей работы из нефтезагрязненных почв различных климатических зон России путем целенаправленного скрининга были выделены бактериальные культуры, разлагающие нефть в жидкой среде, в т.ч. и при низкой положительной температуре. Наиболее активные из них были предварительно идентифицированы на основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков. Так, изолят ИБ ДТ-5 из почвы с территории Республики Башкортостан представляет собой консорциум двух штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, а изолят ИБ 1.1 из почвы Красноярского края, способный к утилизации нефти при температуре 4-8°C, был отнесен к р. *Pseudomonas*.

Из многочисленных образцов почв различных регионов нашей страны были изолированы штаммы микроорганизмов, подавляющие рост микроскопических грибов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных растений. Один из них, штамм ИБ-4, проявляющий антагонистическую активность в отношении широкого спектра фитопатогенных микромицетов (pp. *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria*), был идентифицирован методами классической микробиологии как представитель р. *Pseudomonas*.

Однако для точного установления видовой принадлежности микроорганизмов только фенотипических и биохимических признаков не достаточно: современная систематика прокариот базируется на полифазном подходе – интегрированном применении информации фенотипического, генетического, филогенетического, хемотаксономического и экологического характера. Поэтому у выделенных микроорганизмов был проведен

сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrB*, ДНК-ДНК-гибридизация, определено содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК, построены дендрограммы филогенетического сходства, изучены такие хемотаксономические особенности как состав жирных кислот клеточной стенки, профиль белков клетки, установлены доминирующие хиноны. В результате этого установлено, что штаммы, образующие нефтеокисляющий консорциум, относятся к видам *Acinetobacter calcoaceticus* и *Ochrobactrum intermedium*, а изолят ИБ-4 принадлежит к виду *P. koreensis*.

Уровень гомологии последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК микроорганизма ИБ 1.1 с аналогичными последовательностями других представителей р. *Pseudomonas* был недостаточным для видового совпадения (не более 98,7%); штамм образовывал отдельную ветвь на филогенетическом древе. Кроме того, сравнительный анализ последовательностей трех функциональных генов (*gyrB*, *rpoB* и *rpoD*), содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК и данные ДНК-ДНК-гибридизации свидетельствовали об отсутствии видового сходства между указанным изолятом и штаммами р. *Pseudomonas*, показавших более 98% гомологии по гену 16S рРНК. Принимая во внимание вышесказанное, штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 был идентифицирован как типовой представитель нового, таксономически узаконенного вида р. *Pseudomonas*, для которого предложено название *Pseudomonas turukhanskensis* (по названию географического источника выделения – Туруханский район Красноярского края) и дано подробное таксономическое описание.

В ходе проведения настоящей работы был также установлен состав жирных кислот клеточной стенки и тем самым дополнено таксономическое описание биотехнологически ценного штамма *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739, продуцирующего разнообразные биологически активные вещества, в т.ч. фитогормоны, и хранящегося в коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

Параллельно с установлением видовой принадлежности выделенных штаммов-нефтедеструкторов и штамма-антагониста фитопатогенных грибов, проводились работы по изучению свойств, благодаря которым их можно будет

применять в природоохранной деятельности. В результате экспериментов установлено следующее:

– консорциум и образующие его бактерии *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 обладают значительной окислительной активностью в отношении широкого круга углеводов, нефти и нефтепродуктов, причем величина этого показателя выше у консорциума;

– для штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> также характерна высокая углеводородокисляющая активность, в т.ч. и при низкой положительной температуре;

– штаммы *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> способны к фиксации атмосферного азота и биodeградации углеводов в ходе этого процесса, причем у штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 она была эффективнее при комнатной (26°C), а у штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> – при низкой положительной температуре (8°C). Оба микроорганизма повышают потенциальную нитрогеназную активность инокулированной почвы, как при комнатной, так и при низкой положительной температуре;

– бактерия *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 синтезирует внеклеточные ПАВ, эмульгирующие гидрофобные субстраты;

– штамм *P. koreensis* ИБ-4 обладает значительной нитрогеназной активностью, а также продуцирует фитогормоны – ИУК и цитокининподобные вещества;

– у всех исследованных микроорганизмов, включая штамм *P. ehimensis* ИВ 739, отсутствует фитотоксичность.

На основании этих сведений было сделано заключение о возможности применения штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, а также консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 в экологической биотехнологии в качестве основы биопрепаратов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтезагрязнения, а штаммов *P. koreensis*

ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 – как дополнительных компонентов для ускорения этого восстановления.

Гипотеза была проверена в серии лабораторных опытов, в результате которых показано, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может эффективно применяться для очистки производственных сточных вод, содержащих углеводороды, а также грунтов и почвы, контаминированных нефтью. Комбинации консорциума микроорганизмов с бактериями *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739, обладающими фитогормональной активностью, не только способствуют удалению поллютанта, но и стимулируют рост и развитие растений-фитомелиорантов. Показана эффективность применения психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> для снижения содержания нефти в песке в условиях низкой положительной температуры.

В полевых экспериментах доказано, что в резко-континентальном климате Западного Казахстана и континентальном климате Южного Урала применение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> является эффективным приемом для обезвреживания нефтесодержащих отходов, таких как нефтяной шлам и отработанная отбеливающая глина; обработка штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup> способствует удалению из почвы нефтяного загрязнения при низкой положительной температуре в почвенно-климатических условиях Западной Сибири; консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может использоваться для очистки поверхности природных водоемов от нефти.

Научная новизна результатов проведенных исследований подтверждена 4 патентами РФ (Приложения №№ 22-25), а их итогом стала разработка серии полифункциональных биопрепаратов-нефтедеструкторов под торговой маркой «Ленойл»®, на которую получено Свидетельство на товарный знак. Биопрепараты предназначены для очистки различных объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и

восстановления почв в различных климатических условиях. Биопрепарат «Ленойл»®<sup>®</sup>, СХП состоит из клеток консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; в состав «Ленойл»® – супер, СХП дополнительно добавлены клетки микроорганизма *P. koreensis* ИБ-4; в состав «Ленойл»® – гранд, СХП помимо клеток микроорганизмов консорциума входят клетки бактерий *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739; действующим веществом биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП являются клетки микроорганизма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>Т</sup>. Помимо окислительной активности, свойственной биопрепарату «Ленойл»®<sup>®</sup>, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП обладают нитрогеназной, нитрогеназной и ростстимулирующей активностью соответственно. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП обладает окислительной активностью, в т.ч. при низких положительных температурах и может применяться в условиях Западной Сибири.

Были разработаны и утверждены технические условия и регламенты промышленного получения биопрепаратов серии «Ленойл»® в жидком и сухом виде. Выпуск продукции осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа).

Согласно разработанной технологии, наиболее эффективным способом применения биопрепарата-нефтедеструктора из серии «Ленойл»® является обработка грунта в виде рабочей суспензии с минеральными добавками с периодичностью 1 раз в 25-30 дней в зависимости от степени загрязнения и длительности вегетационного периода под поверхностную обработку (вспашка, рыхление, дискование) методом дождевания. С помощью биопрепаратов можно очищать грунт и песок, загрязненные нефтью или нефтепродуктами, а также обезвреживать нефтесодержащие отходы (отработанная отбеливающая глина, нефтешлам). Очистка водных поверхностей от нефти и нефтепродуктов заключается во внесении в загрязненную воду рабочей суспензии биопрепарата с принудительной аэрацией объекта.

Биопрепараты можно использовать при среднесуточных температурах воздуха 10-40°C («Ленойл»®<sup>®</sup>, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП) и 0-20°C («Ленойл»® – NORD, СХП).

## ВЫВОДЫ

1. Из нефтезагрязненных почв различных климатических зон России выделен нефтеокисляющий консорциум, состоящий из штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>, разлагающий нефть, в т.ч. при низких положительных температурах. Из пахотной почвы изолирован штамм бактерий *P. koreensis* ИБ-4 – антагонист фитопатогенных грибов. Все микроорганизмы идентифицированы согласно требованиям современной систематики прокариот.

2. Описан и таксономически узаконен новый вид микроорганизмов *Pseudomonas turukhanskensis*.

3. Обнаружено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 обладает высокой углеводородокисляющей (43-219 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата) и нитрогеназной активностью (до 0,44 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч), а также поверхностно-активными свойствами (снижает поверхностное натяжение на 25 мН/м и эмульгирует гидрофобные субстраты (E<sub>24</sub> 55-72%)); штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> окисляет нефть и углеводороды (74-169 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 8°C и 39-155 мг CO<sub>2</sub>/г субстрата при 26°C) и способен к азотфиксации (до 0,35 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч); штамм *P. koreensis* ИБ-4 эффективно фиксирует атмосферный азот (0,65 мкг N<sub>2</sub>/мл/ч) и продуцирует фитогормоны цитокининового ряда и ИУК (119 и 40 нг/мл культуральной жидкости соответственно).

4. Установлено, что при внесении консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 в загрязненный нефтью грунт, степень биodeградации нефтепродуктов достигает 75%, а при обработке штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> нефтезагрязненного песка этот показатель составляет 77-84%.

5. Показано, что использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 в резко-континентальном климате Западного Казахстана приводит к снижению концентрации углеводородов в нефтяном шламе с 10,5 до 3,9%, а обработка нефтезагрязненной

отбеливающей глины консорциумом микроорганизмов или штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> в континентальных климатических условиях Южного Урала, с одинаково высокой эффективностью уменьшает в ней содержание поллютанта (с 7,1 до 2,3% и с 22,8 до 10,8%).

6. Выявлено, что применение штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup> для очистки почв от нефтяного загрязнения в континентальных климатических условиях Западной Сибири снижало содержание нефтепродуктов с 4,9 до 0,4% за 1 месяц и с 70,3 до 23,3% – за 21 месяц экспозиции.

7. Установлено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может быть использован для очистки водной поверхности и производственных сточных вод от нефти и нефтепродуктов. Благодаря его интродукции степень биодеструкции нефти в непроточном болоте составила 97,3%, в сточной воде – 83,2%.

8. Интродукция комбинаций консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с бактериями *P. koreensis* ИБ-4 и *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 снижает содержание нефтепродуктов в почве в 3,1-3,5 раза, ускоряет на 2 суток всхожесть семян и на 6-7 суток начало всех стадий развития растений овса, а также способствует увеличению длины проростков на 34,8-77,8% и их массы в 1,6-2,7 раза по сравнению с растениями в нефтезагрязненной почве, не обработанной микроорганизмами.

9. На основе выделенных и изученных микроорганизмов разработана серия полифункциональных биопрепаратов-нефтедеструкторов под торговой маркой «Ленойл»® , которая включает в себя биопрепараты «Ленойл»®, СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2), «Ленойл»® – супер, СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. koreensis* ИБ-4), «Ленойл»® – гранд, СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739) и «Ленойл»® – NORD, СХП (*P. turukhanskensis* ИБ 1.1<sup>T</sup>), предназначенные для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП, помимо прочего,



может применяться в условиях низких положительных температур в Западной Сибири.

10. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство и разработана технология применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные в ходе идентификации микроорганизмов данные по нуклеотидным последовательностям генов, жирным кислотам и клеточным белкам могут быть полезны при установлении видовой принадлежности других микроорганизмов.

Изученные в настоящей работе штаммы микроорганизмов депонированы в международные коллекции микроорганизмов (ВКМ, СЕСТ) и доступны специалистам в различных областях биологии для фундаментальных и прикладных исследований.

Материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе в высших учебных заведениях по направлению «Биотехнология» и «Микробиология».

Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований в направлении расширения полифункциональности биопрепаратов для экобиотехнологии.

Разработанные биопрепараты-нефтедеструкторы серии «Ленойл»® производятся в промышленных масштабах и рекомендуются для очистки в различных климатических условиях почв, грунтов, водных поверхностей, обезвреживания твердых нефтесодержащих отходов и восстановления почв.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдусаламова, Х.С. Влияние нефтезагрязнения на показатели биологической активности почв / Х.С. Абдусаламова, А.М. Дохтукаева, Я.С. Усаева // *Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.* – 2017. – № 12(42). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/5296>.
2. Авчиева, П.Б. Консорциум дрожжей *Candida maltosa* для биодegradации нефтезагрязнений / П.Б. Авчиева // Патент РФ 2114174. Заявл. 05.06.1997. Оpubл. 27.06.1998.
3. Актуганов, Г.Э. Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus Cohn* – антагонистов фитопатогенных грибов / Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев, Л.Ю. Кузьмина [и др.] // *Микробиология.* – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 356-360.
4. Актуганов, Г.Э. Внеклеточные гидролазы штамма *Bacillus sp. 739* и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов / Г.Э. Актуганов, Н.Ф. Галимзянова, А.И. Мелентьев, Л.Ю. Кузьмина // *Микробиология.* – 2007. – Т. 76, № 4. – С. 471-479.
5. Албулов, А.И. Технологии производства товарной формы препарата-нефтедеструктора «Родер» и эффективность применения этих форм в лабораторных условиях и в природе / А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, М.А. Фролова [и др.] // *Известия Самарского науч. центра РАН.* – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1545-1549.
6. Алексеев, А.Ю. Препарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов / А.Ю. Алексеев, С.С. Беднаржевский, В.А. Забелин [и др.] // Патент РФ № 2337069. Заявл. 02.04.2007. Оpubл. 27.10.2008. Бюл. № 30.
7. Алексеев, А.Ю. Подбор ассоциации микроорганизмов-деструкторов нефтяной фракции твердых алканов при низких положительных температурах / А.Ю. Алексеев, Е.А. Смородина, Л.С. Адаменко [и др.] // *Современные проблемы науки и образования.* – 2011. – № 6. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=4939>.

8. Алексеев, А.Ю. Не навреди / А.Ю. Алексеев // Промышленность и экология Севера. – 2011. – № 5-6 (13-14). – С. 40-47.

9. Алексеева, Т.П. Эффективность мелиорантов на основе активированного торфа для восстановления нефтезагрязненных почв / Т.П. Алексеева, Т.И. Бурмистрова, Л.Д. Стахина, Н.Н. Терещенко // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. – 2013. – № 2 (22). – С. 43-51.

10. Анапольский, В.Н. Очистка нефтесодержащих сточных вод / В.Н. Анапольский, С.В. Олиферук, А.П. Романенко // С.О.К. Сантехника. Отопление. Кондиционирование. – 2011. – № 1. – С. 27-31.

11. Андреева, И.С. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды / И.С. Андреева, Е.К. Емельянова, С.Н. Загребельный [и др.] // Биотехнология. – 2006. – № 1. – С. 43-52.

12. Андреева, И.С. Утилизация углеводов психротолерантными штаммами-деструкторами / И.С. Андреева, Е.К. Емельянова, С.Е. Олькин [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 2. – С. 223-228.

13. Андрианов, А.П. Очистка сточных вод с применением технологии мембранного биореактора / А.П. Андрианов // Экология производства. – 2012. – № 11. – С. 66-74.

14. Анохина, Т.О. Ризосферные плазмидосодержащие бактерии рода *Pseudomonas*, стимулирующие рост растений и деградирующие полициклические ароматические углеводороды: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Анохина, Татьяна Орестовна. – Пушино, 2011. – 24 с.

15. Антонюк, С.И. Влияние pH на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на этаноле / С.И. Антонюк, А.Д. Конон // Микробные биотехнологии: актуальность и будущее: Мат. VIII междунар. конф. – Киев, 2012. – С. 34-35.

16. Арзамазова, А.А. Влияние нефтезагрязнения на агрохимические свойства чернозема типичного и продуктивность яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / А.А. Арзамазова, Р.Р. Кинжаев, А.Д. Гальцова, А.Н. Хрептугова // Проблемы агрохимии и экологии. – 2017. – № 4. – С. 21-25.

17. Артюх, Е.А. Перспективы применения биосорбентов для очистки водоемов при ликвидации аварийных разливов нефти / Е.А. Артюх, А.С. Мазур, Т.В. Украинцева, Л.В. Костюк // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2014. – № 26. – С. 58-66.

18. Архипова, Т.Н. Влияние микроорганизмов, продуцирующих цитокинины на рост растений / Т.Н. Архипова, С.Ю. Веселов, А.И. Мелентьев [и др.] // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С. 50-55.

19. Астанин, А.И. Штамм бактерий *Pseudomonas denitrificans*, обладающий свойством утилизировать фенантрен / А.И. Астанин, С.Н. Загребельный, А.Ю. Алексеев, В.А. Забелин // Патент РФ № 2575064. Заявл. 26.01.2015. Оpubл. 10.02.2016. Бюл. № 4.

20. Астафьева, Е.А. Разработка состава питательной среды для микроорганизма *Azotobacter chroococcum* / Е.А. Астафьева, Б.Ж. Муталиева, Ж.К. Надирова, А.А. Нуржанова // Отраслевые аспекты технических наук. – 2012. – № 2(14). – С. 26-27.

21. Атаманова, О.В. Биологические методы переработки нефтешламов / О.В. Атаманова, А.И. Мухаметшина // Комплексные проблемы техносферной безопасности: Мат. междунар. науч.-практ. конф. – 2015. – Сборник № 4. – URL: [http://www.б-б.su/pr\\_460.html](http://www.б-б.su/pr_460.html).

22. Багдасарова, Ю.А. Обезвреживание нефтезагрязненных грунтов методом биодеструкции / Ю.А. Багдасарова // Экологические проблемы горнопромышленных регионов: Сб. докл. междунар. молодежной конф. – Казань: КНИТУ, 2012. – С. 39-42.

23. Бакаева, М.Д. Влияние микроорганизмов-деструкторов углеводов на токсичность загрязненного нефтью чернозема / М.Д. Бакаева, О.Н. Логинов, О.С. Смолова // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1563-1566.

24. Бакаева, М.Д. Представители рода *Aspergillus* в черноземах и лесных почвах Башкортостана / М.Д. Бакаева, Н.Ф. Галимзянова, Н.А. Киреева [и др.] //

Биотехнология – от науки к практике: Мат. Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014а. – С. 19-22.

25. Бакаева, М.Д. Использование для биорекультивации микроорганизмов деструкторов углеводов рода *Pseudomonas* с микостатической активностью / М.Д. Бакаева, О.С. Смолова, О.Н. Логинов // Биотехнология. – 2014б. – № 6. – С. 60-70.

26. Баландина, А.Г. Развитие мембранных технологий и возможность их применения для очистки сточных вод предприятий химии и нефтехимии / А.Г. Баландина, Р.И. Хангильдин, И.Г. Ибрагимов, В.А. Мартяшева // Нефтегазовое дело. – 2015. – № 5. – С. 336-375.

27. Барахнина, В.Б. Сравнительный анализ биопрепаратов для ликвидации нефтяных загрязнений почвы и воды / В.Б. Барахнина // Экологический вестник России. – 2011. – № 10. – С. 14-17.

28. Батарагин, В.М. Препарат для очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений и способ его получения / В.М. Батарагин, Л.Ю. Завальский, А.А. Ильин // Патент РФ № 2516412. Заявл. 20.12.2011. Оpubл. 20.05.2014. Бюл. № 14.

29. Бахонина, Е.И. Современные технологии переработки и утилизации углеводородсодержащих отходов. Сообщение 2. Физико-химические, химические, биологические методы утилизации и обезвреживания углеводородсодержащих отходов / Е.И. Бахонина // Башкирский химический журнал. – 2015. – Т. 22, № 2. – С. 41-49.

30. Баширова, Р.М. Устойчивость дягиля лекарственного к загрязнению почвы сырой нефтью / Р.М. Баширова, А.С. Григориади, Н.А. Киреева [и др.] // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 5. – С. 710-715.

31. Башкин, В.Н. Аварийные разливы углеводородов в водную среду: проблемы и пути их решения / В.Н. Башкин, Р.В. Галиулин, Р.А. Галиулина // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2010. – № 11. – С. 4-7.

32. Белик, Е.С. Исследование возможности использования отходов производства в качестве биосорбента / Е.С. Белик, К.А. Злобина // Вестник ПНИПУ. Приклад. экология. Урбанистика. – 2016. – № 3. – С. 62-76.

33. Белик, Е.С. Оценка эффективности применения биосорбента в технологии биологической очистки воды и почвы от нефтепродуктов / Е.С. Белик // Вестн. ПНИПУ. Приклад. экология. Урбанистика. – 2017. – № 4. – С. 104-114.

34. Беловежец, Л.А. Возможные пути деструкции полиароматических углеводов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений / Л.А. Беловежец, Л.Е. Макарова, М.С. Третьякова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 1. – С. 76-81.

35. Белонин, М.Д. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов / М.Д. Белонин, Е.А. Рогозина, Р.М. Свечина [и др.] // Патент РФ № 2053205. Заявл. 29.09.1994.

36. Бойко, Ю.Н. Природные сорбенты, используемые для очистки вод от нефти и продуктов ее переработки / Ю.Н. Бойко, А.И. Агошков, А.Н. Гульков [и др.] // Горный информ.-аналит. бюл. – 2013. – № 63. – С. 12-17.

37. Боковинова, Т.Н. Использование нефтешламов в строительстве дорожных покрытий и одежд / Т.Н. Боковинова, Д.Р. Шпербер, Е.Р. Шпербер, С.С. Волкова // Нефтегазовое дело. – 2011. – № 2. – С. 311-315.

38. Большаков, Е.Г. Способ получения биопрепарата для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов / Е.Г. Большаков, Д.А. Черенков, М.Ю. Шевченко // Патент РФ № 2636343. Заявл. 09.03.2016. Оpubл. 14.09.2017. Бюл. № 33.

39. Борзенков, И.А. Консорциум микроорганизмов *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida* sp., используемый для очистки почвенных и солоноватоводных экосистем от загрязнений нефтепродуктами / И.А. Борзенков, Е.И. Милехина, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Патент РФ № 2023686. Заявл. 13.04.1992. Оpubл. 30.11.1994.

40. Борзова, О.В. Разложение компонентов нефти почвенными бактериями / О.В. Борзова, Т.В. Фунтикова, Н.С. Егозарьян [и др.] // Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов: Мат. 4-й Пущинской конф. – М.: ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 30-31.

41. Бормотов, А.Н. Обоснование технологии утилизации отходов нефтеперерабатывающей промышленности при производстве экологически чистых композитов / А.Н. Бормотов, С.В. Тюрденева // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс: периодич. науч. издание. – Пенза: ПензГТУ, 2014. – С. 109-112.

42. Боронин, А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25-31.

43. Ботвиненко, И.В. Разработка методов биодеструкции нефтешламов / И.В. Ботвиненко, К.М. Чореклиева, Д.О. Сидоренко, В.А. Винокуров // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2013. – № 9. – С. 18-22.

44. Ботвинко, И.В. Бактериальный биопрепарат / И.В. Ботвинко, М.А. Шпакова, Е.А. Сребняк [и др.] // Патент РФ № 2430892. Заяв. 27.11.2010. Опубл. 10.10.2011. Бюл. № 28.

45. Брянская, А.В. Теоретические и практические аспекты проблемы биологического окисления углеводов микроорганизмами / А.В. Брянская, Ю.Е. Уварова, Н.М. Слынько [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 4/2. – С. 999-1012.

46. Бурлака, С.Д. Использование природных и искусственных сорбентов для очистки нефтесодержащих сточных вод / С.Д. Бурлака, М.Р. Бруйка // Научные труды КубГТУ. – 2017. – № 7. – С. 71-77.

47. Вейант, Р. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных) / Р. Вейант, У. Мосс, Р. Уивер [и др.]. – М.: Мир, 1999. – 791 с.



48. Вельков, В.В. Стандартизация формата описаний промышленных технологий биоремедиации / В.В. Вельков // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 70-76.

49. Ветрова, А.А. Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодegradации / А.А. Ветрова, А.А. Игнатова, А.Е. Филонов [и др.] // Известия Тульского гос. ун-та. Естеств. науки. – 2008. – Вып. 2. – С. 186-193.

50. Ветрова, А.А. Интенсификация биодegradации нефти плазмидосодержащими штаммами *Pseudomonas* в модельных почвенных системах / А.А. Ветрова, А.А. Овчинникова, И.Ф. Пунтус [и др.] // Биотехнология. – 2009. – № 4. – С. 82-90.

51. Ветрова, А.А. Биодegradация углеводов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Ветрова Анна Андрияновна. – Москва, 2010. – 26 с.

52. Ветрова, А.А. Сравнительная эффективность дegradации нефтепродуктов консорциумом плазмидосодержащих штаммов-деструкторов и биопрепаратами «МикроБак», «Биоойл» / А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А.Е. Филонов [и др.] // Известия Тульского гос. ун-та. Естеств. науки. – 2013а. – Вып. 2, ч. 1. – С. 258-272.

53. Ветрова, А.А. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводов нефти / А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А.Е. Филонов [и др.] // Известия Тульского гос. ун-та. Естеств. науки. – 2013б. – Вып. 2, ч. 1. – С. 241-257.

54. Ветрова, А.А. Биодegradация нефти консорциумом штаммов-нефтедеструкторов в лабораторных модельных системах / А.А. Ветрова, В.А. Забелин, А.А. Иванова [и др.] // Юг России: экология, развитие. – 2018. – Т. 13, № 1. – С. 184-198.

55. Вечерковская, М.Ф. Оценка микробиоты ротовой полости у детей с онкогематологическими заболеваниями: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Вечерковская Мария Фёдоровна. – Санкт-Петербург, 2015. – 160 с.

56. Владимиров, В.А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия / В.А. Владимиров // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования. – 2014. – Т. 4, № 1. – С. 217-229.

57. Водянова, М.А. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти в почве / М.А. Водянова, Е.И. Хабарова, Л.Г. Донерьян // Горный информ.-аналит. бюл. – 2010. – № 10. – С. 253-258.

58. Воеводина, Т.С. Влияние нефти на химические свойства чернозема обыкновенного Южного Предуралья / Т.С. Воеводина, А.М. Русанов, А.В. Васильченко // Вестник ОГУ. – 2015. – № 10(185). – С. 157-161.

59. Волков, М.Ю. Препарат для биodeградации нефтепродуктов "Биоионит" и способ его получения / М.Ю. Волков, А.А. Ильин, А.А. Калилец // Патент РФ № 2571219. Заявл. 25.06.2013. Оpubл. 20.12.2015. Бюл. № 35.

60. Волченко, Н.Н. Скрининг углеводородокисляющих бактерий – продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама / Н.Н. Волченко, Э.В. Карасева // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 57-62.

61. Воробьев, Д.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на макрозообентос / Д.С. Воробьев // Известия Томского политех. ун-та. – 2006. – Т. 309, № 3. – С. 42-45.

62. Воробьев, Д.С. Биологические основы очистки донных отложений водных объектов от нефти и нефтепродуктов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.08 / Воробьев Данил Сергеевич. – Томск, 2013. – 46 с.

63. Воскобойников, Г.М. О возможной роли *Fucus vesiculosus* в очистке прибрежных акваторий от нефтяного загрязнения / Г.М. Воскобойников, Д.В. Пуговкин // Вестник МГТУ. – 2012. – Т. 15, № 4. – С. 716-721.

64. Габбасова, И.М. Деградация и мелиорация почв при загрязнении нефтепромысловыми сточными водами / И.М. Габбасова, Р.Р. Сулейманов, Т.Т. Гарипов // Почвоведение. – 2013. – № 2. – С. 226-233.

65. Гаврилин, И.И. Перспективы использования биоиндикационных методов исследования при оценке фитотоксичности нефтезагрязненных почв / И.И. Гаврилин, А.М. Шигапов // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 10. – С. 33-39.

66. Газалиев, И.М. Радиоэкологические аспекты добычи нефти и газа в Дагестане / И.М. Газалиев, М.-П.Б. Айтеков, М.Р. Бабаев, И.А. Идрисов // Вестник Дагестанского науч. центра. – 2014. – № 55. – С. 27-30.

67. Галинуров, И.Р. Оценка отдалённых последствий нефтяного загрязнения паводково-пойменных комплексов малых рек / И.Р. Галинуров, А.М. Сафаров, Ю.В. Островская [и др.] // Нефтегазовое дело. – 2011. – № 2. – С. 152-170.

68. Галкина, Н.А. Биосорбент для ликвидации нефти с поверхности водоемов / Н.А. Галкина, Е.А. Галкин, И.В. Катаева [и др.] // Патент РФ № 2529771. Заявл. 19.04.2013. Оpubл. 27.09.2014. Бюл. № 27.

69. Галкина, Н.А. Эколого-экономическая оценка технологии рекультивации нефтезагрязненных земель с использованием эффективного биопрепарата / Н.А. Галкина, О.А. Назаренко, В.Н. Шафран [и др.] // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2017. – Т. 19, № 2(2). – С. 244-247.

70. Гесс, Т.А. Модификация нефтяных растительных сорбентов / Т.А. Гесс, А.С. Пименова, Е.В. Дудик // Химия и химическая технология в XXI веке: Мат. XVII междунар. науч.-практ. конф. – Томск: ТПУ, 2016. – С. 461-462.

71. Глязнецова, Ю.С. Влияние нефтезагрязнения почв на рост и развитие растений / Ю.С. Глязнецова // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель: Мат. IX Всеросс. науч. конф. с междунар. участием. Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2012. – С. 36-41.

72. ГН 2.1.5.1315-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – М.: Изд-во стандартов, 2003. – 154 с.

73. Говорушко, С.М. Экологические последствия добычи нефти и газа со дна моря/ С.М. Говорушко // Экология промышленного производства. – 2011. – № 3. – С. 27-32.

74. Гоголева, О.А. Углерододокисляющие микроорганизмы природных экосистем / О.А. Гоголева, Н.В. Немцева // Бюллетень Оренбургского науч. центра УрО РАН. – 2012. – № 2. – С.1-7.

75. Гоголева, О.А. Каталазная активность углерододокисляющих бактерий: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Гоголева Ольга Александровна. – Оренбург, 2012. – 147 с.

76. Горелова, О.М. Исследования по утилизации избыточного активного ила / О.М. Горелова, К.Ю. Титова // Ползуновский вестник. – 2015. – Т. 1, № 4. – С. 114-118.

77. Горшков, М.В. Экологический мониторинг / М.В. Горшков. – Владивосток: ТГЭУ, 2010. – 313 с.

78. ГОСТ Р 57447-2017. Наилучшие доступные технологии. Рекультивация земель и земельных участков, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Основные положения. – М.: Стандартинформ, 2017. – 32 с.

79. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2016 году». – М.: Минприроды России; НИА-Природа, 2017. – 760 с.

80. Градова, Н.Б. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв / Н.Б. Градова, И.Б. Горнова, Р. Эддауди, Р.Н. Салина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 318-321.

81. Григориади, А.С. Оценка эффективности посевов различных фиторемедиантов для восстановления нефтезагрязненной серой лесной почвы

/А.С. Григориади, А.Р. Амирова, Н.В. Лопатин // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(4). – С. 1266-1268.

82. Григориади, А.С. Изучение устойчивости дикорастущих растений-фиторемедиантов к загрязнению почвы сырой нефтью / А.С. Григориади, Р.И. Султанова // Биотехнология – от науки к практике: Мат. Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014. – С. 22-25.

83. Григорьев, А.Ю. Люди, нефть, птицы. Обзор мирового опыта спасения птиц при нефтяном загрязнении / А.Ю. Григорьев, А.Ю. Книжников, К.А. Пахорукова. – М.: Всемирный фонд дикой природы (WWF), 2014. – 57 с.

84. Григорьева, Т.В. Роль азотфиксирующих микроорганизмов в фиторемедиации промышленных углеводородных шламов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Григорьева Татьяна Владимировна. – Казань, 2009. – 23 с.

85. Григорьева, Т.В. Способ обезвреживания углеводородсодержащих шламов / Т.В. Григорьева, А.А. Несмелов, О.Н. Ильинская [и др.] // Патент РФ № 2464114. Заявл. 26.05.2010. Оpubл. 10.06.2012. Бюл. № 16.

86. Григорьева, Т.В. Штамм бактерий *Pseudomonas stutzeri* – деструктор алифатических и ароматических нефтяных углеводородов и стимулятор роста растений и его использование / Т.В. Григорьева, А.В. Лайков, А.А. Несмелов [и др.] // Патент РФ № 2529948. Заявл. 13.09.2012. Оpubл. 10.10.2014. Бюл. № 28.

87. Гринчишин, Н.Н. Фитотестирование нефтезагрязненных почв / Н.Н. Гринчишин // Экология и защита окружающей среды: Сб. тез. III междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2016. – С. 122-123.

88. Гудимов, А.В. Способ очистки прибрежной зоны морей от комплексного загрязнения с использованием двустворчатых моллюсков / А.В. Гудимов // Патент РФ № 2494978. Заявл. 13.06.2012. Оpubл. 10.10.2013. Бюл. № 28.

89. Гудимов А.В. Способ биологической очистки литоральной зоны морей от нефтепродуктов / А.В. Гудимов // Патент РФ № 2505489. Заявл. 13.08.2012. Оpubл. 27.01.2014. Бюл. № 3.

90. Гуславский, А.И. Перспективные технологии очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / А.И. Гуславский, З.А. Канарская // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2011. – № 20. – С. 191-199.

91. Данг, Т.Т. Биодegradация нефти и нефтепродуктов с использованием нового консорциума бактерий рода *Acinetobacter*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Данг Тху Тхюи. – Воронеж, 2012. – 24 с.

92. Двадненко, М.В. Методы очистки вод от загрязнений нефтью и нефтепродуктами / М.В. Двадненко, Н.М. Привалова // Междунар. журнал экспериментального образования. – 2017. – № 3-1. – С. 90-91.

93. Дегтярева, И.А. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* 5 V(e), используемый для получения азотфиксирующего удобрения для зерновых и кормовых культур / И.А. Дегтярева, А.Х. Яппаров, И.А. Яппаров [и др.] // Патент РФ № 2464308. Заявл. 11.11.2010. Оpubл. 20.10.2012. Бюл. № 29.

94. Дедов, А.Г. Биоразлагаемый композиционный сорбент нефти и нефтепродуктов / А.Г. Дедов, Е.А. Иванова, Е.Е. Белоусова [и др.] // Патент РФ № 2528863. Заявл. 03.06.2013. Оpubл. 20.09.2014. Бюл. № 26.

95. Делеган, Я.А. Термотолерантные бактерии-деструкторы углеводов нефти: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Делеган Янина Адальбертовна. – Пушино, 2016. – 20 с.

96. Делеган, Я.А. Разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком климате / Я.А. Делеган, А.А. Ветрова, М.А. Титок, А.Е. Филонов // Биотехнология. – 2016а. – № 1. – С. 53-64.

97. Делеган, Я.А. Термотолерантные бактерии-нефтедеструкторы, выделенные из проб грунта и воды географически удаленных регионов / Я.А. Делеган, А.А. Ветрова, В.Н. Акимов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016б. – Т. 52, № 4. – С. 383-391.

98. Делеган, Я.А. Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого

климата / Я.А. Делеган, А.А. Ветрова, А.А. Иванова [и др.] // Патент РФ № 2617941. Заявл. 13.10.2015. Оpubл. 28.04.2017. Бюл. № 13.

99. Демидов, Е.А. Применение МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов / Е.А. Демидов, К.В. Старостин, В.М. Попик, С.Е. Пельтек // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/1. – С. 758-764.

100. Демьянова, Н.А. Удаление тонких нефтяных пленок с водной поверхности / Н.А. Демьянова, М.В. Сентюрова, С.И. Васильев, И.В. Надейкин // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2013. – № 10. – С. 46-49.

101. Денисова, Е.С. Анализ устойчивости и аккумуляционной способности высших водных растений в условиях экологического загрязнения рек нефтепродуктами / Е.С. Денисова // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8-4. – С. 553-556.

102. Джусупова, Д.Б. Биоремедиация объектов окружающей среды углеводородокисляющими микроорганизмами рода *Pseudomonas*: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07, 03.00.16 / Джусупова Дария Бекайдаровна. – Алматы, 2010. – 40 с.

103. Держинская, И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов / И.С. Держинская. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. – 348 с.

104. Дмитриева, В.В. Влияние нефтяного загрязнения на морфофизиологические показатели некоторых травянистых растений / В.В. Дмитриева, Г.А. Петухова // APRIORI. Сер. Естеств. и техн. науки. – 2017. – № 2. – URL: <http://apriori-journal.ru/seria2/2-2017/Dmitrieva-Petuhova.pdf>.

105. Добровольская, Т.Г. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий / Т.Г. Добровольская, И.Н. Скворцова, Л.В. Лысак. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 76 с.

106. Добыча нефти в Ханты-Мансийском автономном округе в 2017 г. снизится на 1,6%. И это признак стабилизации [Электронный ресурс] // Neftegaz.ru. – URL: <https://neftegaz.ru/news/view/166674-Dobycha-nefti-v-Hanty-Mansiyskom-avtonomnom-okruge-v-2017-g-snizitsya-na-16-I-eto-priznak-stabilizatsii>.

107. Добыча нефти на Ямале за первое полугодие 2017 года выросла на 25% [Электронный ресурс] // Информационное агентство России (ТАСС). – URL: <http://tass.ru/ekonomika/4444035>.

108. Доклад об экологической ситуации в Ямало-Ненецком автономном округе в 2015 г. [Электронный ресурс] // Официальный портал государственных органов власти Ямало-Ненецкого автономного округа. – URL: <http://правительство.янао.рф/region/ecology/?print=on>.

109. Доклады об экологической ситуации в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре [Электронный ресурс] // Служба по контролю и надзору в сфере охраны окружающей среды, объектов животного мира и лесных отношений Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (Природнадзор Югры) – URL: <https://prirodnadzor.admhmao.ru/doklady-i-otchyety/>.

110. Долгополова, В.Л. Способы очистки морских акваторий от нефтяных загрязнений / В.Л. Долгополова, О.В. Патрушева // Молодой ученый. – 2016. – № 29. – С. 229-234. – URL: <https://moluch.ru/archive/133/37456>.

111. Донерьян, Л.Г. Микроскопические почвенные грибы – организмы-биоиндикаторы нефтезагрязненных почв / Л.Г. Донерьян, М.А. Водянова, Ж.Е. Тарасова // Гигиена и санитария. – 2016. – № 9. – С. 891-894.

112. Донец, Е.В. Влияние нефтяного загрязнения почвы на прорастание хвойных видов древесных растений / Е.В. Донец, Л.В. Должанкина // Омский науч. вестник. Биол. науки. – 2014. – № 1. – С. 151-154.

113. Донец, Е.В. Влияние нефтяного загрязнения почвы в условиях юго-западной части Крапивинского нефтяного месторождения на прорастание хвойных видов древесных растений / Е.В. Донец // Омский науч. вестник. Биол. науки. – 2015. – № 1. – С. 206-209.



114. Дорохова М.Ф. Сообщества почвенных водорослей как индикаторы состояния почв в районах нефтедобычи / М.Ф. Дорохова // Водоросли: таксономия, экология, использование в мониторинге. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – С. 281-287.

115. Драгинский, В.Л. Озонирование в процессах очистки воды / В.Л. Драгинский, Л.П. Алексеева, В.Г. Самойлович. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 400 с.

116. Драчук, С.В. Фотогетеротрофные пурпурные бактерии в почвах, загрязнённых углеводородами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Драчук Сергей Владимирович. – Тюмень, 2004. – 17 с.

117. Дубина, В.А. Нефтяное загрязнение Дальневосточного морского заповедника по спутниковым данным и натурным наблюдениям / В.А. Дубина, И.О. Катин // Вестник ДВО РАН. – 2012. – № 6. – С. 94-100.

118. Дубовик, И.Е. Биоиндикация нефтяного загрязнения почв с использованием цианобактерий и водорослей / И.Е. Дубовик, М.Ю. Шарипова, Т.Р. Кабиров // Биотехнология – от науки к практике: Мат. Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014. – С. 25-29.

119. Дубовик, И.Е. Изменение цианобактериально-водорослевых ценозов нефтезагрязненных почв при биоремедиации / И.Е. Дубовик, М.Ю. Шарипова, Т.Р. Кабиров // Вестник Башкирского ун-та. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 111-114.

120. Дубровская, Е.В. Изменение фитотоксичности полициклических ароматических углеводородов в процессе их микробной деградации / Е.В. Дубровская, Н.Н. Позднякова, А.Ю. Муратова, О.В. Турковская // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 1. – С.180-186.

121. Дягилец, Е.Ю. Люди, нефть, птицы. Рекомендации для практических мероприятий / Е.Ю. Дягилец, А.Ю. Книжников, Р.А. Мнацеканов, О.В. Пегова. – М.: Всемирный фонд дикой природы (WWF), 2014. – 58 с.

122. Дядечко, В.Н. Штамм *Pseudomonas putida* 36, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / В.Н. Дядечко, Л.Е. Толстокорова, Т.Н. Морозова // А.С. СССР № 1076446. Заявл. 22.07.1982. Оpub. 28.02.1984.

123. Дядечко, В.Н. О биологической рекультивации нефтезагрязненных песочных почв Среднего Приобья / В.Н. Дядечко, Л.Е. Толстокорова, С.Н. Гашев и др. // Почвоведение. – 1990. – № 9. – С. 148-151.

124. Евдокимова, Г.А. Оценка динамики выноса газового конденсата из Al-Fe-гумусового подзола и его воздействия на комплексы почвенных грибов / Г.А. Евдокимова, М.В. Корнейкова, В.А. Мязин // Почвоведение. – 2013. – № 3. – С. 343-350.

125. Егоров, А.Н. Отходы нефтехимических производств – сырьё для ресурсосберегающих технологий: уч. пособие / А.Н. Егоров, Г.И. Егорова. – Тюмень: ТИУ, 2016. – 190 с.

126. Егорова, А.В. Бактериальная деградация полициклических ароматических углеводородов в городских почвах / А.В. Егорова, В.Н. Мамонтова, И.А. Афти [и др.] // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2014. – № 23. – С. 75-78.

127. Емельянова, Е.К. Микроорганизмы природных биоценозов для биоремедиации почв и водных объектов Сибири, загрязненных нефтепродуктами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23/ Емельянова Елена Константиновна. – Кольцово, 2009. – 24 с.

128. Емельянова, Е.К. Биорекультивация загрязненных нефтью объектов в Тюменской области / Е.К. Емельянова, А.Ю. Алексеев, В.М. Мокеева [и др.] // Вестник НГУ. Сер. Биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8, № 4. – С. 155-161.

129. Емельянова, Е.К. Некоторые аспекты влияния нефтепродуктов на растения / Е.К. Емельянова, А.Ю. Алексеев, А.В. Мокеева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7107>.

130. Емцев, В.Т. Микробиология: Учебник для вузов / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2006. – 445 с

131. Ерофеевская, Л.А. Биоремедиация почв в условиях приарктической зоны Якутии / Л.А. Ерофеевская // Биологическая рекультивация и мониторинг

нарушенных земель: Мат. IX Всеросс. науч. конф. – Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2012. – С. 80-84.

132. Ерофеевская, Л.А. Фиторекультивация нарушенных земель после аварийных разливов нефти на объектах нефтегазового комплекса Якутии / Л.А. Ерофеевская, Ю.С. Глянцева // Биологическая рекультивация и мониторинг нарушенных земель: Мат. IX Всеросс. науч. конф. – Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 2012. – С. 95-99.

133. Ерофеевская, Л.А. Штамм бактерий *Pseudomonas panipatensis* ВКПМ В-10593 – деструктор нефти и нефтепродуктов / Л.А. Ерофеевская // Патент РФ № 2484130. Заявл. 16.04.2012. Оpubл. 10.06.2013. Бюл. № 16.

134. Ерофеевская, Л.А. Способ очистки воды и мерзлотных почв от нефти и нефтепродуктов штаммом бактерий *Pseudomonas panipatensis* ВКПМ В-10593 / Л.А. Ерофеевская // Патент РФ № 2525932. Заявл. 13.05.2013. Оpubл. 20.08.2014а. Бюл. № 23.

135. Ерофеевская, Л.А. Штамм бактерий *Exiguobacterium mexicanum* - деструктор нефти и нефтепродуктов / Л.А. Ерофеевская // Патент РФ № 2523584. Заявл. 27.03.2013. Оpubл. 20.07.2014б. Бюл. № 20.

136. Ерофеевская, Л.А. Псевдомонады как полезная компонента нефтезагрязненных водоемов / Л.А. Ерофеевская // Инновационная наука. – 2015. – № 10. – С. 9-10.

137. Ерофеевская, Л.А. Препарат для очистки почв и воды от нефтезагрязнений / Л.А. Ерофеевская // Патент РФ № 2525932. Заявл. 19.11.2014. Оpubл. 27.10.2016. Бюл. № 30.

138. Ефремов, И.А. Вопросы переработки нефтешламов / И.А. Ефремов, В.В. Фоменко // Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры: Мат. Всеросс. науч.-метод. конф. – Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2014. – С. 910-912.

139. Ефремов, И.В. Технология утилизации выбуренной породы / И.В. Ефремов, А.А. Гамм, Т.А. Гамм // Вестник ОГУ. – 2011. – № 6. – С. 181-184.

140. Жубанова, А.А. Конструирование циано-бактериального консорциума на основе аксеничных культур цианобактерий и гетеротрофных бактерий для биоремедиации нефтезагрязненных почв и водоемов / А.А. Жубанова, А.К. Ернazarова, Г. К. Кайырманова [и др.] // Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 4. – С. 588-595.

141. Журавлева, А.С. Влияние нефтезагрязнения на микробоценоз почв, прилегающих к нефтехранилищу / А.С. Журавлева, Н.М. Лабутова, Е.Е. Андронов // Экологическая генетика. – 2017. – № 4. – С. 60-68.

142. Журавлева, В.В. Использование рекультивационных смесей для утилизации отходов нефтедобычи / В.В. Журавлева // Бюллетень науки и практики. – 2017. – № 6(19). – С. 130-139.

143. Заводская, О.Ф. Фиторемедиация воды, загрязненной различными компонентами, с использованием урути мутовчатой (*Myriophyllum verticillatum*) / О.Ф. Заводская, А.Ю. Копнина // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2013. – № 3. – С. 40-44.

144. Залилова, Л.Р. Угледородокисляющая активность основных типов почв Республики Башкортостан и Краснодарского края, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / Л.Р. Залилова, Н.А. Кеслер, А.С. Григориади // Биотехнология – от науки к практике: Мат. Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014. – С. 33-36.

145. Залялетдинова, К.Ф. Анализ влияния нефти на сезонное распределение инфузорий в светло-серой лесной почве Томского района / Залялетдинова К.Ф., Полякова Ю.А // Популяционная экология растений и животных: Мат. I междунар. молодежной науч. конф. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2015. – С. 65-68.

146. Залялетдинова, Н.А. Влияние нефтезагрязнений на сообщества почвенных инфузорий и нематод в лабораторных условиях / Н.А. Залялетдинова, С.А. Антропова, А.Г. Карташев // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 2. – С. 50-55.

147. Залялетдинова, Н.А. Влияние экологических факторов на сообщества почвенных инфузорий / Н.А. Залялетдинова, А.Г. Карташев. – Томск: Изд-во ТУСУР, 2016. – 140 с.

148. Зейферт, Д.В. Характер зависимости между концентрацией нефти в почве и ее токсичностью / Д.В. Зейферт, Л.М. Гамерова // Экологический вестник России. – 2012. – № 12. – С. 16-19.

149. Земельный кодекс Российской Федерации от 25 октября 2001 г. № 136-ФЗ.

150. Зенова, Г.М. Практикум по биологии почв / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, А.А. Лихачева, Н. А. Манучарова. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 120 с.

151. Зимонина, Н. М. Альгогруппировки техногенных субстратов в районах угле- и нефтедобычи Европейского Северо-Востока (Республика Коми) / Н.М. Зимонина // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Мат. X Всеросс. науч.-практ. конф. Кн. 2. – Киров: ООО «Лобань», 2012. – С. 131-134.

152. Иванов, В.Б. Рекультивация нефтезагрязненных земель: проблемы и перспективы / В.Б. Иванов // Эколого-географические проблемы природопользования нефтегазовых регионов: теория, методы, практика: Тез. докл. IV междунар. науч.-практ. конф. – Нижневартовск: НГГУ, 2010. – С. 87-89.

153. Иванова, А.А. Деградация нефти микробно-растительными ассоциациями / А.А. Иванова, А.А. Ветрова, А.Е. Филонов, А.М. Боронин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 191-197.

154. Иванова, А.Е. Таксономическое разнообразие аэробных органотрофных бактерий из чистых почв Вьетнама и их способность к окислению нефтяных углеводов / А.Е. Иванова, И.А. Борзенков, Е.А. Стрелкова [и др.] // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 2. – С. 254-265.

155. Ившина, И.Б. Биоремедиация нарушенных углеводородами и тяжелыми металлами почв с использованием *Rhodococcus*-биосурфактантов и иммобилизованных родококков / И.Б. Ившина, А.В. Криворучко, М.С. Куюкина [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 8 (100). – С. 65-68.

156. Ильина, Е.Г. Разработка технологии биоочистки буровых и нефтяных отходов: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / Ильина Елена Геннадьевна. – Уфа, 2002. – 22 с.

157. Ильичева, Т.Н. Ассоциация штаммов бактерий-нефтедеструкторов и способ ремедиации нефтезагрязненных объектов / Т.Н. Ильичева, А.В. Мокеева, А.М. Шестопалов [и др.] // Патент РФ № 2509150. Заявл. 24.04.2012. Оpubл. 10.03.2014. Бюл. № 7.

158. Информация о добыче нефти и разработке месторождений нефти и газа в ХМАО-Югре [Электронный ресурс] // Научно-аналитический центр рационального недропользования им. В.И. Шпильмана. – URL: <http://www.crru.ru/dobicha.html>.

159. Исаченко, А.И. Штамм *Arthrobacter rhombi* ARC 16 ВКПМ Ас-1988 – деструктор нефти и нефтепродуктов / А.И. Исаченко, Т.И. Митрофанова, О.О. Шестакова [и др.] // Патент РФ № 2624063. Заявл. 23.03.2016. Оpubл. 30.06.2017. Бюл. № 19.

160. Ихсанов, В.Б. Способ обработки призабойной зоны нефтедобывающей скважины / В.Б. Ихсанов, Н.А. Ихсанова // Патент РФ № 2156353. Заявл. 02.03.2000. Оpubл. 20.09.2000. Бюл. № 26.

161. Казанцева, М.Н. Характеристика нефтяного загрязнения территории Мамонтовского месторождения нефти / М.Н. Казанцева, А.П. Казанцев, С.Н. Гашев // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2001. – № 2. – С. 86-90.

162. Каниева, Н.А. Морфофункциональные изменения карповых рыб под воздействием нефти / Н.А. Каниева, Н.Н. Фёдорова // Вестник АГТУ. – 2014. – № 1. – С. 69-73.

163. Караев, С. Экологические проблемы транспортировки нефти и нефтепродуктов и новые методы очистки водной поверхности от нефти и нефтепродуктов / С. Караев, К. Шихалиев. – Hannover: EAEN, 2014. – 44 стр.

164. Карасева, Э.В. Природное разнообразие углеводородокисляющей микробиоты нефтезагрязненных объектов как основа биоремедиации / Э.В.

Карасева, А.А. Худокормов, С.Г. Карасев [и др.] // I Росс. микробиол. конгресс: Сб. тез. – М.: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 50.

165. Каримуллин, Л.К. Фитореккультивация и физиологическая активность нефтезагрязненной дерново-подзолистой почвы / Л.К. Каримуллин, А.М. Петров, А.А. Вершинин // Российский журнал прикладной экологии. – 2016. – № 1. – С. 14-17.

166. Карпович, Л.Л. Аварийное загрязнение поверхностных вод Российской Федерации / Л.Л. Карпович, В.В. Масленникова // ИнтерКарто/ИнтерГИС: Мат. междунар. конф. – 2013. – Т. 19(1). – С. 69-72.

167. Карташев, А.Г. Влияние нефтезагрязнений на почвенных беспозвоночных животных / А.Г. Карташев, Т.В. Смолина. – Томск: В-Спектр, 2011. – 146 с.

168. Карташев, А.Г. Адаптация животных к хроническим факторам / А.Г. Карташов. – Saarbrucken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. – 260 с.

169. Каталитические, сорбционные, микробиологические и интегрированные методы для защиты и ремедиации окружающей среды / Ред. О.П. Таран, В.Н. Пармон. – Новосибирск: Изд-во ФГУП СО РАН, 2013. – 298 с.

170. Кахраманлы, Ю.Н. Несовместимые полимерные смеси и композиционные материалы на их основе / Ю.Н. Кахраманлы. – Баку: «ЭЛМ», 2013. – 152 с.

171. Кибардин, В.М. Влияние нефтяного загрязнения на дождевых червей разных природно-климатических зон / В.М. Кибардин, Т.И. Артемьева, А.К. Жеребцов // Ученые записки Казанского ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – № 1. – С. 97-105.

172. Киреева, Н.А. Влияние различных способов биоремедиации нефтезагрязненных почв на характеристику комплекса микромицетов / Н.А. Киреева, М.Д. Бакаева, Н.Ф. Галимзянова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – № 1. – С. 63-68.

173. Киреева, Н.А. Влияние биопрепарата Азолен на комплекс микромицетов нефтезагрязненной серой лесной почвы / Н.А. Киреева, Г.Ф.

Рафикова, А.С. Григориади [и др.] // Микология и фитопатология. – 2009. – Т. 43, № 2. – С. 142-150.

174. Киреева, Н.А. Влияние биофунгицида «Елена» на комплексы микромицетов нефтезагрязненных почв различных типов при биоремедиации / Н.А. Киреева, Г.Ф. Рафикова, Н.Ф. Галимзянова [и др.] // Микология и фитопатология. – 2010а. – Т. 44, № 1. – С. 53-62.

175. Киреева, Н.А. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления техногенно-загрязнённых почв / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов, А.С. Григориади [и др.] // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2010б. – Т. 12, № 1(4). – С. 1023-1026.

176. Киреева, Н.А. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, В.В. Водопьянов, А.Р. Амирова // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2011а. – Т. 13, № 5(2). – С. 184-187.

177. Киреева, Н.А. Фиторемедиация как способ очищения почв, загрязнённых тяжёлыми металлами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, Ф.Я. Багаутдинов // Теоретическая и прикладная экология. – 2011б. – № 3. – С. 4-10.

178. Киреева, Н.А. Мониторинг детоксикации и биоремедиации почвы, загрязненной нефтешламом / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, А.Р. Амирова, А.Б. Якупова // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2012. – Т. 14, № 1(9). – С. 2415-2417.

179. Кириевская, Д.В. Зообентос Чукотского моря: современное состояние и тенденции антропогенной нагрузки / Д.В. Кириевская // Принципы экологии. – 2017. – № 2. – С. 15-27.

180. Кириенко, О.А. Влияние загрязнения почвы нефтепродуктами на состав микробного сообщества / О.А. Кириенко, Е.Л. Имранова // Вестник ТОГУ. – 2015. – № 3(38). – С. 79-86.

181. Кирсанов, А.Д. Изменение биологической активности дерново-подзолистой почвы при повторном загрязнении нефтью / А.Д. Кирсанов, Е.Е.



Орлова, А.В. Иванова // Антропогенная трансформация природной среды: Мат. междунар. конф. – Пермь: Пермский гос. ун-т, 2010. – Т. 1, ч. 2. – С. 364-366.

182. Клещенко, С.Е. Анализ существующих технологий рекультивации нефтезагрязненных почв / С.Е. Клещенко, Д.С. Подавальный, Е.Е. Булгаков // Молодёжь и наука: Сб. мат. VIII Всеросс. науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных. – Красноярск: Сибирский федерал. ун-т, 2012. – URL: <http://conf.sfu-kras.ru>.

183. Клишин, А.Ю. Моллюски как индикаторы нефтяного загрязнения / А.Ю. Клишин, Н.А. Каниева, О.В. Баджаева, Н.Н. Фёдорова // Проблемы патологии, иммунитета и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Мат. IV междунар. конф. – Ярославль: Филигрань, 2015. – С. 529-533.

184. Клишин, А.Ю. Нарушения органов и тканей моллюсков рода *Unio* под воздействием нефти / А.Ю. Клишин, Н.А. Каниева, О.В. Баджаева, Н.Н. Фёдорова // Труды ВНИРО. – 2016. – Т. 162. – С. 82-86.

185. Ковалева, Е.И. О возможности применения ферментативной активности при экологическом нормировании и оценке нефтезагрязненных почв / Е.И. Ковалева, М.А. Пукальчик // III Ковалевские молодежные чтения «Почва – ресурс экологической и продовольственной безопасности»: Мат. Всеросс. науч. конф. – Томск: ИД Томского гос. ун-та, 2016. – С. 51-56.

186. Коваленко, В.В. Изоляты актиномицетов деструкторов нефтяных углеводов / В.В. Коваленко, А.И. Фахрутдинов, Т.Д. Ямпольская // Прорывные научные исследования как двигатель науки: Сб. статей междунар. науч.-практ. конф. В 2 ч. Ч. 2. – Уфа: АЭТЕРНА, 2018. – С. 35-39.

187. Ковальчук, Е.А. Биосорбент для ликвидации нефти с поверхности водоемов / Е.А. Ковальчук // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3-6. – С. 1817-1819.

188. Кожанова, Г.А. Способ очистки воды от нефтяного загрязнения / Г.А. Кожанова // Патент РФ № 2031860. Заявл. 20.06.1991. Оpubл. 27.03.1995.

189. Колесников, С.И. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, Н.В. Велиногова [и др.] // Агрехимия. – 2007. – № 12. – С. 44-48.

190. Колесников, С.И. Биодиагностика устойчивости предгорных и горных почв Западного Кавказа к загрязнению нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, Р.К. Татлок, З.Р. Тлехас [и др.] // Доклады РАСХН. – 2013а. – № 1. – С. 30-34.

191. Колесников, С.И. Влияния модельного загрязнения нефтью на биологические свойства почв сухих степей и полупустынь юга России / С.И. Колесников, Н.А. Спивакова, Л.С. Везденеева [и др.] // Аридные экосистемы. – 2013б. – Т. 19, № 2(55). – С. 70-76.

192. Колесников, С.И. Биодиагностика устойчивости бурых лесных почв Западного Кавказа к загрязнению тяжелыми металлами, нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, К.Ш., Казеев Р.К. Татлок [и др.] // Сибирский экологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 493-500.

193. Колобова, Е.С. Утилизация нефтешламов резервуарного типа в изоляционный композит на основе серы для полигонов хранения промышленных и бытовых отходов: дис. ... канд. техн. наук: 03.02.08 // Колобова Екатерина Александровна. – Пенза, 2015. – 138 с.

194. Кольцова, Т.Г. Влияние нефтяного загрязнения на фитотоксичность дерново-карбонатных почв / Т.Г. Кольцова, Л.М. Сунгатуллина, Б.Р. Григорьян, В.Н. Башкиров // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2015. – № 1. – С. 376-382.

195. Кольцова, Т.Г. Оценка фитотоксичности серых лесных почв в условиях нефтяного загрязнения / Т.Г. Кольцова, Б.Р. Григорьян, Л.М. Сунгатуллина [и др.] // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2016. – Т. 19, № 18. – С. 185-191.

196. Компанцева, Е.И. Сравнительное изучение жирнокислотного состава некоторых групп несерных пурпурных бактерий / Е.И. Компанцева, Й.Ф. Имхофф, Б. Тиманн [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 5. – С. 615-626.

197. Коновалов, А.С. Использование активированных цеолитов для обезвреживания экотоксикантов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Коновалов Александр Сергеевич. – Иркутск, 2016. – 116 с.

198. Копцик, Г.Н. Проблемы и перспективы фиторемедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами (обзор литературы) / Г.Н. Копцик // Почвоведение. – 2014. – № 9. – С. 1113-1130.

199. Корнейкова, М.В. Комплексы микроскопических грибов в загрязненных нефтепродуктами агроземах в условиях Кольского Севера / М.В. Корнейкова, Г.А. Евдокимова, Е.В. Лебедева // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, № 3. – С. 249-256.

200. Корнейкова, М.В. Комплексы потенциально патогенных микроскопических грибов в антропогенно загрязненных почвах Кольского Севера / М.В. Корнейкова, Г.А. Евдокимова, Е.В. Лебедева // Микология и фитопатология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 323-328.

201. Корчагина, Л.Е. Функциональные особенности растений верховых болот в условиях нефтяного загрязнения на территории среднего Приобья / Л.Е. Корчагина // Вестник НВГУ. – 2015. – № 1. – URL: <http://vestnik.nvsu.ru/arhiv/42/428.pdf>.

202. Коршунова, А.В. Рибосомные и кодирующие белки гены (*gyrB*, *alkB*, *parE*) бактерий рода *Geobacillus* и их использование в таксономии и экологии: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03. / Коршунова Алена Викторовна. – Москва, 2014. – 124 с.

203. Красноперова, С.А. Морфологический анализ и резистентность растений, рекомендуемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв / С.А. Красноперова // Современные наукоемкие технологии. Региональное приложение. – 2015. – № 4(44). – С. 184-188.

204. Кручинин, Н.А. Фитодетоксикация промышленных стоков с помощью эйхорнии / Н.А. Кручинин, И.И. Глухарев, О.В. Долинина // Строительные материалы, оборудование, технологии XXI-го века. – 2012. – № 5. – С. 33-38.

205. Кудеева, А.Р. Проблема переработки и утилизации нефтяных шламов / А.Р. Кудеева // Система управления экологической безопасностью: Сб. тр. IX заоч. междунар. науч.-практ. конф. – Екатеринбург: УрФУ, 2015. – С. 126-134.

206. Кудоярова, Г.Р. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител / Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов, М.И. Еркеев [и др.] // Физиология растений. – 1986. – Т. 33, № 6. – С. 1221-1227.

207. Кудоярова, Г.Р. Иммуноферментная система для определения цитокининов / Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов, Н.И. Каровайко [и др.] // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, № 1. – С. 193-199.

208. Кузнецов, А.Н. Нефтяные компоненты в устьевой области р. Дон и в Азовском море (результаты многолетних исследований) / А.Н. Кузнецов, Ю.А. Федоров // Водные ресурсы. – 2014. – Т. 41, № 1. – С. 49-59.

209. Кузнецов, Е.Н. Прикладная экобиотехнология: Учеб. пособие в 2 т. Т. 2. / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников [и др.]. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 485 с.

210. Кузнецов, Е.Н. Прикладная экобиотехнология: Учеб. пособие в 2 т. Т. 1. / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников [и др.]. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015а. – 629 с.

211. Кузнецов, Е.Н. Биологические способы рекультивации земель / Е.Н. Кузнецов, А.А. Бурлов, В.В. Слюсаренко, Д.В. Наконечных // Проблемы агропромышленного комплекса стран евразийского экономического союза: Мат. I междунар. науч.-практ. конф. – Саратов: Изд-во «ООО "Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2015б. – С. 167-172.

212. Кузнецова, В.М. Современный взгляд на методы очистки сточных вод на нефтеперерабатывающих заводах и предприятиях / В.М. Кузнецова, А.В.

Овсянкина // Молодой ученый. – 2017. – № 32. – С. 4-9. – URL: <https://moluch.ru/archive/166/45361>.

213. Кузнецова, Т.В. Динамика микробного пула дерново-подзолистых почв при разных начальных уровнях нефтяного загрязнения / Т.В. Кузнецова, А.М. Петров, Р.Э. Хабибуллин // Вестник технологич. ун-та. – 2017. – Т. 20, № 17. – С. 116-120.

214. Кузьмин, Е.В. Скорость закапывания и выживаемость дождевых червей в условиях нефтяного загрязнения различной интенсивности / Е.В. Кузьмин // Актуальные проблемы экологии Ярославской области: Мат. IV науч.-практ. конф. Вып. 4. Т. 1. – Ярославль: Издание ВВО РАЭ, 2008. – С. 297-301.

215. Кулагин, Н.В. Оценка фитотоксичности углеводов разной химической природы при их прямом контакте с семенами и опосредованно через почву / Н.В. Кулагин, Н.С. Архипова, И.П. Бреус // Вестник ТГГПУ. – 2011. – № 4(26). – С. 70-75.

216. Куликова, И.Ю. Биопрепарат для очистки морской воды от нефти / И.Ю. Куликова, И.С. Держинская // Патент РФ № 2404139. Заявл. 30.07.2008. Оpubл. 20.11.2010. Бюл. № 32.

217. Кульков, М.Г. Индивидуальные органические соединения нефти как индикаторы техногенного нефтяного загрязнения водной среды / М.Г. Кульков, В.Ю. Артамонов, Ю.В. Коржов, В.В. Углев // Известия Томского политех. ун-та. – 2010. – Т. 317, № 1. – С. 196-200.

218. Кулюкина, Е.В. Влияние бензина и дизельного топлива на сообщества раковинных амеб / Е.В. Кулюкина, А.Г. Карташев // Вестник НВГУ. – 2017. – № 4. – С. 54-63.

219. Кутузова, И.В. Динамика восстановления биологических свойств чернозема обыкновенного, загрязненного нефтью / И.В. Кутузова, С.И. Колесников, К.Ш. Казеев [и др.] // Научный журнал КубГАУ. – 2014. - № 104(10). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2014/10/pdf/040.pdf>.

220. Лабузова, О.М. Экоаналитический контроль и биоиндикация состояния городской территории / О.М. Лабузова, Т.В. Носкова, М.С. Лысенко, Е.Г. Ильина // *Acta Biologica Sibirica*. – 2016. – № 2(3). – С. 21-24.

221. Лабутова, Н.М. Особенности состояния бактериального и грибного микробоценоза нефтезагрязненной дерново-подзолистой почвы в лабораторных экспериментах / Н.М. Лабутова, А.В. Щерба, А.В. Галова, Е.Е. Орлова // Антропогенная трансформация природной среды: Мат. междунар. конф. – Пермь: Пермский гос. ун-т, 2010. – С. 9-14.

222. Ланкин, А.В. Влияние нафталина на фотохимическую активность фотосистемы 2 / А.В. Ланкин, В.Д. Креславский, А.Ю. Худякова [и др.] // *Биохимия*. – 2014. – Т. 7, № 11. – С. 1493-1504.

223. Ланкин, А.В. Механизмы токсического действия полициклических ароматических углеводородов на фотосинтетический аппарат: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05 / Ланкин Антон Вадимович. – Москва, 2016. – 22 с.

224. Ларин, А.А. Накопление нефтяных углеводородов в бентосе Азовского моря / А.А. Ларин // *Pontus Euxinus – 2007: Тез. V междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем*. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. – С. 49-50.

225. Ларин, А.А. Накопление загрязняющих веществ в моллюсках из юго-восточного района Азовского моря / А.А. Ларин, Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова // *Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе*. – 2009. – № 1. – С. 45-48.

226. Леонов, А.В. Биогидрохимия морской среды и особенности трансформации биогенных веществ и нефтяных углеводородов на юго-восточном шельфе Сахалина / А.В. Леонов, В.М. Пищальник, О.В. Чичерина // *Водные ресурсы*. – 2016. – Т. 43, № 2. – С. 164-187.

227. Леонов, А.В. Углеводороды в Белом море: их поступление и трансформация в морской среде в разных районах / А.В. Леонов, Л.В. Семеняк, О.В. Чичерина // *Водные ресурсы*. – 2017. – Т. 44, № 1. – С. 38-62.

228. Лесной кодекс Российской Федерации от 4 декабря 2006 г. № 200-ФЗ.

229. Литвинова, Т.А. Современные способы обезвреживания и утилизации нефтесодержащих отходов для ликвидации загрязнения окружающей среды / Т.А. Литвинова // Научный журнал КубГАУ. – 2016. – № 123(09). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/62.pdf>.

230. Лифшиц, С.Х. Способ восстановления нефтезагрязненных почв путем внесения микробно-растительных сообществ / С.Х. Лифшиц, Ю.С. Глянцева, О.Н. Чалая [и др.] // Патент РФ № 2535746. Заявл. 01.02.2013; опубл. 20.12.2014. Бюл. № 35.

231. Лобанова, В.Д. Боны – инженерные решения по ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов / В.Д. Лобанова, В.З. Угланова // Теория и практика современной науки. – 2016. – № 5. – URL: [http://modern-j.ru/domains\\_data/files/11/Lobanova%20V.%20\(Osnovnoy%20razdel\).pdf](http://modern-j.ru/domains_data/files/11/Lobanova%20V.%20(Osnovnoy%20razdel).pdf).

232. Логинов, О.Н. Штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* для получения биопрепарата для борьбы с болезнями пшеницы, вызываемыми грибными фитопатогенами, и повышения урожая / О.Н. Логинов, Е.Г. Пугачева, Н.Н. Силищев [и др.] // Патент РФ № 2224791. Заявл. 25.06.2002. Опубл. 27.02.2004. Бюл. № 6.

233. Логинов, О.Н. Штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* для получения биопрепарата для борьбы с корневыми гнилями пшеницы и повышения количества и качества урожая / О.Н. Логинов, Е.Г. Пугачева, Н.Н. Силищев [и др.] // Патент РФ № 2245918. Заявл. 07.07.2003. Опубл. 10.02.2005. Бюл. № 4.

234. Логинов, О.Н. Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова. – М.: Наука, 2009. – 112 с.

235. Логинова, О.О. Перспективы использования штаммов В-3780, В-2838, В-5064 бактерий рода *Acinetobacter* для деградации почвенных нефтяных загрязнений / О.О. Логинова, Т.Т. Данг, Е.В. Белоусова [и др.] // Проблемы региональной экологии. – 2011а. – Вып. 4. – С. 202-208.

236. Логинова, О.О. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области /

О.О. Логинова, Т.Т. Данг, Е.В. Белоусова, М.Ю. Грабович // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2011б. – № 2. – С. 127-133.

237. Логинова, О.О. Поверхностно-активные свойства сурфактантов, полученных из представителей консорциума нефтеструктуров, состоящего из *Acinetobacter radioresistens* штамм ВСБ-567 (В-5064), штамм АКС-1(В-2838) и *A. calcoaceticus* штамм 134 (В-3780) / О.О. Логинова, Т.Т. Данг, Т.Н. Пояркова [и др.] // Экология урбанизированных территорий. – 2011в. – № 4. – С. 41-44.

238. Лозовой, Д.В. Влияние нефтяных углеводородов на байкальских гидробионтов в естественных и лабораторных условиях // Георесурсы. – 2012. – Т. 43, № 1. – С. 53-58.

239. Лукина, Н.Н. Влияние моторного масла на растения кресс-салата (*Lepidium sativum*) / Н.Н. Лукина, Н.С. Тупицина // Вестник ТГУ. Экология. – 2014. – № 12. – С. 79-85.

240. Лысак, В.В. Микробиология: Учеб пособие / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 430 с.

241. Лыонг, Т.М. Бактерии-нефтеструктуры рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов / Т.М. Лыонг, И.А. Нечаева, К.В. Петриков [и др.] // Известия вузов. Приклад. химия и биотехнология. – 2016. – № 16. – С. 50-60.

242. Лыонг, Т.М. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтеструктурами *Rhodococcus* sp. X5 / Т.М. Лыонг, И.А. Нечаева, К.В. Петриков [и др.] // Известия вузов. Приклад. химия и биотехнология. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 72-79.

243. Мадякина, М.В. Идентификация аборигенных микроорганизмов - деструкторов углеводов из нефтезагрязненной почвы / М.В. Мадякина, Е.О. Михайлова, М.В. Шулаев // Вестник Казанского технологич. ун-та. – 2017. – Т. 20, № 2. – С. 153-155.

244. Мазанко, М.С. Изменение числа почвенных микроорганизмов при сочетанном загрязнении нефтью и переменным магнитным полем промышленной



частоты / М.С. Мазанко, С.И. Колесников, Т.В. Денисова // Биотехнология – от науки к практике: Мат-лы Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014. – С. 46-48.

245. Мазлова, Е.А. Шламовые отходы нефтегазовых компаний / Е.А. Мазлова, И.А. Меньшикова // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2010. – № 1. – С. 22-21.

246. Мазлова, Е.А. Обезвреживание нефтезагрязненных почв с применением биологического препарата БИОЛ в группе месторождений Аука EP PETROECUADOR / Е.А. Мазлова, Л.А. Херрера // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2014. – № 2. – С. 15-18.

247. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И.В. Максимов, С.В. Веселова, Т.В. Нужная [и др.] // Физиология растений. – 2015. – Т. 62, № 6. – С.763-775.

248. Максимович, Н.Г. Консорциум штаммов углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* НД К3-1 и *Pseudomonas fluorescens* НД К3-2 в качестве деструктора нефтепродуктов и способ очистки нефтезагрязненных подземных вод / Н.Г. Максимович, В.Т. Хмурчик // Патент РФ № 2312719. Заявл. 15.02.2006. Оpubл. 20.12.2007. Бюл. № 35.

249. Маркарова М.Ю. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязненных земель / М.Ю. Маркарова // Экологические работы на месторождениях Тимано-Печорской нефтегазоносной провинции. Состояние и перспективы: Мат. 3 науч.-практ. конф. – Ухта, 2004. – С. 229-233.

250. Маркарова, М.Ю. Накопление, хранение, переработка нефтешламов в природных условиях Ненецкого автономного округа и республики Коми / М.Ю. Маркарова, С.М. Надежкин, Е.М. Анчугова // Экологический вестник России. – 2016а. – № 9. – С. 20-28.

251. Маркарова, М.Ю. Экологические аспекты переработки нефтешламов и рекультивации нефтешламовых амбаров / М.Ю. Маркарова, С.А. Штейнфельд, С.М. Надежкин [и др.] // Экологический вестник России. – 2016б. – № 10. – С. 13-22.

252. Матвеева, Н.В. Изменения морфологических свойств ржавоземов под влиянием нефтяного загрязнения / Н.В. Матвеева, Д.Н. Липатов // Вестник Московского ун-та. Сер. 17. Почвоведение. – 2015. – № 4. – С. 29-36.

253. Мелентьев, А.И. Штамм бактерий *Bacillus* sp. для получения препарата против грибковых возбудителей болезней злаковых культур / А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, О.Н. Логинов // Патент РФ № 1743019. Заявл. 03.10.1989. Опубл. 30.05.1994.

254. Мелентьев, А.И. Хитиназа *Bacillus* sp. 739: выделение, очистка и характеристика / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 6. – С. 624-628.

255. Мелентьев, А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах / А.И. Мелентьев. – М.: Наука, 2007. – 147 с.

256. Мелехина, Е.Н. Восстановительные сукцессии биоты в торфяной почве с нефтяным загрязнением при различных методах биологической рекультивации / Е.Н. Мелехина, М.Ю. Маркарова, Т.Н. Щемелинина [и др.] // Почвоведение. – 2015. – № 6. – С. 740-750.

257. Мелехина, Е.Н. Определение эффективности методов рекультивации загрязнённых нефтью почв / Е.Н. Мелехина, М.Ю. Маркарова, Е.М. Анчугова [и др.] // Известия Коми науч. центра УрО РАН. – 2016. – № 3(27). – С. 61-70.

258. Методические указания по разработке нормативов предельно допустимых вредных воздействий на подземные водные объекты и предельно допустимых сбросов вредных веществ в подземные водные объекты // Экологический вестник России. – 2000. – № 1. – С. 54-60.

259. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 264 с.

260. Миклашевский, Н.В. Очистка сточных вод по технологии МБР / Н.В. Миклашевский // СОК. Сантехника. Отопление. Кондиционирование. – 2014. – № 12. – URL: <https://www.c-o-k.ru/articles/ochistka-stochnyh-vod-po-tehnologii-mbr>.

261. Мильман, П.Ю. *Paenibacillus ehimensis* IB-739 в биодеградациии нефтяных шламов / П.Ю. Мильман, Е.А. Гильванова // Экология и промышленность России. – 2014. – № 11. – С. 54-56.

262. Минигаимов, Н.С. Новая информация о токсичности нефтесодержащих отходов / Н.С. Минигаимов, Р.Ш. Минигаимов // Уральский экологический вестник. – 2014. – № 2. – С. 31-36.

263. Михайлова, Е.М. Бактерии рода *Geobacillus* из высокотемпературных заводняемых нефтяных пластов и гены биодеградациии п-алканов (*alkB*): дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Михайлова Екатерина Михайловна. – Москва, 2012. – 144 с.

264. Моисеенко, Т. Качество сибирских вод / Т. Моисеенко, А. Шалабодов, С. Гашев // Наука в России. – 2012. – № 4. – С. 13-19.

265. Моргун, В.В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В.В. Моргун, С.Я. Коць, Е.В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – № 3. – С. 187-207.

266. Мордкович, В.Г. Зооэдафон Западно-Сибирской северной тайги. Пространственная экология населения почвообитающих членистоногих естественных и нарушенных местообитаний / В.Г. Мордкович, И.И. Любечанский, О.Г. Березина [и др.]. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 168 с.

267. Морозов, Н.В. Использование иммобилизованных на органическом сорбенте нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Н.В. Морозов, Л.З. Хуснетдинова, О.В. Жукова // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 12. – С. 576-579.

268. Морозов, Н.В. Управляемая биоремедиация нефтезагрязнений в природных водах органическими сорбентами разнообразного происхождения / Н.В. Морозов // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2017. – Т. 20, № 11. – С. 137-141.

269. Морозова, Т.Н. Использование бактериального препарата для ремедиации техногенно загрязненных почв / Т.Н. Морозова, Е.С. Белик, Л.В. Рудакова // Вестник ПНИПУ. Приклад. экология. Урбанистика. – 2015. – № 3. – С. 69-81.

270. Московченко, Д.В. Влияние разливов нефти на загрязнение поверхностных вод Ханты-Мансийского автономного округа – Югры / Д.В. Московченко, А.А. Убайдуллаев // Вестник Тюменского гос. ун-та. Науки о земле. – 2014. – № 4. – С. 5-16.

271. Муратова, А.Ю. Штамм бактерий *Sinorhizobium meliloti* P221, деструктор полициклических ароматических углеводов и стимулятор роста растений для повышения эффективности фиторемедиации / А.Ю. Муратова, С.Н. Голубев, О.В. Турковская // Патент РФ № 2406758. Заявл. 11.03.2009. Оpubл. 20.12.2010а. Бюл. № 35.

272. Муратова, А.Ю. Способ фиторемедиации грунта, загрязненного углеводородами (варианты) / А.Ю. Муратова, А.Д. Бондаренкова, С.Н. Голубев [и др.] // Патент РФ № 2403102. Заявл. 15.05.2009. Оpubл. 10.11.2010б. Бюл. № 31.

273. Муратова, А.Ю. Растительно-микробные ассоциации в условиях углеводородного загрязнения: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Муратова Анна Юрьевна. – Саратов, 2013. – 47 с.

274. Мурзаков, Б.Г. Способ микробиологической очистки объектов от нефтяных загрязнений / Б.Г. Мурзаков, А.И. Заикина, Р.А. Рогачева, Е.В. Семенова // Патент РФ № 2067993. Заявл. 26.01.1993. Оpubл. 1993.

275. Мурыгина В.П. Биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов / В.П. Мурыгина, Н.Е. Войшвилло, С.В. Калюжный // Патент РФ 2174496. Заявл. 31.05.1999.

Опубл. 10.10.2001. Бюл. № 28.

276. Мурыгина, В.П. Способ получения бактериального препарата Родер для очистки почв, почвогрунтов, нефтешламов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов / В.П. Мурыгина, С.В. Калюжный, Н.Е. Войшвилло // Патент РФ № 2295403 Заявл. 13.09.2005. Опубл. 20.03.2007. Бюл. № 8.

277. Мусаева, Ж.К. Идентификация активных штаммов-нефтедеструкторов, выделенных из морской воды в районе порта Баутино / Ж.К. Мусаева, В.В. Соколов, К.М. Мусаев [и др.] // Естественные науки. – 2014. – № 4. – С. 88-95.

278. Мустафин, Р.Ф. Проблемы природообустройства при рекультивации нарушенных земель на примере Республики Башкортостан / Р.Ф. Мустафин, Л.Я. Харисова, А.В. Комиссаров // Природообустройство. – 2017. – № 5. – С. 83-89.

279. Мустафин, С.К. Радиационный контроль и мониторинг процесса нефтегазодобычи как инструменты управления экологическими рисками предприятий / С.К. Мустафин, А.Н. Трифионов // Безопасность жизнедеятельности предприятий в промышленно развитых регионах: Мат. XI междунар. науч.-практ. конф. – Кемерово: КГТУ, 2017. – С. 123-127.

280. Мязин, В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента): дис. ... канд. техн. наук: 03.02.08 / Мязин Владимир Александрович. – Апатиты, 2014. – 159 с.

281. Мязин, В.А. Влияние загрязнения почвы нефтепродуктами на рост *Secale cereale* L. и перспективы ее использования при фиторемедиации / В.А. Мязин, В.В. Редькина // Вестник МГТУ. – 2016а. – Т. 19, № 1/2. – С. 217-221.

282. Мязин, В.В. Оценка возможности применения злаков *Phalaroides arundinacea* и *Festuca pratensis* для восстановления почв, загрязненных нефтепродуктами / В.А. Мязин, В.В. Редькина // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: Мат. VI Всеросс. науч. конф. с междунар. участием. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2016б. – С. 125-129.

283. Мязин, В.В. Оценка возможности применения минерального сорбента для очистки нефтезагрязненных морских вод / В.В. Мязин // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017: Мат. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Севастополь: Изд-во СГУ, 2017. – С. 942-944.

284. Надеин, А.Ф. Способ биологической очистки сточных вод от нефтепродуктов / А.Ф. Надеин // Патент РФ № 2391295. Заявл. 21.07.2008. Оpubл. 10.06.2010. Бюл. № 16.

285. Назаренко, Л.В. Основы биотехнологии: Учебник и практикум для СПО / Л.В. Назаренко, Е.А. Живухина, Е.А. Калашникова [и др.]. – М.: Юрайт, 2018. – 219 с.

286. Назаров, А.В. Влияние нефтяного загрязнения почвы на растения / А.В. Назаров // Вестник Пермского ун-та. – 2007. – № 5. – С. 134-141.

287. Назаров, А.В. Влияние нефтяного загрязнения на бактерии дерново-подзолистой почвы / А.В. Назаров, Л.Н. Ананьина, О.В. Ястребова, Е.Г. Плотникова // Почвоведение. – 2010. – № 12. – С. 1489-1493.

288. Назаров, А.В. Использование микробно-растительных ассоциаций для очистки почвы от нефтяного загрязнения / А.В. Назаров // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1673-1675.

289. Назаров, В.Д. Влияние нефтедобычи на водные объекты / В.Д. Назаров, М.В. Назаров // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2013. – № 2. – С. 5-9.

290. Назина, Т.Н. Микроорганизмы карбонатной нефтяной залежи 302 Ромашкинского месторождения и их биотехнологический потенциал / Т.Н. Назина, Н.К. Павлова, Ю.В. Татаркин [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 191-202.

291. Назина, Т.Н. Идентификация углеводородокисляющих бактерий рода *Dietzia* из нефтяных пластов на основе фенотипических признаков и анализа генов 16S рРНК и *gyrB* / Т.Н. Назина, Е.С. Шумкова, Д.Ш. Соколова [и др.] // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 331-343.

292. Насырова, Э.Ф. Роль микроорганизмов в процессе рекультивации нефтезагрязненных земель / Э.Ф. Насырова, В.И. Сафарова, А.Р. Мухаматдинова // Студенческий: электрон. науч. журнал – 2017. – № 7(7). – URL: <https://sibac.info/journal/student/7/78722>.

293. Неделин, Н.А. Экологический мониторинг почв, загрязненных нефтепродуктами, методом биоиндикации / Н.А. Неделин // Химия и экология-2015: Мат. междунар. науч.-практ. конф. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2015. – С. 331-333.

294. Немировская, И.А. Нефть в океане (загрязнение и природные потоки) / И.А. Немировская. – М.: Научный мир, 2013. – 432 с.

295. Немировская, И.А. Изменчивость концентраций и состава углеводородов во фронтальных зонах Карского моря / И.А. Немировская // Океанология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 497-507.

296. Немировская, И.А. Углеводороды в водах и донных осадках Белого моря / И.А. Немировская, А.П. Трубкин, А.В. Травкина // Проблемы Арктики и Антарктики. – 2015. – № 3(105). – С. 77-89.

297. Немировская, И.А. Трансформация углеводородов в зоне река – море в Арктике / И.А. Немировская, З.Ю. Реджепова, И.П. Трубкин // Проблемы Арктики и Антарктики. – 2016. – № 2(108). – С. 64-78.

298. Нетрусов, А.М. Способ очистки воды от нефти и нефтепродуктов / А.М. Нетрусов, А.И. Семенов, Е.В. Семенова [и др.] / Патент РФ № 2412913. Заявл. 25.12.2008. Оpubл. 27.02.2011. Бюл. № 6.

299. Неустроев, М.П. Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* / М.П. Неустроев, Н.П. Тарабукина, М.М. Неустроев [и др.] // Патент РФ № 2446900. Заявл. 13.07.2010. Оpubл. 10.04.2012. Бюл. № 10.

300. Нефтегазовый комплекс России: итоги 2015 г. [Электронный ресурс] // Национальное рейтинговое агентство. – URL: [www.ra-national.ru](http://www.ra-national.ru).

301. Нечаева, И.А. Биодegradация углеводов нефти психотрофными микроорганизмами-деструкторами: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Нечаева Ксения Александровна. – Пушино, 2009. – 174 с.

302. Нечай, Н.Л. Влияние нефтяного загрязнения на распространение микроскопических грибов в почве / Н.Л. Нечай, Ж.Б. Орозалиева // Immunopathology. Allergology. Infectology. – 2010. – № 1. – С. 70-71.

303. Нишкевич, Ю.А. Полифункциональные биопрепараты для улучшения фиторемедиации нефтезагрязнённых почв на месторождениях варьганского нефтяного блока / Ю.А. Нишкевич, А.Ю. Тропин, К.А. Кыдралиева [и др.] // Проблемы агрохимии и экологии. – 2017. – № 4. – С. 54-59.

304. Новоселова, Е.И. Экологически безопасный метод ускорения трансформации нефти в почвах / Е.И. Новоселова, Н.А. Киреева // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. Т. IV: Экологическая безопасность, инновации и устойчивое развитие. Образование для устойчивого развития. – Казань: Изд-во «Отечество», 2009. – С. 189-191.

305. Новоселова, Е.И. Роль ферментативной активности почв в осуществлении ею трофической функции в условиях нефтяного загрязнения / Е.И. Новоселова, Н.А. Киреева, М.И. Гарипова // Вестник Башкирского ун-та. – 2014. – Т. 19, № 2. – С. 474-479.

306. Овсянникова, В.С. Биодеструкция углеводов высоковязкой нефти почвенными микроорганизмами / В.С. Овсянникова, Д.А. Филатов, Л.К. Алтунина, Л.И. Сваровская // Химия в интересах устойчивого развития. – 2014. – № 22. – С. 489-495.

307. Овчинникова, А.А. Биодegradация фенантрена и взаимодействие *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702 в ризосфере растений / А.А. Овчинникова, А.А. Ветрова, А.Е. Филонов, А.М. Боронин // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 4. – С. 484-490.



308. Овчинникова, А.А. Взаимодействие микроорганизмов-деструкторов в ризосфере и ризоплане растений в присутствии углеводов нефти: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Овчинникова Анастасия Алексеевна. – Пушино, 2011. – 27 с.

309. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулт. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2.

310. Орлова, Е.В. Оценка возможности создания биоремедиационного комплекса растений и микроорганизмов из препарата Олеворин / Е.В. Орлова, А.Ю. Степанова // Агрехимия. – 2012. – № 10. – С. 72-78.

311. Осипова, Е.С. Особенности биохимических механизмов защиты у осоки острой при действии нефтяного загрязнения среды / Е.С. Осипова, Г.А. Петухова // Научное обозрение. Биол. науки. – 2014. – № 1. – URL: <https://science-biology.ru/ru/article/view?id=132>.

312. Отрошко, Д.Н. Стимулирующие взаимодействия нефтеокисляющих родококков с растениями / Д.Н. Отрошко, Ю.С. Журавель, Н.Н. Волченко [и др.] // Биотехнология и общество в XXI веке: Сб. статей. – Барнаул: Изд-во Алтайского ун-та, 2015. – С. 391-394.

313. Отрошко, Д.Н. Способ фиторемедиации почвы, загрязненной углеводородами, и применение штамма микроорганизма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ АС-2017Д в качестве стимулятора роста растений / Д.Н. Отрошко, В.В. Шеремет, Н.Н. Волченко [и др.] // Патент РФ № 2618096. Заявл. 08.06.2016. Оpubл. 02.05.2017. Бюл. № 13.

314. Охрана природы. Почвы: Сб. ГОСТов. – М.: Стандартинформ, 2008.

315. Павлюковец, И. Ю. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на подсолнечном масле / И.Ю. Павлюковец, Л.В. Никитюк, К.А. Береговая, Т.П. Пирог // APRIORI. Сер. Естеств. Техн. науки. – 2014. – № 5. – URL: <http://apriori-journal.ru/seria2/5-2014/Pavlyukovets.pdf>.

316. Пайдулова, Ю.А. Фиторемедиационный потенциал некоторых высших водных растений водоёмов Саратовской области / Ю.А. Пайдулова, О.В. Турковская // Поволжский экологический журнал. – 2015. – № 3. – С. 294-300.

317. Паничева, Л.П. Биохимическая трансформация нефтяных углеводородов в водах Западной Сибири / Л.П. Паничева, Т.И. Моисеенко, Т.И. Кремлева, С.С. Волкова // Вестник Тюменского гос. ун-та. – 2012. – № 12. – С. 38-48.

318. Панов А.В. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества / А.В. Панов, Т.З. Есикова, С.Л. Соколов [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 239-246.

319. Патин С.А. Нефтяные разливы и их воздействия на морскую среду и биоресурсы / С.А. Патин. – М.: Изд-во ВНИРО, 2008. – 508 с.

320. Патин, С.А. Нефть и экология континентального шельфа. В 2-х т. / С.А. Патин // Морской нефтегазовый комплекс: состояние, перспективы, факторы воздействия. Т. 1. – М.: Изд-во ВНИРО, 2017. – 326 с.

321. Пахарькова, Н.В. Оптимизация выбора растений для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях Южной Сибири / Н.В. Пахарькова, С.В. Прудникова, А.С. Гекк [и др.] // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 8. – С. 28-32.

322. Перевалова, О.А. Перестройка видовой структуры почвенных альгоценозов в ответ на локальное загрязнение бензином / О.А. Перевалова, М.И. Смирнова // Молодая нефть: Мат. Всеросс. молодежной науч.-техн. конф. нефтегазовой отрасли. – Красноярск: СФУ, 2016. – С. 287-290.

323. Петриков, К.В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.01.06 / Петриков Кирилл Владимирович. – Москва, 2011. – 23 с.

324. Петриков, К.В. Характеристика продуцентов биоПАВ, выделенных их поверхностных вод и седиментов Балтийского моря / К.В. Петриков, А.А.

Ветрова, А.А. Иванова [и др.] // Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов: Мат. 4-й Пущинской конф. – М.: ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 84-86.

325. Петухова, Г.А. Эколого-генетические последствия воздействия нефтяного загрязнения на организмы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16 / Петухова Галина Александровна. – Тюмень, 2007. – 30 с.

326. Петухова, Г.А. Влияние нефтяного загрязнения среды на растения и животных / Г.А. Петухова, В.В. Дмитриева, В.В. Дuzeва, А.А. Читаева // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. – 2014. – № 6-1. – С. 114-117.

327. Петухова, Г.А. Влияние техногенного загрязнения на растительный покров в окрестностях полигона Приобский / Г.А. Петухова // Вестник ТГУ. Экология и природопользование. – 2016. – Т. 2, № 1. – С. 141-148.

328. Петухова, Г.А. Ответные реакции модельных тест-объектов на нефтяное загрязнение среды / Г.А. Петухова, В.В. Дмитриева, В.В. Забродина [и др.] // Вестник ТГУ. Экология и природопользование. – 2017. – Т. 3, № 1. – С. 98-107.

329. Пирог, Т.П. Деструкция нефтяных загрязнений в присутствии поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB АС-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 / Т.П. Пирог, А.П. Софилканич, Н.А. Гриценко // Biotechnology. Theory and Practice / Биотехнология. Теория и практика. – 2015. – № 2. – С. 42-50.

330. Пирог, Т.П. Синтез фитогормонов бактериями *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, *Rhodococcus erythropolis* Имв Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 – продуцентами поверхностно-активных веществ / Т.П. Пирог, Н.О. Леонова, Т.А. Шевчук [и др.] // Вестник НАН Белоруссии. Биол. науки. – 2016а. – № 1. – С. 90-95.

331. Пирог, Т.П. Влияние микробных ПАВ *Nocardia vaccini* IMB В-7405 на деструкцию нефти в воде / Т.П. Пирог, Е.В. Панасюк, Н.А. Антонюк // Химия и технология воды. – 2016б. – Т. 38, № 5 (253). – С. 542-552.

332. Плешакова, Е.В. Особенности деградации углеводов бактериями, выделенными из буровых шламов / Е.В. Плешакова, А.Ю. Беляков, Д.В. Деев // Поволжский экологический журнал. – 2017. – № 2. – С. 170-182.

333. ПНД Ф 14.1:2.116-97 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных и сточных вод методом колоночной хроматографии с гравиметрическим окончанием. – Электрон. портал «Профессиональные справочные системы ТЕХЭКСПЕРТ». – URL: <http://www.cntd.ru>.

334. ПНД Ф 16.1.41–04 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. – 2004. – Портал нормативных документов. – URL: [http:// www.OpenGost.ru](http://www.OpenGost.ru).

335. Подольский, В.П. Применение штаммов бактерий рода *Acinetobacter*: *A. calcoaceticus* 134 (В-3780), АСКС-1 (В-2838) и *Acinetobacter* sp. (В-5064) для биодеструкции нефти и нефтепродуктов в почве / В.П. Подольский, А.А. Быкова, М.Ю. Шевченко, Е.В. Гриднева // Вестник Воронежского гос. архитектурно-строительного ун-та. Сер. Физ.-хим. проблемы и высокие технологии строительного материаловедения. – 2014. – № 8. – С. 173-177.

336. Полонская, Д.Е. Влияние уровня нефтезагрязнения на состав почвенных микроорганизмов / Д.Е. Полонская, С.В. Хижняк, В.И. Полонский, Т.С. Бородулина // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 7. – С. 47-52.

337. Полонский, В.И. Причины разнонаправленного действия нефтезагрязненной почвы на прорастание семян / В.И. Полонский, Д.Е. Полонская // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тез. докладов междунар. конф. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – С. 168.

338. Полякова, Ю.А. Влияние нефтезагрязнения на сообщества раковинных амёб в светло-серой лесной почве Томского района / Ю.А. Полякова, К.Ф. Залялетдинова, Т.В. Денисова // Научно-исследовательские публикации. – 2015. – Т. 1, № 3 (23). – С. 27-30.

339. Попова, Т.В. Анализ воздействия нефтесодержащих сточных вод на окружающую среду / Т.В. Попова, М.В. Двадненко, М.Р. Бруйка // Научные труды КубГАУ. – 2017. – № 7. – URL: <http://ntk.kubstu.ru/file/1919>.

340. Порхунцова, О.А. Микробно-растительная ассоциация как эффективный фиторемедиант загрязненных нефтепродуктами почв / О.А. Порхунцова, В.И. Бушуева, А.А. Федоренчик, З.М. Алещенкова // Вестник Белорусской гос. сельскохозяйственной акад. – 2015. – № 2. – С. 87-91.

341. Последствия разливов нефти для морской экологии. – IPIECA-IOPG, 2015. – URL: [http://www.oilspillresponseproject.org/wp-content/uploads/2017/02/Marine-ecology\\_RU.pdf](http://www.oilspillresponseproject.org/wp-content/uploads/2017/02/Marine-ecology_RU.pdf).

342. Поспелов, Д.И. Переработка активного ила водоочистных сооружений / Д.И. Поспелов // Научный альманах. Биол. науки. – 2017. – № 6-1(32). – DOI: 10.17117/na.2017.06.01.422.

343. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 августа 2000 г. № 613 «О неотложных мерах по предупреждению и ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов».

344. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2002 г. № 240 «О порядке организации мероприятий по предупреждению и ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов на территории Российской Федерации».

345. Постановление Правительства Российской Федерации от 14 ноября 2014 г. № 1189 «Об организации предупреждения и ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов на континентальном шельфе Российской Федерации, во внутренних морских водах, в территориальном море и прилегающей зоне Российской Федерации».

346. Привалова, Н.М. Исследование методов очистки вод от загрязнений нефтью и нефтепродуктами / Н.М. Привалова, М.В., Двадненко, А.А. [и др.] // Научный журнал КубГАУ. – 2015. – № 113(09). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2015/09/pdf/25.pdf>.

347. Привалова, Н.М. Исследование сорбционных свойств фильтрующих материалов / Н.М. Привалова, М.В. Двадненко, А.А. Некрасова, Д.М. Привалов // Научный журнал КубГАУ. – 2017. – № 126(02). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2017/02/pdf/20.pdf>.

348. Присяжная, Н.В. Использование метода МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии для дифференциации близких видов филогенетической группы “*Arthrobacter crystallopoietes*” / Н.В. Присяжная, Е.Г. Плотникова, О.В. Буева [и др.] // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 6. – С. 754-759.

349. Присяжников, Е.В. Влияние загрязнения нефтью на почвы Юго-Запада Нечерноземной зоны / Е.В. Присяжников, Е.В. Смольский, А.С. Гуца // Агрохимия. – 2012. – № 7. – С. 74-86.

350. Пряничникова, В.В. Электрохимическая очистка нефтезагрязненных грунтов / В.В. Пряничникова, Н.С. Шулаев, Н.А. Быковский, Р.Р. Кадыров // Высокие технологии в современной науке и технике: Сб. тр. V междунар. науч.-техн. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов. – Томск: STT, 2016. – С. 349-350.

351. Пряничникова, В.В. Электрохимический способ ликвидации последствий нефтяного загрязнения грунтов: дис. ... канд. техн. наук: 03.02.08 / Пряничникова Валерия Валерьевна. – Уфа, 2018. – 162 с.

352. Пуговкин, Д.В. Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 25.00.28 / Пуговкин Дмитрий Витальевич. – Мурманск, 2017. – 27 с.

353. Пукемо, М.М. Биореактор для очистки сточных вод / М.М. Пукемо // Патент РФ № 2620974. Заявл. 15.11.2016. Оpubл. 30.05.2017. Бюл. № 16.

354. Пунтус, И.Ф. Роль минеральных фосфорных соединений в процессе биodeградации нафталина бактериями *Pseudomonas putida* / И.Ф. Пунтус, Л.П. Рязанова, А.Н. Звонарев [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 198-205.

355. Путырская, Е.А. Анализ методов утилизации активного ила при очистке сточных вод / Е.А. Путырская, Г.В. Бельская // 72-ая студенческая науч.-техн. конф.: Сб. мат. – Минск, 2016. – С. 69-72.

356. Пыстина, Н.Б. Применение современных биотехнологий при решении актуальных экологических задач нефтегазового комплекса / Н.Б. Пыстина, Е.Л. Листов, И.В. Балакирев [и др.] // Вести газовой науки: Науч.-техн. сб. – 2013. – № 2. – С 113-117.

357. Пыстина, Н.Б. Биосорбент для очистки воды от углеводородных загрязнений и способ его получения Н.Б. Пыстина, Е.Л. Листов, Н.С. Хохлачев, В.Н. Лужков // Патент РФ № 2656146. Заявл. 20.10.2017. Оpubл. 31.05.2018. Бюл. № 16.

358. Раимбеков, К.Т. Биологическая очистка сточных вод животноводческих комплексов с использованием высших водных растений / К.Т. Раимбеков // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журнал. – 2017. – № 3(33). – URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/4456>.

359. Рафикова, Г.Ф. Влияние нефтяного загрязнения и биоремедиации на накопление потенциально патогенных и фитотоксичных микромицетов / Г. Ф. Рафикова // Immunopathology. Allergology. Infectology. – 2010. – № 1. – С. 73-74.

360. Редкозубов, С.В. Перспективы применения аборигенной микрофлоры Жирновского шламохранилища для утилизации нефтешламов / С.В. Редкозубов // Вестник Волгоградского гос. ун-та. Сер. 3. Экономика. Экология. – 2010. – № 2(17). – С. 221-228.

361. Редкозубов, С.В. Метаболическая активность и безопасность микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязнённых объектов окружающей среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Редкозубов Сергей Владимирович. – Ставрополь, 2011. – 20 с.

362. Рогозина, Е.А. Сравнительная характеристика отечественных

биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами / Е.А. Рогозина, О.А. Андреева, С.И. Жаркова [и др.] // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2010. – Т. 5, № 3. – URL: [http://www.ngtp.ru/rub/7/37\\_2010.pdf](http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf).

363. Рогозина, Е.А. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* RCAM 01139 для разложения нефти и дизельного топлива / Е.А. Рогозина, Н.А. Орлова, Р.М. Свечина [и др.] // Патент РФ № 2489482. Заявл. 14.08.2012. Оpubл. 10.08.2013а. Бюл. № 22.

364. Рогозина, Е.А. Штамм *Pseudomonas citronellolis*, используемый для разложения нефти и дизельного топлива / Е.А. Рогозина, Н.А. Орлова, Р.М. Свечина [и др.] // Патент РФ № 2489484. Заявл. 14.08.2012. Оpubл. 10.08.2013б. Бюл. № 22.

365. Рогозина, Е.А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов Нафтокс 12-р и Нафтокс 48-У / Е.А. Рогозина, И.Ф. Тимергазина, П.А. Моргунов // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2014. – Т. 9, № 2. – URL: [http://www.ngtp.ru/rub/7/19\\_2014.pdf](http://www.ngtp.ru/rub/7/19_2014.pdf).

366. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: практ. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. – М: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.

367. Русанов, А. М. Динамика биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении / А.М. Русанов, Т.С. Шорина // Вестник ОГУ. – 2009. – № 10. – С. 600-603.

368. Рыбка, К.Ю. Очистка сточных вод нефтехимической промышленности с помощью фито-очистных систем / К.Ю. Рыбка // Химия и экология – 2015: Мат. междунар. науч.-практ. конф. – Уфа: Изд-во УГНТУ, 2015. – С. 51-53.

369. Рысбаева, Г.А. Роль спонтанной и внесенной микрофлоры в биодegradации углеводов нефти в нефтезагрязненных почвах ЮКО: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Рысбаева Галия Алтынбековна. – Алматы, 2007. – 24 с.



370. Рябцева, Н.Д. Способность культуры *Candida* sp. к биодegradации нефтепродуктов / Н.Д. Рябцева, В.С. Никитина, А.А. Кадиров, М.И. Абдуллин // Вестник Башкирского ун-та. – 2015. – № 4. – С. 1227-1230.

371. Рябцева, Н.Д. Изучение каталитических процессов микробного окисления нефтяных углеводородов / Н.Д. Рябцева, В.С. Никитина, М.И. Абдуллин [и др.] // Вестник Башкирского ун-та. – 2016. – № 2. – С. 308-313.

372. Салтыкова, А.Л. Препарат для очистки почв и воды от нефти и нефтепродуктов / А.Л. Салтыкова, А.А. Вит, Л.А. Ерофеевская // Патент РФ № 2617953. Заявл. 31.12.2015. Оpubл. 28.04.2017. Бюл. № 13.

373. Салтынбаев, А.Д. Поиск и подбор консорциума нефтеокисляющих микроорганизмов / А.Д. Салтынбаев, А.А. Шмакова, Я.А. Малова, А.Н. Момбай // Студенческий научный форум – 2017: Мат. IX междунар. студенческой науч. конф. – 2017. – URL: <https://www.scienceforum.ru/2017/pdf/40563.pdf>.

374. Самсонов, Р.О. Консорциум штаммов микроорганизмов для очистки окружающей среды от углеводородов / Р.О. Самсонов, Г.С. Аكوпова, С.И. Козлов, Е.Л. Листов // Патент РФ № 2384616. Заявл. 12.03.2008. Оpubл. 20.03.2010. Бюл. № 8.

375. СанПиН 2.1.5.980-00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. – М.: Изд-во стандартов, 2000.

376. Сваровская, Л.И. Биодеструкция углеводородов нефти почвенной микрофлорой, активированной фотолюминесцентными пленками / Л.И. Сваровская, Л.К. Алтунина, Д.А. Филатов // Нефтехимия. – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 240-245.

377. Сваровская, Л.И. Биопрепарат для очистки воды от нефти и нефтепродуктов / Л.И. Сваровская, Л.К. Алтунина // Вода: химия и экология. – 2011. – № 8. – С. 55-60.

378. Семенов, А.М. Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование / А.М.

Семенов, В.Н. Федоренко, Е.В. Семенова // Биосфера. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 60-76.

379. Серебренникова, М.К. Биодegradация нефтяных углеводородов иммобилизованными родококками в колоночном биореакторе: дис. ... канд. биол. наук: 03.03.03/ Серебренникова Марина Константиновна. – Пермь, 2014. – 159 с.

380. Серебренникова, М.К. Биологические способы очистки нефтезагрязненных сточных вод (обзор) / М.К. Серебренникова, М.С. Тудвасева, М.С. Куюкина // Вестник Пермского ун-та. – 2015. – № 1. – С. 15-30.

381. Середина, В.П. Особенности влияния нефтяного загрязнения на почвы средней тайги Западной Сибири / В.П. Середина, Е.В. Колесникова, В.А. Кондыков [и др.] // Нефтяное хозяйство. – 2017. – № 5. – С. 108-112.

382. Синдирева, А.В. Использование газонных трав для фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами / А.В. Синдирева, С.Б. Ловинецкая, В.В. Гейс // Вестник ОмГАУ. – 2016. – № 1(21). – С. 92-97.

383. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова. – Киев: Наукова думка, 1990. – 264 с.

384. Смирнова, Т.С. Влияние нефтегазовой промышленности на состояние окружающей среды и здоровье человека / Т.С. Смирнова, О.В. Кузнецова // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2014. – № 9. – С. 39-43.

385. Смольникова, В.В. Особенности биоремедиации нефтезагрязненных почв / В.В. Смольникова, Д.М. Дементьева, М.С. Дементьев // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 1(5). – С. 1219-1221.

386. Соколов. Л.И. Переработка и утилизация нефтесодержащих отходов / Л.И. Соколов. – М.: Инфра-Инженерия, 2017. – 160 с.

387. Соколова, Д.Ш. Образование поверхностно-активных веществ аэробными органотрофными бактериями нефтяных пластов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Соколова Дияна Шамилевна. – Москва, 2013. – 134 с.

388. Соловьянов, А.А. Переработка нефтешламов с использованием химических и биологических методов / А.А. Соловьянов // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2012. – № 5. – С. 30-39.

389. Сопрунова, О.Б. Средство для деструкции нефтяных углеводородов в среде, содержащей NaCl до 24,0% / О.Б. Сопрунова, А.Р. Гальперина, М.А. Ключаева // Патент РФ № 2422505. Заявл. 02.03.2009. Опубл. 10.09.2010. Бюл. № 25.

390. Сребняк, Е.А. Разработка технологии получения нового биопрепарата для восстановления нефтезагрязнённых акваторий на примере Балтийского моря: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.16, 03.00.23 / Сребняк Екатерина Анатольевна. – Москва, 2008. – 24 с.

391. Степанов, С.В. Очистка сточных вод Сызранского НПЗ в мембранном биореакторе / С.В. Степанов, А.К. Стрелков, Ю.Е. Сташок [и др.] // Водоснабжение и санитарная техника. – 2012. – № 3. – С. 66-72.

392. Степанов, С.В. Исследование процессов одноступенчатой биологической очистки сточных вод нефтеперерабатывающих заводов / С.В. Степанов, А.К. Стрелков, Л.А. Блинкова [и др.] // Водоснабжение и санитарная техника. – 2013. – № 10. – С. 38-44.

393. Степанов, С.В. Биологическая очистка и доочистка сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических предприятий: автореф. дис. ... д-ра техн. наук: 05.23.04 / Степанов Сергей Валериевич. – Самара, 2014. – 48 с.

394. Степанова, А.Ю. Получение трансгенных растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) для повышения эффективности фиторемедиации нефтезагрязнённых почв / А.Ю. Степанова, Е.В. Орлова, Д.В. Терешонок, Ю.И. Долгих // Экологическая генетика. – 2015. – Т. XIII, № 2. – С. 127-135.

395. Степанова, А.Ю. Влияние нефти как неблагоприятного фактора на растения и фиторемедиация нефтезагрязнённых территорий / А.Ю. Степанова, А.И. Соловьева, Е.А. Гладков // Вестник биотехнологии и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 51-57.

396. Струкова, Е.Г. Определение микробиологического статуса и диагностика инфекций организма человека с использованием метода хромато-масс-спектрометрии / Е.Г. Струкова, А.А. Ефремов, А.А. Гонтова [и др.] // Журнал Сибирского федерал. ун-та. – 2009. – Т. 2, № 4. – С. 351-358.

397. Струппуль, Н.Э. Исследование нефтеокисляющей способности морских микроорганизмов *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas elyakovii* и *Oceanisphaera litoralis* / Н.Э. Струппуль, Е.А. Сигида, Н.Н. Трофименко [и др.] // Нефтегазовое дело. – 2009. – № 2. – URL: [http://ogbus.ru/authors/Struppul/Struppul\\_1.pdf](http://ogbus.ru/authors/Struppul/Struppul_1.pdf).

398. Стяжкин К.К. Экобиопрепарат для очистки воды от нефтепродуктов / К.К. Стяжкин, А.Н. Забокрицкий, А.З. Рогожин // Патент РФ № 2393215, Заявл. 27.11.2007. Оpubл. 27.06.2010. Бюл. № 18.

399. Сулейманов, Р.Р. Ферментативная активность и агрохимические свойства лугово-аллювиальной почвы в условиях нефтяного загрязнения / Р.Р. Сулейманов, Т.А. Абдрахманов, З.А. Жаббаров, Л.Т. Турсунов // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 294-298.

400. Сулима, В.О. Использование азотфиксирующих микроорганизмов рода *Azotobacter* в процессах биоремедиации нефтезагрязненных почв / В.О. Сулима, А.А. Успабаева, А.У. Исаева // В мире научных открытий. – 2010. – № 4(17). – С. 22-23.

401. Сулименко, Л.П. Практические аспекты использования сорбентов для санации локальных нефтезагрязненных северных территорий / Л.П. Сулименко, Л.Б. Кошкина, В.А. Маслобоев // Вестник Кольского науч. центра РАН. – 2017. – № 1. – С. 116-123.

402. Суфиянов, Р.Ш. Обезвреживание нефтесодержащих отходов / Р.Ш. Суфиянов // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2010. – № 5. – С. 36-40.

403. Сухонослова А.Н. Очистка почвы от нефтяного загрязнения / А.Н. Сухонослова, В.А. Бурлака, Д.Е. Быков [и др.] // Экология и промышленность России. – 2009. – № 10. – С. 18-20.

404. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 296 с.

405. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.

406. Терещенко, Н.Н. Биологическая азотфиксация как фактор ускорения микробной деструкции нефтяных углеводов в почве и способы ее стимулирования / Н.Н. Терещенко, С.В. Лушников, Е.В. Пышьева // Биотехнология. – 2004. – № 5. – С. 69-79.

407. Технический информационный документ «Последствия загрязнения нефтью для окружающей среды». – ИТОПФ, 2011. – № 13. – URL: [http://www.itopf.com/uploads/translated/TIP\\_13\\_2011\\_RU\\_Effects\\_of\\_oil\\_pollution\\_in\\_the\\_environment.PDF](http://www.itopf.com/uploads/translated/TIP_13_2011_RU_Effects_of_oil_pollution_in_the_environment.PDF).

408. Тимакова, Д.Н. Использование активного ила в качестве биофлокулянта / Д.Н. Тимакова, Б.С. Ксенофонтов // Universum: химия и биология. – 2016. – № 10 (28). – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-aktivnogo-ila-v-kachestve-bioflokulyanta>.

409. Томский, И.С. Оценка качества рекультивации нефтезагрязненных земель по показателям ферментативной активности почв / И.С. Томский, Л.А. Ерофеевская, Л.А. Томская // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23167>.

410. Третьякова, М.С. Способность бактерий-нефтедеструкторов снижать токсическое действие нефти на растение / М.С. Третьякова, Л.А. Беловежец, Ю.А. Маркова, Л.Е. Макарова // Агрехимия. – 2017. – № 12. – С. 46-51.

411. Третьякова, М.С. Перспективы использования эндо- и ризосферных микроорганизмов для восстановления загрязненных нефтью почв: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Третьякова Марина Сергеевна. – Иркутск, 2018. – 22 с.

412. Трефилова, М.В. Отработка способа получения биопрепарата на основе растительно-микробной ассоциации для очистки почв от нефтепродуктов / М.В. Трефилова, А.Г. Лазыкин // Advanced science. – 2017. – № 4. – URL:

[http://advanced-science.ru/assets/mgr/docs/4\(2017\)/Биологические/trefilova-lazykin.pdf](http://advanced-science.ru/assets/mgr/docs/4(2017)/Биологические/trefilova-lazykin.pdf).

413. Трофимов, Н.А. Биоремедиация загрязненных экосистем / Н.А. Трофимов // Наука за рубежом. – 2013. – № 25. – URL: [www.issras.ru/global\\_science\\_review](http://www.issras.ru/global_science_review).

414. Троц, Н.М. Рекультивация нефтешламового амбара / Н.М. Троц, Г.И. Чернякова, О.В. Горшкова // Проблемы рекультивации отходов быта, промышленного и сельскохозяйственного производства: Сб. науч. тр. V междунар. науч. экол. конф. – Краснодар: КубГАУ, 2017. – С. 624-626.

415. Трунов, П.В. Особенности процесса очистки сточных вод в погружных мембранных биореакторах / П.В. Трунов // Коммунальное хозяйство городов. – 2010. – № 93. – С. 133-137.

416. Турова, Т.П. Применение сходства нуклеотидных последовательностей генов *gyrB* и *parE* для дифференциации видов рода *Geobacillus* / Т.П. Турова, А.В. Коршунова, Е.М. Михайлова [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 376-389.

417. Ульрих, Д.В. Фиторемедиация загрязненных почв и техногенных грунтов хвостохранилищ на территории меднорудных предприятий Южного Урала / Д.В. Ульрих, С.С. Тимофеева // Горный информ.-аналит. бюл. – 2016. – № 3. – С. 341-349.

418. Умаров, М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. – 136 с.

419. Умаров, М.М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.М. Умаров, А.В. Кураков, А.Л. Степанов. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.

420. Умербаева, Р.И. Содержание углеводов в органах и тканях рыб, обитающих на лицензионном участке ООО «Каспийская нефтяная компания» / Р.И. Умербаева, Н.В. Попова // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2014. – № 12. – С. 55-58.

421. Уразбахтина, А.Б. Альгомониторинг водно-наземного экотона в условиях нефтяного загрязнения / А.Б. Уразбахтина, М.Ю. Шарипова // Биологический мониторинг природно- техногенных систем: Сб. мат. Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Ч. 2. – Киров: ООО «Лобань», 2011. – С. 179-181.

422. Усанов, Н.Г. Синтез циклодекстринглюканотрансфераз микроорганизмами, утилизирующими циклодекстрины в качестве единственного источника углерода / Н.Г. Усанов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Доклады АН СССР. – 1990. – Т. 310, № 6. – С. 1489-1492.

423. Усманов, И.Ю. Распространение влияния нефтяного шлама / И.Ю. Усманов, Е.С. Овечкина, Р.И. Шаяхметова // Вестник НВГУ. Сер. Мат. и естеств. науки. – 2015. – № 3. – С. 84-94.

424. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

425. Федоренко, В.Н. Свойства естественных углеводородокисляющих микробных сообществ для утилизации нефтяных загрязнений в Северных регионах / В.Н. Федоренко, И.Н. Серезкин, Я.А. Ламова [и др.] // Биотехнология. – 2015. – № 6. – С. 72-78.

426. Федоренко, В.Н. Активность штаммов *Cobetia marina* S2 и *Nocardia coeliaca* S1 в отношении углеводов нефти и прогнозирование их выживаемости после лиофилизации / В.Н. Федоренко, М.К. Князюк, А.И. Нетрусов, А.И. Шестаков // Биотехнология. – 2016. – № 4. – С. 9-20.

427. Федоренко, В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Федоренко Виктория Николаевна. – Москва, 2016. – 28 с.

428. Федоренчик, А.А. Создание микробно-растительной ассоциации для фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью и продуктами ее переработки / А.А. Федоренчик, НВ. Мельникова, З.М. Алещенкова, А.В. Щур // Биотехнология и

качество жизни: Мат. междунар. науч.-практ. конф. – М.: Экспо-биохим-технологии, 2014. – С. 426-427.

429. Федорова, П.Ю. Сравнение кинетических свойств различных циклодекстринглюканотрансфераз / П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Н.Г. Усанов // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2011. – № 5. – С. 203-206.

430. Федорова, П.Ю. Очистка и свойства циклодекстринглюканотрансферазы из бактериального штамма *Paenibacillus ehimensis* ВКМ В-2680D (IB-739) / П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Г.Э. Актуганов, Н.Г. Усанов // Биотехнология. – 2012. – № 4. – С. 31-38.

431. Федорова, Ю.А. Подбор фитомелиорантов для рекультивации нефтесоленых почв / Ю.А. Федорова, Н.Н. Чиглинцева, Г.Г. Ягафарова [и др.] // Вестник ПНИПУ. Приклад. экология. Урбанистика. – 2015. – № 3. – С. 60-68.

432. Федотова, А.С. Технологические аспекты очистки и рекультивации почв агробиоценозов при нефтерозливах / А.С. Федотова, В.М. Мелкозеров // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 1. – С. 85-91.

433. Феоктистова, Н.В. Ризосферные бактерии / Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, Г.Ф. Хадиева, М.Р. Шарипова // Ученые записки Казанского ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 2. – С. 207-224.

434. Филатов, Д.А. Микробное окисление высоковязкой нефти и ее высокомолекулярных гетероорганических соединений в почве / Д.А. Филатов, Е.Б. Кривцов, Н.Н. Свириденко [и др.] // Биотехнология. – 2014. – № 4. – С. 74-82.

435. Филатов, Д.А. Загрязнения окружающей среды нефтяными углеводородами: проблемы и решения / Д.А. Филатов, В.С. Овсянникова // Экологический вестник России. – 2017. – № 6. – С. 12-17.

436. Филонов, А.Е. Биодegradация нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами и её адсорбция растительным сорбентом в жидкой минеральной среде / А.Е. Филонов, И.А. Нечаева, А.Б. Гафаров [и др.] // Биотехнология. – 2007а. – № 2. – С. 31-39.



437. Филонов, А.Е. Ассоциация штаммов бактерий, продуцирующих биоэмульгаторы, для деградации нефти и нефтепродуктов в почвах, пресной и морской воде / А.Е. Филонов, И.А. Кошелева, А.Н. Шкидченко [и др.] // Патент РФ № 2312891. Заявл. 10.03.2006. Оpubл. 20.12.2007б. Бюл. № 35.

438. Филонов, А.Е. Штамм бактерий *Pseudomonas putida*, продуцирующий поверхностно-активные вещества, для деградации полициклических ароматических углеводородов и углеводородов нефти / А.Е. Филонов, И.А. Кошелева, И.А. Пунтус [и др.] // Патент РФ № 2344170. Заявл. 10.03.2006. Оpubл. 20.01.2009. Бюл. № 2.

439. Филонов, А.Е. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения / А.Е. Филонов, И.А. Кошелева, В.А. Самойленко [и др.] // Патент РФ № 2378060. Заявл. 05.07.2007. Оpubл. 10.01.2010а. Бюл. № 1.

440. Филонов, А.Е. Горизонтальный перенос катаболических плазмид и биodeградация нафталина в открытой почве / А.Е. Филонов, Л.И. Ахметов, И.Ф. Пунтус [и др.] // Микробиология. – 2010б. – Т. 79, № 2. – С. 206-212.

441. Филонов, А.Е. Микробные биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.01.06 / Филонов Андрей Евгеньевич. – Пушино, 2016. – 46 с.

442. Филонов, А.Е. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий приаральского региона с использованием новых биопрепаратов / А.Е. Филонов, И.Ф. Пунтус, Л.И. Ахметов [и др.] // Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов: Мат. 4-й Пушинской конф. – М.: ИД «Вода: химия и экология», 2017. – С. 109-111.

443. ФККО. Федеральный квалификационный каталог отходов. – 2017. – URL: <https://classinform.ru/fkko-2017.html>.

444. Фокина, Н.В. Исследование очистки почвы от нефти с использованием сорбентов различной модификации в условиях лабораторного опыта / Н.В. Фокина, В.А. Мязин, Т.Г. Губкина // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: Мат. V Всеросс. науч. конф. с междунар. участием. – Апатиты: КНЦ РАН, 2014. – С. 89-93.

445. Фомина, Н.В. Ферментативная активность нефтезагрязненного почвогрунта после применения биоактивного сорбента / Н.В. Фомина // Эпоха науки. – 2016. – № 7. – С. 78-96.

446. Хазиев, Ф.Х. Экология почв Башкортостана / Ф.Х. Хазиев. – Уфа: АН РБ, Гилем, 2012. – 312 с.

447. Халилова, Д.И. Экономическая эффективность методов ликвидации нефтяных загрязнений почвы / Д.И. Халилова, Е.Н. Елизарьева // Форум молодых ученых. – 2016. – № 4 (4). – С. 996-999.

448. Халилова, Д.И. Анализ методов очистки нефтезагрязненных почв при авариях на объектах нефтегазовой отрасли и транспорте / Д.И. Халилова, Д.М. Юнусова // Бюллетень результатов научных исследований. – 2017. – № 1-2. – С. 23-31.

449. Хасенова, Э.Ж. Изучение эффективности применения биопрепарата на основе нефтеокисляющих психротрофных микроорганизмов для биоремедиации почв в полевых условиях / Э.Ж. Хасенова, Н.Б. Молдагулова, К.Т. Бердимуратова [и др.] // Международный журнал приклад. и фундам. исследований. – 2017. – № 10-2. – С. 279-282.

450. Херрера, Л.А. Применение технологии биоремедиации на основе биопрепарата БИОЛ для рекультивации нефтезагрязненных почв и нефтешламов с целью снижения рисков загрязнения окружающей среды в бассейне реки Амазонки / Л.А. Херрера, Г.К. Васильева // Проблемы анализа риска. – 2014. – № 5. – С. 18-25.

451. Херрера-Альварado, Л.А. Разработка комплексной технологии обезвреживания нефтешламов на территории месторождения AUSA – EP

PETROECUADOR в Эквадоре: дис. ... канд. техн. наук: 03.02.08 / Херрера-Альварадо Луис Андрес. – Москва, 2015. – 100 с.

452. Хидиятуллина, А.Я. Использование при рекультивации нефтезагрязненных почв консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов, найденного в естественных условиях Республики Татарстан / А.Я. Хидиятуллина // Сб. науч. тр. ВНИИОК. – 2014. – № 7. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-pri-rekultivatsii-neftezagryaznennyh-pochv-konsortsiuma-uglevodorodokislyayuschih-mikroorganizmov-naydenного-v>.

453. Хлыновский, А.М. Биопрепарат для очистки воды от загрязнений углеводородами / А.М. Хлыновский, И.В. Гордиенко, Н.В. Андреева [и др.] // Патент РФ № 2455240. Заявл. 17.12.2010. Оpubл. 10.07.2012. Бюл. № 19.

454. Холмогорова, Н.В. Трансформация фауны макрозообентоса малых рек Удмуртии под воздействием факторов нефтедобычи: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Холмогорова Надежда Владимировна. – Казань, 2009. – 24 с.

455. Холоденко, В.П. Биопрепарат для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / В.П. Холоденко, В.А. Чугунов, З.М. Ермоленко [и др.] // Патент РФ № 2191752. Заявл. 27.09.1999. Оpubл. 27.04.2002. Бюл. № 12.

456. Хоменко, Л.А. Микробная деструкция минеральных (нефтяных) масел / Л.А. Хоменко, Т.М. Ногина // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 6. – С. 70-81.

457. Худайгулов, Г.Г. Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* IB-739 / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2011. – № 5. – С. 214-217.

458. Хуснутдинов, И.Ш. Методы утилизации нефтяных шламов / И.Ш. Хуснутдинов, А.Г. Сафиулина, Р.Р. Заббаров, С.И. Хуснутдинов // Химия и хим. технология. – 2015. – Т. 58, № 10. – С. 3-20.

459. Цомбуева, Б.В. Метод очистки почвы от нефтяного загрязнения с помощью природных сорбентов / Б.В. Цомбуева, З.В. Горяшкиева, Л.Ф.

Щербакова // Вестник ВолГУ. Серия 11. Естеств. науки. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 19-26.

460. Цомбуева, Б.В. Влияние деятельности нефтедобывающего комплекса на загрязнение земель юго-востока Республики Калмыкия: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.02.08 / Цомбуева Баира Викторовна. – Иваново, 2017. – 16 с.

461. Цулаия, А.М. Влияние нефтяного, солевого и нефтесолевого загрязнения на морфофункциональные показатели овса посевного *Avena sativa* / А.М. Цулаия // Вестник Алтайского ГАУ. – 2011. – № 4. – С. 33-39.

462. Чеботарь, И.В. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства / И.В. Чеботарь, А.В. Лазарева, Я.К. Масалов // Вестник Российской акад. мед. наук. – 2014. – № 9-10. – С. 39-50.

463. Черных, М.С. Нефтедеструкция и биоремедиация / М.С. Черных, А.В. Садчиков // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25214>.

464. Четвериков, С.П. Комплексообразование триглицеропептидов псевдомонад с корневыми эксудатами растений как механизм воздействия на фитопатогены / С.П. Четвериков, Л.Р. Сулейманова, О.Н. Логинов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 565–570.

465. Чижов, Б.Е. Особенности нефтяного загрязнения территории Ханты-Мансийского автономного округа / Б.Е. Чижов, В.А. Долингер, А.И. Захаров // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2008. – № 8. – С. 15-21.

466. Чугунов, В.А. Биопрепарат для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / В.А. Чугунов, В.П. Холоденко, З.М. Ермоленко [и др.] // Патент РФ № 2193533. Заявл. 27.09.1999. Опубл. 27.11.2002. Бюл. № 33.

467. Чугунова, М.В. Особенности процессов естественной биodeградации нефти в основных типах почв северо-запада Российской Федерации / М.В. Чугунова, Л.Г. Бакина, Л.П. Капелькина, А.О. Герасимов // Биотехнология – от

науки к практике: Мат. Всеросс. конф. В 2 т. Т. 1. – Уфа: Башкирский ГУ, 2014. – С. 57-61.

468. Шагиев, Б.З. Эколого-экономическая эффективность применения лузги подсолнечника в процессе биодеструкции углеводородов нефти / Б.З. Шагиев, В.А. Бурлака, Е.П. Ищенко, Н.В. Бурлака // Нива Поволжья. – 2016. – № 1(38). – С. 50-56.

469. Шарапова, И.Э. Биопрепарат для очистки водных сред от нефти и нефтепродуктов / И.Э. Шарапова, М.Ю. Маркарова, А.В. Гарабаджиу // Патент РФ № 2465217. Заявл. 04.05.2011. Оpubл. 27.10.2012. Бюл. № 30.

470. Шаронова, Н.Л. Экология почвенной микробиоты и диагностика почв / Н.Л. Шаронова, В.М. Пахомова, Е.К. Бунтукова. – Казань: КазГАУ, 2009. – 224 с.

471. Шаяхметова, Р.И. Изменение пигментного состава высших и хвойных растений на Самотлорском месторождении / Р.И. Шаяхметова, С.П. Мальгина, Т.М. Гут, А.Ю. Кулагин // Известия Самарского науч. центра РАН. – 2017. – Т. 19, № 2(2). – С. 393-396.

472. Шевцов, А.Б. Идентификация фенотипически и генетически близких видов *Lactobacillus* на основе анализа нуклеотидной последовательности генов 16S rRNA, *groEL*, *rpoB* и *rplB* / А.Б. Шевцов, А.Р. Кушугулова, И.К. Тыныбаева [и др.] // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 5. – С. 659-668.

473. Шестаков, А.И. Микробный препарат для утилизации углеводородных загрязнений / А.И. Шестаков, И.Н. Сережкин, Ламова Я.А. [и др.] // Патент РФ № 2634397. Заявл. 23.03.2016. Оpubл. 26.10.2017а. Бюл. № 30.

474. Шестаков, А.И. Штамм *Nocardia coeliaca* ARC12 ВКПМ Ас-1990 - деструктор нефти и нефтепродуктов / А.И. Шестаков, И.Н. Сережкин, Я.А. Ламова [и др.] // Патент РФ № 2624067. Заявл. 07.12.2015. Оpubл. 30.06.2017б. Бюл. № 19.

475. Шестаков, А.И. Микробный препарат для утилизации углеводородных загрязнений / А.И. Шестаков, И.Н. Сережкин, Я.А. [и др.] // Патент РФ № 2633690. Заявл. 07.12.2015. Оpubл. 16.10.2017в. Бюл. № 29.

476. Шилова, И.И. Биологическая рекультивация нефтезагрязненных земель в условиях таежной зоны / И.И. Шилова // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 159-168.

477. Шкапенко, В.В. Трансформация углеводов в воде и донных осадках / В.В. Шкапенко, В.М. Кадошников, Б.А. Горлицкий, И.Р. Писанская // Збірник наукових праць Інституту геохімії навколишнього середовища. – Киев: ІГНС, 2011. – Вип. 19. – С. 102-108.

478. Шпербер, Е.Р. Разработка комплекса природоохранных технологий переработки отходов НПЗ Краснодарского края: дис. ... д-ра техн. наук: 03.02.08 / Шпербер Елизар Рубинович. – Москва, 2016. – 332 с.

479. Шулаев, Н.С. Фиторемедиация нефтезагрязненных почв / Н.С. Шулаев, В.В. Пряничникова, Р.Р. Кадыров, Н.А. Быковский // Бутлеровские сообщения. – 2016. – Т. 47, № 8. – С. 133. – URL: <https://butlerov.com/files/reports/2016/vol47/8/133/16-47-8-133-.pdf>.

480. Шулаев, Н.С. Фиторемедиация нефтепромысловых почв / Н.С. Шулаев, В. В. Пряничникова, Р.Р. Кадыров, Н.Н. Фанакова // Безопасность в техносфере. – 2017. – Т. 6, № 1. – С. 25-30.

481. Экологические проблемы топливно-энергетического комплекса России // Зеленый мир. – 2007. – № 1-2. – С. 6-8.

482. Экологический паспорт муниципального образования город Тарко-Сале. 2007. Официальный сайт Администрации муниципального образования город Тарко-Сале. – URL: <http://www.tsgrad-adm.ru/acity/7/ecopassport>.

483. Юльtimiрова И.А. Проблемы утилизации нефтешламов // Электрон. портал автономной некоммерческой организации «Международный центр содействия развитию предприятий по переработке нефтешламов». – URL: <http://oil-slime.ru/index.php?id=502>.

484. Ягафарова, Г.Г. Способ очистки нефтешлама от нефти и нефтепродуктов / Г.Г. Ягафарова, Е.Г. Ильина, С.В. Леонтьева [и др.] // Патент РФ № 2332362. Заявл. 15.02.2005. Оpubл. 27.08.2008. Бюл. № 24.

485. Янкевич, М.И. Биологически активная композиция для очистки поверхностных вод, почв и грунтов от нефтяных загрязнений / М.И. Янкевич, В.В. Хадеева, Л.Ф. Суржко [и др.] // Патент РФ № 2270808. Заявл. 30.05.2003. Оpubл. 27.02.2006. Бюл. № 6.

486. Янкевич, М.И. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра / М.И. Янкевич, В.В. Хадеева, В.П. Мурыгина // Биосфера. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 199-208.

487. Янкевский, А.В. Экологические проблемы добычи нефти и газа на шельфе Мирового океана / А.В. Янкевский, Д.Д. Ганченко, Е.В. Чернева, В.А. Щерба // Науковедение. – 2017. – Т. 9, № 6. – URL: <https://naukovedenie.ru/PDF/45TVN617.pdf>.

488. Яппаров, А.Х. Комплексный подход к рекультивации нефтезагрязненных почв / А.Х. Яппаров, И.А. Дегтярева, А.Я. Хидиятуллина // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5537>.

489. Abbasi Maedeh, P. Evaluation of oil pollution dispersion in an unsaturated sandy soil environment / P. Abbasi Maedeh, T. Nasrabadi, W. Wu, M. Al Dianty // Pollution. – 2017. – V. 3, № 4. – P. 701-711.

490. Abdel-Mawgoud, A.M. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles / A.M. Abdel-Mawgoud, F. Lepine, E. Deziel // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 86, № 5. – P. 1323-1336.

491. Abosede, E.E. Effect of crude oil pollution on some soil physical properties / E.E. Abosede // J. Agricul. Veterin. Sci. – 2013. – V. 6, № 3. – P. 14-17.

492. Alegbeleye, O.O. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa / O.O. Alegbeleye, B.O. Opeolub, V. Jackson // Braz. J. Microbiol. – 2017. – V. 48, № 2. – P. 314-325.

493. Abou-Shanab, R.A. Characterization of crude oil degrading bacteria isolated from contaminated soils surrounding gas stations / R.A. Abou-Shanab, M. Eraky, A.M. Haddad, A.B. Abdel-Gaffar, A.M. Salem // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2016. – V. 97, № 5. – P. 684-688.

494. *Acinetobacter*. Molecular Biology / U. Gerischer (Ed.). – Caister Academic Press, 2008. – 348 p.

495. Adekunle, A.A. Laboratory scale bioremediation of crude oil impacted soil using animal waste compost / A.A. Adekunle, I.M. Adekunle, A.A. Badejo [et al.] // Tehnički Glasnik. – 2017. – V. 11, № 1-2. – P. 45-49.

496. Afzal, M. Ecology of alkane-degrading bacteria and their interaction with the plant / M. Afzal, S. Yousaf, T.G. Reichenauer, A. Sessitsch // In: Molecular microbial ecology of the rhizosphere. F.J.D. Bruijn (Ed.). – Wiley. Hoboken, NJ, USA, 2013. – P. 975-989.

497. Afzal, M. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants / M. Afzal, Q.M. Khan, A. Sessitsch // Chemosphere. – 2014. – V. 117. – P. 232-242.

498. Agarry, S. Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents / S. Agarry, G.K. Latinwo // J. Ecologic. Engin. – 2015. – V. 16, № 2. – P. 82-91.

499. Agu, K.C. Isolation and characterization of microorganisms from oil polluted soil in Kwata, Awka South, Nigeria / K.C. Agu, E.E. Bassey, C.A. Iloanusi [et al.] // Amer. J. Curr. Microbiol. – 2014. – V. 3. – P. 46-59.

500. Ahmed, M.M.M. Bioavailability of cadmium and nickel to *Daucus carota* L. and *Corchorus olitorius* L. treated by compost and microorganisms / M.M.M. Ahmed, M.B.D. Mazen, N.A. Nafady, O.A. Monsef // Soil Environ. – 2017. – V. 36, № 1. – P. 1-12.

501. Aichberger, H. Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil / H. Aichberger, M.



Hasinger, R. Braun, A.P. Loibner // *Biodegradation*. – 2005. – V. 16, № 2. – P. 115-125.

502. Akinwumi, I.I. Effects of crude oil contamination: On the index properties, strength and permeability of lateritic clay / I.I. Akinwumi, D. Diwa, N. Obianigwe // *Int. J. Appl. Sci. Engineer. Res.* – 2014. – V. 3, № 4. – P. 816-824.

503. Alavi, N. Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons from highly saline and clay soil using *Sorghum halepense* (L.) Pers. and *Aeluropus littoralis* (Guna) Parl / N. Alavi, I. Parseh, M. Ahmadi [et al.] // *Soil and Sediment Contamination: An Int. J.* – 2017. – V. 26, № 1. – P. 127-140.

504. Al-Baldawi, I.A. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel contaminated water using *Scirpus grossus* / I.A. Al-Baldawi, S.R. Sheikh, N. Abdullah [et al.] // *Ecol. Engin.* – 2015. – V. 74. – P. 463-473.

505. Al-Dhabaan, F.A. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia / F.A. Al-Dhabaan // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2018. – In Press. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>.

506. Alegbeleye, O.O. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa / O.O. Alegbeleye, B.O. Opeolub, V. Jackson // *Braz. J. Microbiol.* – 2017. – V. 48, № 2. – P. 314-325.

507. Al-Gelawi, M.H. Role of plasmid of *Pseudomonas putida* S3A in nylon 6 degradation / M.H. Al-Gelawi, A.A. Al-Saraf, R.B. Al-Baldawi // *J. Biologic. Sci.* – 2013. – V. 13, № 6. – P. 555-558.

508. Al-Hawash, A.B. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq / A.B. Al-Hawash, J.T. Alkooranee, H.A. Abbood [et al.] // *Biotechnol. Rep.* – 2018a. – V. 17. – P. 104-109.

509. Al-Hawash, A.B. Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1 / A.B. Al-Hawash, X. Zhang, F. Ma // *MicrobiologyOpen*. – 2018b. – e00619. – doi:10.1002/mbo3.619.

510. Al-Hawash, A.B. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment / A.B. Al-Hawash, M.A. Dragh, Sh. Li [et al.] // *Egypt. J. Aquatic Res.* – 2018c. – In Press. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>.

511. Ali, A. Biodegradation of chrysene by *Ochrobactrum intermedium* and *Enterobacter* sp. isolated from the surrounding soil of Mathura oil refinery / A. Ali, A. Anas, Tanzeel [et al.] // *J. Biotechnol. Biomater.* – 2015. – V. 5, № 6. – P. 336.

512. Alkhatib, M.F. An isolated bacterial consortium for crude oil biodegradation / M.F. Alkhatib, M.Z. Alam, S.A. Muyibi, I.A.F. Husain // *Afric. J. Biotechnol.* – 2011. – V. 10, № 81. – P. 18763-18767.

513. Allam, A. Potentials of using duckweed (*Lemna gibba*) for treatment of drainage water for reuse in irrigation purposes / A. Allam, A. Tawfik, A. El-Saadi, A. Negm // *Desalination and Water Treatment.* – 2016. – V. 57, № 1. – P. 459-467.

514. Almatawah, Q. An indigenous biosurfactant producing *Burkholderia cepacia* with high emulsification potential towards crude oil / Q. Almatawah // *J. Environ. Anal. Toxicol.* – 2017. – V. 7, № 6: 528. – DOI:10.4172/2161-0525.1000528.

515. Alpha, N.E. Modification, characterization and use of *Imperata cylindrical* (Toofa) fibre as oil sorbent / N.E. Alpha, J.T. Barminas, S.A. Osemeahon // *Chem. Sci. Int. J.* – 2017. – V. 21, № 3. – Article no. CSIJ.39420. – URL: <https://doi.org/10.9734/CSJI/2017/39420>.

516. Alrumman, S.A. Isolation, fingerprinting and genetic identification of indigenous PAHs degrading bacteria from oil-polluted soils / S.A. Alrumman, A. El-L. Hesham, S.A. Alamri // *J. Environ. Biol.* – 2016. – V. 37, № 1. – P. 75-81.

517. Al-Saad, H.T. Total petroleum hydrocarbon in selected fish of shatt Al-Arab river, Iraq / H.T. Al-Saad, B.S. Al-Ali, L.J. Al-Anber [et al.] // *Int. J. Mar. Sci.* – 2017. – V. 7, № 1. – doi:10.5376/ijms.2017.07.0001.

518. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V. 215, № 3. – P. 403-410.

519. Alwan, A.H. Bioremediation of the water contaminated by waste of hydrocarbon by use *Ceratophyllaceae* and *Potamogetonaceae* plants / A.H. Alwan,

S.M. Fadil, S.H. Khadair [et al.] // J. Genetic Environ. Resources Conservation. – 2013. – V. 1, № 2. – P. 106-110.

520. Al-Wasify, R.S. Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates / R.S. Al-Wasify, S.R. Hamed // Int. J. Bacteriol. – 2014. – ID 863272. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/863272>.

521. Amenu, D. Isolation of poly aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria's / D. Amenu // Landmark Res. J. Med. Med. Sci. – 2014. – V. 1, № 1. – P. 1-3.

522. Ángeles, M.T. *In situ* biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil / M.T. Ángeles, R.V. Refugio // Braz. J. Microbiol. – 2013. – V. 44, № 2. – P. 595-605.

523. Angeletti, S. Viridans group Streptococci clinical isolates: MALDI-TOF mass spectrometry versus gene sequence-based identification / S. Angeletti, G. Dicuonzo, A. Avola [et al.] // PLoS One. – 2015. – V. 10, № 3. – e0120502. – doi: 10.1371/journal.pone.0120502.

524. Anuj, S.N. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes / S.N. Anuj, D.M. Whiley, T.J. Kidd [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2009. – V. 63, № 2. – P. 127-31.

525. Appah, C.F. Effects of crude oil spill in germination and growth of *Hibiscus Esculentus* (Okra) Inbayelsa state Niger delta region of Nigeria / C.F. Appah, D.C. Okujagu, S.E. Basse // Int. J. Engin. Sci. – 2014. – V. 3, № 6. – P. 30-40.

526. Arellano, P. Detecting the effects of hydrocarbon pollution in the Amazon forest using hyperspectral satellite images / P. Arellano, K. Tansey, H. Baltzer, D.S. Boyd // Environ. Pollut. – 2015. – V. 205, № 455. – P. 225-239.

527. Arellano, P. Field spectroscopy and radiative transfer modelling to assess impacts of petroleum pollution on biophysical and biochemical parameters of the Amazon rainforest / P. Arellano, K. Tansey, H. Balzter, D.S. Boyd // Environ. Earth Sci. – 2017. – V. 76: 217. – doi: 10.1007/s12665-017-6536-6.

528. Arkhipova, T.N. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil / T.N. Arkhipova, E. Prinsen, S.U. Veselov [et al.] // *Plant Soil*. – 2007. – V. 292, № 1-2. – P. 305-315.

529. Asadpour, R. Application of sorbent materials in oil spill management: a review / R. Asadpour, Z.Z. Harith, N. Sapari // *Caspian J. Appl. Sci. Res.* – 2013. – V. 2, № 2. – P. 46-58.

530. Astashkina, A.P. Study of the hydrocarbon-oxidizing activity of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus* / A.P. Astashkina, A.A. Bakibayeva, E.V. Plotnikova [et al.] // *Procedia Chemistry*. – 2015. – V. 15. – P. 90-96.

531. Ateia, M. *In-situ* biological water treatment technologies for environmental remediation: a review / M. Ateia, C. Yoshimura, M. Nasr // *J. Bioremediat. Biodegrad.* – 2016. – V. 7, № 3: 348. – doi: 10.4172/2155-6199.1000348.

532. Athar, H.-R. Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (*Zea mays* L.) plants / H.-R. Athar, S. Ambreen, M. Javer [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2016. – V. 23, № 18. – P. 18320-18331.

533. Balliana, A.G. Development of *Canavalia ensiformis* in soil contaminated with diesel oil / A.G. Balliana, B.B. Moura, R.C. Inckot, C. Bona // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – V. 24, № 1. – P. 979-986. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7674-1>

534. Bao, M. Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil / M. Bao, Y. Pi, L. Wang [et al.] // *Environ. Sci. Process Impacts*. – 2014. – V. 16, № 4. – P. 897-903.

535. Balogun, S. Degradation of bitumen by *Burkholderia cepacia* KT803965 isolated from heavy oil impacted tropical soil / S. Balogun, A. Ayangbenro, S. Kareem, S. Sojinu // *RMZ – materials and geoenvironment*. – 2015. – V. 62. – P. 225-235.

536. Barakat, Kh.M. Biosurfactant production by haloalkaliphilic *Bacillus* strains isolated from Red Sea, Egypt / Kh.M. Barakat, S.W.M. Hassan, O.M. Darwesh // *Egypt. J. Aquatic Res.* – 2017. – V. 43, № 3. – P. 205-211.

537. Baruah, P. Effect of crude oil contamination on the chlorophyll content and morpho-anatomy of *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. / P. Baruah, R.R. Saika, P.P. Baruah, S. Deka // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2014. – V. 21. – P. 12530-12538.

538. Baruah, P. Phytoremediation of crude oil-contaminated soil employing *Crotalaria pallida* Aiton / P. Baruah, S. Deka, P.P. Baruah // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2016. – V. 23, № 11. – P. 10595-10603.

539. Basumatary, B. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus* / B. Basumatary, R. Saikia, S. Bordoloi // J. Environ. Biol. – 2012. – V. 33, № 5. – P. 891-896.

540. Bazargan, A. Utilization of rice husks for the production of oil sorbent materials / A. Bazargan, J. Tan, Ch.W. Hui, G. McKay // Cellulose. – 2014. – V. 21, № 3. – P. 1679-1688.

541. Behera, P. *Mangrovibacter phragmitis* sp. nov., an endophyte isolated from the roots of *Phragmites karka* / P. Behera, V.V. Ramana, Bh. Maharana [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2017. – V. 67, № 5. – P. 1228-1234.

542. Bellenger, J.P. Vanadium requirements and uptake kinetics in the dinitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii* / J.P. Bellenger, T. Wichard, A.M.L. Kraepiel // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74, № 5. – P. 1478-1484.

543. Benal, T. Study of prevailing of *Deuteromycetous* fungi on the petro-polluted soil / T. Benal, K. Shivani, R.L. Pagare, S. Chitnis // Int. Res. J. Biological Sci. – 2014. – V. 3, № 11. – P. 28-31.

544. Benson, A. Inoculation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacteria along with biosurfactant application enhances the phytoremediation efficiency of *Medicago sativa* in hydrocarbon-contaminated soils / A. Benson, G. Ram, A. John, M.M. Joe // Bioremed. J. – 2017. – V. 21, № 1. – P. 20-29.

545. Benyahia, F. Bioremediation of crude oil contaminated desert soil: effect of biostimulation, bioaugmentation and bioavailability in biopile treatment systems / F. Benyahia, A.S. Embaby // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2016. – V. 13, № 2: 219. – doi: 10.3390/ijerph13020219.

546. Berneche-D'Amours, A. Sequence analysis of *rpoB* and *rpoD* gene fragments reveals the phylogenetic diversity of *Actinobacteria* of genus *Frankia* / A. Berneche-D'Amours, M.G. Ghinet, J. Beaudin [et al.] // *Can. J. Microbiol.* – 2011. – V. 57. – P. 244-249.

547. Bezza, F.A. Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation / F.A. Bezza, M. Beukes, E.M.N. Chirwa // *Proc. Biochem.* – 2015. – V. 50, № 11. – P. 1911-1922.

548. Bezza, F. A. Biosurfactant assisted bioremediation of petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic and soil media: dis. ... doctor of philosophy: chemical engineering / Bezza Fisseha Andualem. – Pretoria, 2016. – 254 p.

549. Bezza, F.A. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain / F.A. Bezza, E.M.N. Chirwa // *J. Hazard. Mater.* – 2017. – V. 321. – P. 218-227.

550. Bhattacharya, M. Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1 / M. Bhattacharya, D. Biswas, S. Sana, S. Datta // *3 Biotech.* – 2015. – V. 5, № 5. – P. 807-817.

551. Biosurfactants. Research trends and applications / C.N. Mulligan, S.K. Sharma, A. Mudhoo (Eds.). – CRC Press, 2015a. – 346 p.

552. Biosurfactants: Production and utilization – processes, technologies and economics / N. Kosaric, F.V. Sukan (Eds.). – CRC Press, 2015b. – 389 p.

553. Bisht, S. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology / S. Bisht, P. Pandey, B. Bhargava // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – V. 46, № 1. – P. 7-21.

554. Bizzini, A. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains / A. Bizzini, K. Jatou, D. Romo [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – V. 49, № 2. – P. 693-696.

555. Böhme, K. Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting / K. Böhme, I.C. Fernández-No, M. Pazos [et al.] // *Electrophoresis*. – 2013. – V. 34, № 6. – P. 877-887.

556. Bordoloi, S. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil using sedge species / S. Bordoloi, B. Basumatary // In: *Phytoremediation: Management of environmental contamination*. V. 1. A.A. Ansari, S.S. Gill, R. Gill [et al.] (Eds.). – Springer International Publishing, Switzerland, 2015. – P. 279-282.

557. Brakstad, O.G. Microbial communities related to biodegradation of dispersed Macondo oil at low seawater temperature with Norwegian coastal seawater / O.G. Brakstad, M. Throne-Holst, R. Netzer [et al.] // *Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 8, № 6. – P. 989-998.

558. Buchan, B.W. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of *Mycobacterium* species in cultures using solid medium and broth / B.W. Buchan, K.M. Riebe, M. Timke [et al.] // *Amer. J. Clin. Pathol.* – 2014. – V. 141, № 1. – P. 25-34.

559. Burillo, A. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection / A. Burillo, B. Rodríguez-Sánchez, A. Ramiro [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, № 1. – e86915. – doi: 10.1371/journal.pone.0086915.

560. Buyer, J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis / J.S. Buyer // *J. Microbiol. Methods*. – 2002. – V. 48, № 2-3. – P. 259-265.

561. Cabrolier, N. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones / N. Cabrolier, M. Sauget, X. Bertrand, D. Hocquet // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – V. 53, № 4. – P. 1395-1398.

562. Camacho, C. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – V. 10, № 1. – P. 421.

563. Cameotra, S.S. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind / S.S. Cameotra, R.S. Makkar, J. Kaur, S.K. Mehta // In:

Biosurfactants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. R. Sen (Ed.). – New York: Springer, 2010. – V. 672. – P. 261-280.

564. Campos, J.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries / J.M. Campos, T.L.M. Stamford, L.A. Sarubbo [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2013. – V. 29, № 5. – P. 1097-1108.

565. Carroll, J.L. Assessing impacts of simulated oil spills on the Northeast Arctic cod fishery / J.L. Carroll, F. Vikebo, D. Howell [et al.] // *Mar. Pollut. Bull.* – 2018. – V. 126. – P. 63-73.

566. Castège, I. Response of benthic macrofauna to an oil pollution: Lessons from the “Prestige” oil spill on the rocky shore of Guéthary (south of the bay of Biscay, France) / I. Castège, E. Milon, F. Pautrizel // *Deep Sea research. Part II: Topical studies in oceanography.* – 2014. – V. 106. – P. 192-197.

567. Chai, L. Isolation and characterization of a crude oil degrading bacteria from formation water: comparative genomic analysis of environmental *Ochrobactrum intermedium* isolate versus clinical strains / L. Chai, X. Jiang, F. Zhang [et al.] // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2015. – V. 16, № 10. – P. 865-874.

568. Chai, W. Preparation and characterization of polypropylene fiber-grafted polybutylmethacrylate as oil sorbent / W. Chai, X. Liu, X. Zhang [et al.] // *Desalination and Water Treatment.* – 2016. – V. 57, № 39. – P. 18560-18571.

569. Chaineau, C.H. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessments / C.H. Chaineau, C. Yepremian, J.F. Vidalie [et al.] // *Water Air Soil Poll.* – 2003. – V. 144, № 1. – P. 419-440.

570. Chaineau, C.H. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil / C.H. Chaineau, G. Rougeux, C. Yepremian, J. Oudot // *Soil Biol. Biochem.* – 2005. – V. 37, № 8. – P. 1490-1497.

571. Chan, J.Z.-M. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter* / J.Z.-M. Chan, M.R. Halachev, N.J. Loman [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12. – P. 302-311.



572. Chaprão, M.J. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand / M.J. Chaprão, I.N.S. Ferreira, P.F. Correa [et al.] // *Electron. J. Biotechnol.* – 2015. – V. 18, № 6. – P. 471-479.

573. Chen, Z.X. Plant uptake, translocation, and return of polycyclic aromatic hydrocarbons via fine root branch orders in a subtropical forest ecosystem / Z.X. Chen, H.G. Ni, X. Jing [et al.] // *Chemosphere.* – 2015. – V. 131. – P. 192-200.

574. Chowdhury, S.P. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review / S.P. Chowdhury, A. Hartmann, X-W. Gao, R. Borriss // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6: 780. – doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

575. Cocârță, D.M. Crude oil contaminated sites: Evaluation by using risk assessment approach / D.M. Cocârță, M.A. Stoian, A. Karademir // *Sustainability.* – 2017. – V. 9: 1365. – doi:10.3390/su9081365.

576. Collins, M.D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications / M.D. Collins, D. Jones // *Microbiol. Rev.* – 1981. – V. 15, № 2. – P. 316-354.

577. Collins, M.D. Analysis of isoprenoid quinones / M.D. Collins // *Methods Microbiol.* – 1985. – V. 18. – P. 329-363.

578. Cook, L. Comparison of trees and grasses for rhizoremediation of petroleum hydrocarbons / L. Cook, D. Hesterberg // *Int. J. Phytoremed.* – 2013. – V. 15, № 9. – P. 844-860.

579. Cooper, D.G. Biosurfactants / D.G. Cooper // *Microbiol. Sci.* – 1986. – V. 3, № 5. – P. 145-149.

580. Cooper, D.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species / D.G. Cooper, B.G. Goldenberg // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – V. 53, № 2. – P. 224-229.

581. Das, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms /

S. Das, H.R. Dash, N. Mangwani [et al.] // *J. Microbiol. Methods.* – 2014. – V. 103. – P. 80-100.

582. Dawoodi, V. The study of heterotrophic and crude oil-utilizing soil fungi in crude oil contaminated regions / V. Dawoodi, M. Madani, A. Tahmourespour, Z. Golshani // *J. Bioremed. Biodegrad.* – 2015. – V. 6, № 2. – DOI: 10.4172/2155-6199.1000270.

583. De Almeida, D.G. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances / D.G. De Almeida, R.C.F. Soares Da Silva, J.M. Luna [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7: 1718. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01718.

584. Decesaro, A. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation / A. Decesaro, Th.S. Machado, Â.C. Cappellaro [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – DOI 10.1007/s11356-017-9778-7.

585. De Ley, J. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. / J. De Ley, K. Cattoir, A. Reynaerts // *Eur. J. Biochem.* – 1970. – V. 12, № 1. – P. 133-142.

586. Desai, A.P. Use of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in a paediatric clinical laboratory for identification of bacteria commonly isolated from cystic fibrosis patients / A.P. Desai, T. Stanley, M. Atuan [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2012. – V. 65, № 9. – P. 835-838.

587. Desai, J. Microbial production of surfactants and their commercial potential / J. Desai, I. Banat // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61, № 1. – P. 47-64.

588. Dindar, E. Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil / E. Dindar, F.O.T. Şağban, H.S. Başkaya // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2015. – V. 105. – P. 268-275.

589. Doan, C.D.Ph. Identification and biodegradation characteristics of oil-degrading bacteria from subtropical Iriomote Island, Japan, and tropical Con Dao Island, Vietnam / C.D.Ph. Doan, A. Sano, H. Tamaki [et al.] // *Tropics.* – 2017. – V. 25, № 4. – P. 147-159.

590. Duca, D. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions / D. Duca, J. Lory, C.L. Patten [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2014. – V. 106, № 1. – P. 85-125.

591. Dupuy, J. Morphological and physiological responses of maize (*Zea mays*) exposed to sand contaminated by phenanthrene / J. Dupuy, S. Ouvrard, P. Leglize, T. Sterckerman // *Chemosphere*. – 2015. – V. 124. – P. 110-115.

592. Emel'yanova, E.K. Psychrotolerant oil-degrading microorganisms for bioremediation / E. Emel'yanova, I. Andreeva, S. Zagrebelny, V. Repin // *Environ. Eng. Manag. J.* – 2006. – V. 5, № 2. – P. 169-179.

593. Emengini, E.J. Comparative analysis of spectral responses of varied plant species to oil stress / E.J. Emengini, F.C. Ezeh, N. Chigbu // *Int. J. Sci. Engin. Res.* – 2013. – V. 544, № 4(6). – P. 1421-1427.

594. Eraky, M. Petroleum hydrocarbon degradation potential of *Ochrobactrum lupini* isolated from BTEX enrichment soil / M. Eraky, R.A.I. Abou-Shanab, A.M. Salem // *Int. J. Environment*. – 2015. – V. 4, № 3. – P. 204-209.

595. Erler, R. VibrioBase: A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans / R. Erler, A. Wichels, E.A. Heinemeyer // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2015. – V. 38, № 1. – P. 16-25.

596. Ertekin, Ö. Phytoremediation potential of *Landoltia punctata* on petroleum hydrocarbons / Ö. Ertekin, T. Kösesakal, V.S. Ünlü [et al.] // *Turk. J. Bot.* – 2015. – V. 39. – P. 23-29.

597. Eurosoil 2008: soil – society – environment / W.H. Blum, M.H. Gerzabek, M. Vodrazka (Eds.). – Vienna: BOKU, 2008. – 400 p.

598. Evdokimova, G.A., Complexes of potentially pathogenic microscopic fungi in anthropogenic polluted soils / G.A. Evdokimova, M.V. Korneykova, E.V. Lebedeva // *Environ. Sci. Health*. – 2013. – V. 48. – P. 746-752.

599. Ezaki, T. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains

/ T. Ezaki, Y. Hashimoto, E. Yabuchi // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1989. – V. 39, № 3. – P. 224-229.

600. Ezeldin, M. Determination of some heavy metals in raw petroleum wastewater samples before and after passing on australis phragmites plant / M. Ezeldin, S.A.G. Nasir, A.M. Masaad, N.M. Suleman // American J. Environ. Protect. – 2015. – V. 4, № 6. – P. 354-357.

601. Falciglia, P. Remediation of hydrocarbon polluted soils using 2.45 GHz frequency-heating: Influence of operating power and soil texture on soil temperature profiles and contaminant removal kinetics / P. Falciglia, F.G.A. Vagliasindi // J. Geochem. Explor. – 2015. – V. 151. – P. 66-73.

602. Farag, S. Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain / S. Farag, N.A. Soliman // Braz. Archiv. Biol. Technol. – 2011. – V. 54, № 4. – P. 821-830.

603. Farraji, H. Role of rhizoremediation in decontaminating some hazardous pollutants / H. Farraji, N.Q. Zaman, M.A. Zahed, H. Faraji // In: Handbook of research on inventive bioremediation techniques. J. Bhakta (Ed.). – Hershey, PA: IGI Global, 2017. – P. 213-246.

604. Farshid, K. Evaluation of bioremediation of naphthalene using native bacteria isolated from oil contaminated soils in Iran / K. Farshid, R. Sara, T. Yaghoob // Ann. Biol. Res. – 2011. – V. 2, № 6. – P. 610-616.

605. Fatajeva, E. The use of *Acinetobacter* sp. for oil hydrocarbon degradation in saline waters / E. Fatajeva, I. Gailiūtė, D. Paliulis, S. Grigiškis // Biologija. – 2014. – V. 60, № 3. – P. 126-133.

606. Fatima, K. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil / K. Fatima, A. Imran, I. Amin [et al.] // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2016. – V. 23. – P. 6188-6196.

607. Fatima, K. Plant-bacteria synergism: An innovative approach for the remediation of crude oil contaminated soils: Review / K. Fatima, A. Imran, M. Naveed, M. Afzal // Soil Environ. – 2017. – V. 36, № 2. – P. 93-113.

608. Fatima, K. Successful phytoremediation of crude-oil contaminated soil at an oil exploration and production company by plants-bacterial synergism / K. Fatima, A. Imran, I. Amin [et al.] // *Int. J. Phytoremed.* – 2018. – V. 20, № 7. – P. 675-681.

609. Ferhat, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils / S. Ferhat, S. Mnif, A. Badis [et al.] // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2011. – V. 65, № 8. – P. 1182-1188.

610. Ferrando, A. Oil spill effects on macrofaunal communities and bioturbation of pristine marine sediments (Caleta Valdés, Patagonia, Argentina): experimental evidence of low resistance capacities of benthic systems without history of pollution / A. Ferrando, E. Gonzalez, M. Franco [et al.] // *Environ. Sci. Poll. Res.* – 2015. – V. 22, № 20. – P. 15294-15306.

611. Fester, T. Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants / T. Fester, J. Giebler, L.Y. Wick [et al.] // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2014. – V. 27. – P. 168-175.

612. Filonov, A. Oil-spill bioremediation, using a commercial biopreparation “MicroBak” and a consortium of plasmid-bearing strains “V&O” with associated plants / A. Filonov, A. Ovchinnikova, A. Vetrova [et al.] / In: *Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites*. L. Romero-Zerón (Ed.). – Rijeka: InTech, 2012. – P. 291-318.

613. Fodrie, F.J. Integrating organismal and population responses of estuarine fishes in Macondo spill research / F.J. Fodrie, K.W. Able, F. Galvez [et al.] // *BioScience.* – 2014. – V. 4, № 9. – P. 778-788.

614. Fox, C.H. A preliminary spatial assessment of risk: Marine birds and chronic oil pollution on Canada's pacific coast / C.H. Fox, P.D. O'Hara, S. Bertazzon [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2016. – V. 573. – P. 799-809.

615. Freitas, B.G. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans / B.G. Freitas, J.G.M. Brito, P.P.F. Brasileiro [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7: 1646. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01646.

616. Frick, C.M. Assessment of phytoremediation as an in situ technique for cleaning oil-contaminated sites / C.M. Frick, R.E. Farell, J.J. Germida // Calgary: PTAC, 1999. – 81 p.

617. Fuentes, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications / S. Fuentes, V. Méndez, P. Aguila, M. Seeger // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98, № 11. – P. 4781-4794.

618. Fukuhara, Y. Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation / Y. Fukuhara, S. Horii, T. Matsuno [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2013. – V. 170, № 2. – P. 329-339.

619. Fulmer, P.A. Effects of COREXIT EC9500A on bacterial communities influenced by the Deepwater Horizon oil spill / P.A. Fulmer, L.J. Hamdan. – American Geophysical Union, Fall Meeting, 2010. – URL: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2010AGUFMOS33B1475F>.

620. Gagnon, V. Effect of plant species on water quality at the outlet of a sludge treatment wetland / V. Gagnon, F. Chazarenc, M. Kõiv, J. Brisson // Water Res. – 2012. – V. 46, № 16. – P. 5305-5315.

621. Gayathiri, E. Isolation, identification and molecular characterization of hydrocarbon degrading bacteria and its associated genes – a review / E. Gayathiri, B. Bharathib, S. Selvadhas, R. Kalaikandhan // Int. J. Pharm. Bio. Sci. – 2017. – V. 8, № 2. – P. 1010-1019.

622. Gaydamaka, S. Approach to a problem of dioremediation oil-polluted raised bogs in the Western Siberia (Russia) / S. Gaydamaka, V. Murygina // Int. J. Environ. Res. – 2013. – V. 2, № 3. – P. 75-82.

623. Gharaei-Fathabad, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review / E. Gharaei-Fathabad // American J. Drug Discov. Develop. – 2011. – V.1, № 1. – P. 58-69.

624. Ghosal, D. Degradation of phenanthrene via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid by *Ochrobactrum* sp. strain PWTJD / D. Ghosal, J. Chakraborty, P. Khara, T.K. Dutta // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – V. 313, № 2. – P. 103-110.

625. Ghosal, D. Characterization of the metabolic pathway involved in assimilation of acenaphthene in *Acinetobacter* sp. strain AGAT-W / D. Ghosal, A. Dutta, J. Chakraborty [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2013. – V. 164. – P. 155-163.

626. Ghosal, D. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review / D. Ghosal, S. Ghosh, T.K. Dutta, Y. Ahn // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7: 1369. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.

627. Gkorezis, P. The Interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective / P. Gkorezis, M. Daghighi, A. Franzetti [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7: 1836. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01836.

628. Golbabaei Kootenaei, F. Membrane biological reactors (MBR) and their applications for water reuse / F. Golbabaei Kootenaei, H. Aminirad // *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* – 2014. – V. 2, № 7. – P. 2208-2216.

629. Graj, W. Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil / W. Graj, P. Lisiecki, A. Szulc [et al.] // *Water Air Soil Poll.* – 2013. – V. 224: 1676. – DOI 10.1007/s11270-013-1676-0.

630. Guarino, C. Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation – assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil / C. Guarino, V. Spada, R. Sciarrillo // *Chemosphere.* – 2017. – V. 170. – P. 10-16.

631. Guizhou, G. Isolation and characterization of a thermophilic oil-degrading bacterial consortium / G. Guizhou, L. Zheng, Z. Dongfeng, Z. Chaocheng // *China Petroleum Proces. Petrochemic. Technol.* – 2013. – V. 15, № 2. – P. 82-90.

632. Hajabbasi, M.A. Importance of soil physical characteristics for petroleum hydrocarbons phytoremediation: A review / M.A. Hajabbasi // *African J. Environ. Sci. Technol.* – 2016. – V. 10, № 11. – P. 394-405.

633. Han, T. Combination of biochar amendment and phytoremediation for hydrocarbon removal in petroleum-contaminated soil / T. Han, Z. Zhao, M. Bartlam, Y. Wang // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2016. – V. 23, № 21. – P. 21219-21228.

634. Haney, J.C. Bird mortality from the Deepwater Horizon oil spill. I. Exposure probability in the offshore Gulf of Mexico / J.C. Haney, H.J. Geiger, J.W. Short // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 2014. – V. 513. – P. 225-237.

635. Harvey, H.R. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in Chukchi Sea biota and sediments and their toxicological response in the Arctic cod, *Boreogadus saida* / H.R. Harvey, K.A. Taylor, H.V. Pie, C.L. Mitchelmore // *Deep Sea Research. Part II: Topical studies in oceanography.* – 2014. – V. 102. – P. 32-55.

636. Hawrot-Paw, T. Growth and development of selected plant species in the phytoremediation of diesel oil contaminated soil / M. Hawrot-Paw, T. Bąkowska // *Environ. Protect. Engin.* – 2014. – V. 40, № 4. – P. 5-13.

637. Hazen, T.C. Marine oil biodegradation / T.C. Hazen, R.C. Prince, N. Mahmoudi // *Environ. Sci. Technol.* – 2016. – V. 50. – P. 2121-2129.

638. Hing, L. S. Laboratory stimulation of oil-spill effects on marine phytoplankton / L.S. Hing, T. Ford, P. Finch [et al.] // *Aquatic toxicol.* – 2011. – V. 103, № 1-2. – P. 32-37.

639. Hoang, A.T. A report of oil spill recovery technologies / A.T. Hoang, V.V. Pham, D.N. Nguyen // *Int. J. Appl. Engin. Res.* – 2018. – V. 13, № 7. – P. 4915-4928.

640. Hoover, R.B. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments / R.B. Hoover, E.V. Pikuta // In: *Polar microbiology: The ecology, biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments.* A.K. Bej, J. Aislabie, R.M. Atlas (Eds.) – Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2010. – P. 115-157.

641. Hou, J. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response / J. Hou, W. Liu, B. Wang [et al.] // *Chemosphere.* – 2015. – V. 138. – P. 592-598.



642. Hu, G. Ultrasonic oil recovery and salt removal from refinery tank bottom sludge / G. Hu, J. Li, R.W. Thring, J. Arocena // J. Environ. Sci. Health. Part A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng. – 2014. – V. 49. – P. 1425-1435.

643. Huang, L. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS / L. Huang, J. Xie, B. Lu [et al.] // Mar. Pollut. Bull. – 2013. – V. 76, № 1-2. – P. 325- 332.

644. Huang, W.M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes / W.M. Huang // Annu. Rev. Genet. – 1996. – V. 30. – P. 79-107.

645. Huang, Y.J. The chronic effects of oil pollution on marine phytoplankton in a subtropical bay, China / Y.J. Huang, Z.B. Jiang, J.N. Zeng [et al.] // Environ. Monit. Assess. – 2011. – V. 176, № 1-4. – P. 517-530.

646. Ibrahim, H.M.M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil-contaminated soil / H.M.M. Ibrahim // Egyptian J. Petrol. – 2018. – In press. –doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.12.005.

647. Icgen, B. Screening and *in situ* monitoring of potential petroleum hydrocarbon degraders in contaminated surface water / B. Icgen, F. Yilmaz // Clean Soil Water. – 2016. – URL: <https://doi.org/10.1002/clen.201600194>.

648. Ichor, T. Biodegradation of total petroleum hydrocarbon by aerobic heterotrophic bacteria isolated from crude oil contaminated brackish waters of Bodo creek / T. Ichor, P.O. Okerentugba, G.C. Okpokwasili // J. Bioremed. Biodegrad. – 2014. – V. 5: 236. – doi: 10.4172/2155-6199.1000236.

649. Idris, J. A preliminary study of biodegradable waste as sorbent material for oil-spill cleanup / J. Idris, G.D. Eyu, A.M. Mansor [et al.] // Sci. World J. – 2014. – ID 638687. – URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/638687>.

650. Igarashi, R.Y. Nitrogen Fixation: The Mechanism of the Mo-dependent nitrogenase / R.Y. Igarashi, L.C. Seefeldt // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2003. – V. 38, № 4. – P. 51-84.

651. Iiyama, K. Phylogenetic analysis of *Paenibacillus popilliae* and its related taxa based on housekeeping genes / K. Iiyama, O. Nishi, H. Mon [et al.] // J. Insect. Biotechnol. Sericol. – 2013. – V. 82, № 1. – P. 1-11.
652. Ijaz, A. Phytoremediation: Recent advances in plant-endophytic synergistic interactions / A. Ijaz, A. Imran, M.A. Haq [et al.] // Plant Soil. – 2015. – V. 405, № 1-2. – P. 179-195.
653. Ijaz, A. Remediation of sewage and industrial effluent using bacterially assisted floating treatment wetlands vegetated with *Typha domingensis* / A. Ijaz, Z. Iqbal, M. Afzal // Water Sci. Technol. – 2016. – V. 74, № 9. – P. 2192-2201.
654. Ikeura, H. Screening of plants for phytoremediation of oil-contaminated soil / H. Ikeura, Y. Kawasaki, E. Kaimi [et al.] // Int. J. Phytoremed. – 2015. – V. 18, № 5. – P. 460-466.
655. Iliev, I. Algal diversity of oil polluted Vertisol / I. Iliev, G. Gacheva, I. Nikova, D. Nedelcheva // Kliment's Days: Proceed. youth sci. conf. – Sofia, 2011. – Second book. – P. 84-87.
656. Iloeje, A.F. Effect of crude oil on permeability properties of the soil / A.F. Iloeje, V. Aniago // Int. J. Trend Sci. Res. Develop. – 2016. – V. 1, № 1. – P. 39-43.
657. Imran, A. *Ochrobactrum ciceri* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum* / A. Imran, F.Y. Hafeez, A. Frühling [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – V. 60, № 7. – P. 1548-1553.
658. Iorhemen, T.O. Membrane bioreactor (MBR) technology for wastewater treatment and reclamation: membrane fouling / O.T. Iorhemen, R.A. Hamza, J.H. Tay // Membranes (Basel). – 2016. – V. 6, № 2: 33. – doi: 10.3390/membranes6020033.
659. Iqbal, M.Z. Effects of motor oil pollution on soil and seedling growth of *Parkinsonia aculeata* L. / M.Z. Iqbal, S. Khursheed, M. Shafiq // Sci. Agri. – 2016. – V. 13, № 3. – P. 130-136.
660. Ivshina, I.B. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko [et al.] // Environ. Sci: Processes & Impacts. – 2015. – V. 17, № 7. – P. 1201-1219.

661. Ivshina, I. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 / I. Ivshina, L. Kostina, A. Krivoruchko [et al.] // *J. Hazard. Mat.* – 2016. – V. 312. – P. 8-17.

662. Iyagba, A.G. Effect of crude oil and biostimulant (bioremediation) on growth extract of maize (*Zea mays* (L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) / A.G. Iyagba, U.S. Offor // *European Sci. J.* – 2014. – V. 10, № 6. – P. 284-291.

663. Izumi, S. Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region / S. Izumi, M., Yamamoto K. Suzuki [et al.] // *J. Fish Dis.* – 2007. – V. 30, № 7. – P. 391-397.

664. Jafari, L. Induction of oxidative stress and anatomical changes by polycyclic aromatic hydrocarbons in *Medicago sativa* L. / L. Jafari, M. Khoshokhan-Mozaffar, E. Vatankhah // *J. Chem. Health Risks.* – 2018. – V. 8, № 1. – P. 51-63.

665. Jampasri, K. Phytoremediation of fuel oil and lead co-contaminated soil by *Chromolaena odorata* in association with *Micrococcus luteus* / K. Jampasri, P. Pokethitiyook, M. Kruatrachue [et al.] // *Int. J. Phytoremed.* – 2016. – V. 8, № 10. – P. 994-1001.

666. Jarboui, R. Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa* / R. Jarboui, H. Baati, F. Fetoui [et al.] // *Environ. Technol.* – 2012. – V. 33, № 8. – P. 951-960.

667. Jebrail, A. Wastewater Treatment Process / A. Jebrail. – Construction Engineering Visamäki, 2016. – 41 p.

668. Jesna, J. Investigation on the effects of hydrocarbon spillage on soil properties / J. Jesna, G. Hari // *Int. J. Engin. Res. Technol.* – 2015. – V. 4, № 10. – P. 136-140.

669. Jiang, Z. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton / Z. Jiang, Y. Huang, X. Xu [et al.] // *Acta Ecologica Sinica.* – 2010. – V. 30, № 1. – P. 8-15.

670. John, R.C. Fate of nitrogen fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol / R.C. John, A.Y. Itah, J.P. Essien, D.I. Ikpe // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2011. – V. 87, № 3. – P. 343-353.

671. Joshi, M.N. Metagenomics of petroleum muck: Revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy / M.N. Joshi, S.V. Dhebar, Sh.V. Dhebar [et al.] // Arch. Microbiol. – 2014. – V. 196, № 8. – P. 531-544.

672. Joshi, P. Screening and isolation of biosurfactant producing bacteria from petroleum contaminated soil / P. Joshi, D. Shekhawat // Euro. J. Exp. Bio. – 2014. – V. 4, № 4. – P. 164-169.

673. Joy, S. Biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated environment / S. Joy, T. Butalia, Sh. Sharma, P.K.S.M. Rahman // In: Biodegradation and bioconversion of hydrocarbons. Part: Environmental footprints and eco-design of products and processes. K. Heimann, O.P. Karthikeyan, S.S. Muthu (Eds.). – Springer: Singapore, 2017a. – P. 259-305.

674. Joy, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments / S. Joy, P.K.S.M. Rahman, S. Sharma // Chem. Engin. J. – 2017b. – V. 317. – P. 232-241.

675. Kafilzadeh, F. Bioremediation of pyrene by isolated bacterial strains from the soil of the landfills in Shiraz, Iran / F. Kafilzadeh, F. Pour, T.Y. Hoshyari, H.N. Azad // Ann. Biol. Res. – 2012. – V. 3, № 1. – P. 486-494.

676. Kahlon, R.S. Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas* / R.S. Kahlon // In: *Pseudomonas: molecular and applied biology*. R.S. Kahlon (Ed.). – Springer: Switzerland, 2016. – P. 343-417.

677. Kämpfer, P. *Ochrobactrum pecoris* sp. nov., isolated from farm animals / P. Kämpfer, B. Huber, H.-J. Busse [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2011. – V. 61, № 9. – P. 2278-2283.

678. Kang, J.W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation / J.W. Kang // *Biotechnol. Lett.* – 2014. – V. 36, № 6. – P. 1129-1139.

679. Kang, Z. Biological treatment of wastewater from heavy oil recovery / Z. Kang // *Petrol. Sci. Technol.* – 2014. V. 32, № 9. – P. 1065-1071.

680. Kapadia, S.G. Current trend and potential for microbial biosurfactants / S.G. Kapadia, B.N. Yagnik // *Asian J. Exp. Biol. Sci.* – 2013. – V. 4, № 1. – P. 1-8.

681. Kasai, H. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria / H. Kasai, K. Watanabe, E. Gasteiger [et al.] // *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* – 1998. – V. 9. – P. 13-21.

682. Kashi, M.H. Biodegradation of the most heavier fraction of crude oil, asphaltene, by *Bacillus toyonensis* BCT-7112 / M.H. Kashi, M.S. Tabatabaee, N.A. Soleimani // *J. Chem. Health Risks.* – 2018. – V. 8, № 1. – P. 65-74.

683. Khan, S. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils / S. Khan, M. Afzal, S. Iqbal, Q.M. Khan // *Chemosphere.* – 2013. – V. 90. – P. 1317-1332.

684. Kidibule, P.E. Isolation and identification of microorganisms from crude oil contaminated soils of Dar es Salaam, Tanzania / P.E. Kidibule, E.M. Sosovele, A.M. Mshandete // *British Biotechnol. J.* – 2014. – V. 4, № 8. – P. 918-931.

685. Kim, O. S. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species / O.S. Kim, Y.J. Cho, K. Lee [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – V. 62, № 3. – P. 716-721.

686. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J. Mol. Evol.* – 1980. – V. 16, № 2. – P. 111-120.

687. Kiraye, M. Bioremediation rate of total petroleum hydrocarbons from contaminated water by *Pseudomonas aeruginosa* case study: lake Albert, Uganda / M. Kiraye, W. John, K. Gabriel // *J. Bioremed. Biodegrad.* – 2016. – V. 7, № 2. – P. 335-339.

688. Kitamura, R.S.A. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil using *Desmodium incanum* DC., *Fabaceae* / R.S.A. Kitamura, L.T. Maranhão // *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. – 2016. – V. 7, № 1. – P. 1-15.

689. Klamerus-Iwan, A. Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use / A. Klamerus-Iwan, E. Błońska, J. Lasota [et al.] // *Water Air Soil Poll.* – 2015. – V. 226, № 11: 389. – DOI: 10.1007/s11270-015-2649-2.

690. Kleindienst, S. Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms / S. Kleindienst, M. Seidel, K. Ziervogel [et al.] // *Proceed. Nation. Acad. Sci.* – 2015. – V. 112, № 48. – P. 14900-14905.

691. Koshlaf, E. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments / E. Koshlaf, A.S. Ball // *AIMS Microbiol.* – 2017. – V. 3, № 1. – P. 25-49.

692. Koul, V. Sphere of influence of indole acid and nitric oxide in bacteria / V. Koul, A. Adholeya, M. Kochar // *J. Basic Microbiol.* – 2015. – V. 55, № 5. – P. 543-553.

693. Kudoyarova, G.R. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots / G.R. Kudoyarova, A.I. Melentiev, E.V. Martynenko [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – V. 83. – P. 285-291.

694. Kumar, V. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using *Pseudomonas* species isolated from petroleum contaminated soil / V. Kumar, S. Singh, A. Manhas [et al.] // *Orient. J. Chem.* – 2014. – V. 30, № 4. – P. 1771-1776.

695. Kuppusamy, S. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions / S. Kuppusamy, P. Thavamani, K. Venkateswarlu [et al.] // *Chemosphere*. – 2017. – V. 168. – P. 944-968.

696. Kurakawa, T. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme / T. Kurakawa, N. Ueda, M. Maekawa [et al.] // *Nature*. – 2007. – V. 445. – P. 652-655.

697. Kuroshima, K.-I. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus* / K.-I. Kuroshima, T. Sakane, R. Takata, A. Yokota // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1996. – V. 46. – P. 76-80.

698. Kuyukina, M.S. Petroleum-contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina, M.K. Serebrennikova [et al.] // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2009. – V. 63, № 4. – P. 427-432.

699. Kwon, S.W. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea / S.W. Kwon, J.S. Kim, I.C. Park [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53, № 1. – P. 21-27.

700. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing / D.J. Lane // In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.). – Chichester: John Wiley and Sons, 1991. – P. 115-177.

701. Langangen, O. The effects of oil spills on marine fish: Implications of spatial variation in natural mortality / O. Langangen, E. Olsen, L.C. Stige [et al.] // *Mar. Pollut. Bull.* – 2017. – V. 119, № 1. – P. 102-109.

702. Lassalle, G. Assessing soil contamination due to oil and gas production using vegetation hyperspectral reflectance / G. Lassalle, A. Credoz, R. Hédacq [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2018. – V. 52, № 4. – P. 1756-1764.

703. Ławniczak, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation / L. Ławniczak, R. Marecik, L. Chrzanowski // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97, № 6. – P. 2327-2339.

704. Lay, W.C.L. From R&D to application: membrane bioreactor technology for water reclamation / W.C.L. Lay, Ch. Lim, Y. Lee [et al.] // *Water Pract. Technol.* – 2017. – V. 12, № 1. – P. 12-24.

705. Lee, J.-S. Transfer of *Bacillus ehimensis* and *Bacillus chitinolyticus* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus ehimensis* comb. nov. and *Paenibacillus chitinolyticus* comb. nov. / J.-S. Lee, Y.-R. Pyun, K.-S. Bae // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – V. 54, № 3. – P. 929-933.

706. Lee, L.-H. Effects of an oil spill on benthic community production and respiration on subtropical intertidal sandflats / L.-H. Lee, H.-J. Lin // *Mar. Poll. Bull.* – 2013. – V. 73, № 1. – P. 291-299.

707. Lee, M. Characterization of novel diesel-degrading strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 isolated from oil-contaminated soil / M. Lee, S.G. Woo, L.N. Ten // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – V. 28, № 5. – P. 2057-2067.

708. Lei, H. Research on the isolation, identification and degradation characteristics of a diesel oil degrading strain / H. Lei, X. Jing, S. Xiaofeng, L. Jingyan // *Advanc. Mater. Res.* – 2013. – V. 641-642. – P. 206-210.

709. Li, S. Utilization of modification polyester non-woven as an affordable sorbent for oil removal / S. Li, X. Wu, L. Cui [et al.] // *Desalination and Water Treatment.* – 2015. – V. 54, № 11. – P. 3054-3060.

710. Li, X. Ozonation of diesel–fuel contaminated sand and the implications for remediation end-points / X. Li, X. Cao, G. Wu [et al.] // *Chemosphere.* – 2014. – V. 109. – P. 71-76.

711. Liang, X. Drivers and applications of integrated clean-up technologies for surfactant-enhanced remediation of environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) / X. Liang, C. Guo, C. Liao [et al.] // *Environ. Poll.* – 2017. – V. 225. – P. 129-140.



712. Liao, Ch. Accumulation of hydrocarbons by Maize (*Zea mays* L.) in remediation of soils contaminated with crude oil / Ch. Liao, W. Xu, G. Lu [et al.] // Int. J. Phytoremed. – 2015. – V. 17, № 3. – P. 693-700.

713. Liao, J.Q. Bacterial community features are shaped by geographic location, physicochemical properties, and oil contamination of soil in main oil fields of China / J.Q. Liao, J. Wang, Y. Huang // Microb. Ecol. – 2015a. – V. 70. – P. 380-389.

714. Liao, J.Q. Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils / J.Q. Liao, J. Wang, D.L. Jiang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015b. – V. 99. – P. 1029-10310.

715. Liao, J. Bacterial community features are shaped by geographic location, physicochemical properties, and oil contamination of soil in main oil fields of China / J. Liao, J. Wang, Y. Huang // Microb. Ecol. – 2015c. – V. 70. – P. 380-389.

716. Lifshits, S.K. Increase in remediation processes of oil-contaminated soils / S.K. Lifshits, Y.S. Glyaznetsova, O.N. Chalaya, I.N. Zueva // Remediation. – 2017. – V. 28. – P. 97-104.

717. Lim, M.W. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – present works and future directions / M.W. Lim, E.V. Lau, P.E. Poh // Mar. Pollut. Bull. – 2016. – V. 109. – P. 14-45.

718. Lima, T.M. Biodegradability of bacterial surfactants / T.M. Lima, L.C. Procopio, F.D. Brandao [et al.] // Biodegradation. – 2011. – V. 22, № 3. – P. 585-592.

719. Limmer, M.A. Phytoremediation removal rates of benzene, toluene, and chlorobenzene / M.A. Limmer, J. Wilson, D. Westenberg [et al.] // Int. J. Phytoremed. – 2018. – V. 20, № 7. – P. 666-674.

720. Lin, M. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil / M. Lin, Y. Liu, W. Chen // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2014. – V. 88. – P. 8-12.

721. Liu, Q. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China / Q. Liu, J. Tang, K. Gao // Sci. Rep. – 2017. – V. 7: 14856. – doi:10.1038/s41598-017-14032-5.

722. Liu, W. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil / W. Liu, J. Hou, Q. Wang [et al.] // Chemosphere. – 2014. – V. 117. – P. 303-308.

723. Liu, Y. Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S / Y. Liu, X. Hu, H. Liu // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2016. – V. 107. – P. 56-61.

724. LPSN bactrio.net. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. – URL: [www.bacterio.net/pseudomonas.html](http://www.bacterio.net/pseudomonas.html).

725. Luo, P. *Vibrio alginolyticus gyrB* sequence analysis and *gyrB*-targeted PCR identification in environmental isolates / P. Luo, C. Hu // Dis. Aquat. Organ. – 2008. – V. 82, № 3. – P. 209-216.

726. Maksimov, I.V. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens / I.V. Maksimov, R.R. Abizgil'dina, L.I. Pusenkova // Appl. Biochem. Microbiol. – 2011. – V. 47, № 4. – P. 333-345.

727. Mao, X. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review / X. Mao, R. Jiang, W. Xiao, J.J. Yu // Hazard. Mater. – 2015. – V. 285. – P. 419-435.

728. Mapelli, F. Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms / F. Mapelli, A. Scoma, G. Michoud [et al.] // Trends Biotechnol. – 2017. – V. 35, № 9. – P. 860-870.

729. Marchand, Ch. Effect of *Medicago sativa* L. and compost on organic and inorganic pollutant removal from a mixed contaminated soil and risk assessment using ecotoxicological tests / Ch. Marchand, W. Hogland, F. Kaczala [et al.] // Int. J. Phytoremed. – 2016. – V. 18, № 11. – P. 1136-1147.

730. Marchant, R. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? / R. Marchant, I.M. Banat // *Biotechnol. Lett.* – 2012. – V. 34, № 9. – P. 1597-1605.

731. Marinescu, M. An assessment of the effects of crude oil pollution on soil properties / M. Marinescu, M. Toti, V. Tanase [et al.] // *Annals. Food Sci. Technol.* – 2010. – V. 11, № 1. – P. 94-99.

732. Marinescu, Mar. The effects of crude oil pollution on physical and chemical characteristics of soil / M. Marinescu, M. Toti, V. Tanase [et al.] // *Res. J. Agricul. Sci.* – 2011. – V. 43, № 3. – P. 125-129.

733. Martins, S.C.S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater / S.C.S. Martins, C.M. Martins, L.M.C.C. Fiúza, S.T. Santaella // *Afric. J. Biotechnol.* – 2013. – V. 12, № 28. – P. 4412-4418.

734. Materac, M. Phytoremediation techniques in wastewater treatment / M. Materac, A. Wyrwicka, E. Sobiecka // *Environ. Biotechnol.* – 2015. – V. 11, № 1. – P. 10-13.

735. Matvyeyeva, O.L. Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation // O.L. Matvyeyeva, O.A. Vasylichenko, O.R. Aliieva // *Int. J. Environ. Bioremed. Biodegrad.* – 2014. – V. 2, № 2. – P. 69-74.

736. Mazumdar, A. Isolation of free living nitrogen fixing bacteria from crude oil contaminated soil / A. Mazumdar, M. Deka // *Int. J. Bio-Technol. Res.* – 2013. – V. 3, № 4. – P. 69-76.

737. Mazumdar, A. Degradation of kerosene hydrocarbon by indigenous diazotrophic bacteria isolated from crude oil contaminated soil / A. Mazumdar, M. Deka, D.J. Hazarika // *Int. J. Bioassays.* – 2015. – V. 4, № 8. – P. 4184-4188.

738. Mbachu, A.E. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading fungi from used (spent) engine oil polluted soil and their use for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation / A.E. Mbachu, E.I. Chukwura, N.A. Mbachu // *Univer. J. Microbiol. Res.* – 2016. – V. 4, № 1. – P. 31-37.

739. Megharaj, M. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective / M. Megharaj, B. Ramakrishnan, K. Venkateswarlu [et al.] // *Environ. Int.* – 2011. – V. 37. – P. 1362-1375.

740. Meintanis, C. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus* / C. Meintanis, K.I. Chalkou, K.A. Kormas [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – V. 46, № 3. – P. 395-401.

741. Mellmann, A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria / A. Mellmann, J. Cloud, T. Maier [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – V. 46, № 6. – P. 1946-1954.

742. Mikesková, H. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective / H. Mikesková, Č. Novotný, K. Svobodová // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – V. 95, № 4. – P. 861-870.

743. Mnif, I. Treatment of diesel- and kerosene-contaminated water by *B. subtilis* SPB1 biosurfactant-producing strain / I. Mnif, S. Ellouze-Chaabouni, Y. Ayedi, D. Ghribi // *Water Environ. Res.* – 2014. – V. 86, № 8. – P. 707-716.

744. Mnif, I. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants / I. Mnif, S. Mnif, R. Sahnoun [et al.] // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2015. – V. 22, № 19. – P. 14852-14861.

745. Mnif, I. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium / I. Mnif, R. Sahnoun, S. Ellouze-Chaabouni, D. Ghribi // *Process Saf. Environ. Protec.* – 2017. – V. 109. – P. 72-81.

746. Monteiro, S.A. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE614 / S.A. Monteiro, G.L. Sasaki, L.M. de Souza [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2007. – V. 147. – P. 1-13.

747. Mostafa, A.A. Bitreatment of industrial oil waste water by free and immobilized *Rhodotorula mucilaginosa* 2 and *Candida utilis* / A.A. Mostafa, A.M. Abou-Zeid, E.H.F.A. El-Zaher, D.M. Arif // *Advan. Biol. Res.* – 2015. – V. 9, № 4. – P. 271-280.

748. Moubasher, H.A. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms / H.A. Moubasher, A.K. Hegazy, N.H. Mohamed [et al.] // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2015. – V. 98. – P. 113-120.

749. Mulet, M. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples / M. Mulet, A. Bennasar, J. Lalucat, E. García-Valdes // *Mol. Cell. Probes.* – 2009. – V. 23, № 3-4. – P. 140-147.

750. Muratova, A. Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil: from laboratory to field experience // A. Muratova, L. Panchenco, Y. Dubrovskaya // In: *Trends in bioremediation and phytoremediation*. G. Plaza (Ed.). – Kerala: Research Signpost, 2010. – P. 403-427.

751. Muratova, A. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa* / A. Muratova, E. Dubrovskaya, S. Golubev [et al.] // *J. Plant. Physiol.* – 2015. – V. 188. – P. 1–8.

752. Muratova, A.Yu. New strains of oil-degrading microorganisms for treating contaminated soils and wastes / A.Yu. Muratova, L.V. Panchenko, D.V. Semina [et al.] // *IOP Conf. Series: Earth and Environ. Sci.* – 2018. – 107: 012066. – doi :10.1088/1755-1315/107/1/012066.

753. Murawski, S.A. Prevalence of external skin lesions and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in Gulf of Mexico fishes, post Deepwater Horizon / S.A. Murawski, W.T. Hogarth, G.M. Peebles, L. Barbeiri // *Transactions of the American Fisheries Society.* – 2014. – V. 143, № 4. – P. 1084-1097.

754. Murygina, V. Application preparation «Rhoder» for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic / V. Murygina, M. Markarova, S. Kalyuzhnyi // *Environ. Int.* – 2005. – V. 31. – P. 163-166.

755. Mutamim, N.S.A. Membrane bioreactor: Applications and limitations in treating high strength industrial wastewater / N.S.A. Mutamim, Z.Z. Noor, M.A.A. Hassan [et al.] // Chem. Engin. J. – 2013. – V. 225, № 1. – P. 109-119.

756. Naowasarn, S. Bioremediation of oil-contaminated soil using chicken manure / S. Naowasarn, S. Leungprasert // Soil Sediment Contamination: An Int. J. – 2016. – V. 25, № 7. – P. 739-756.

757. Naumova, R.P. Diazotrophs originated from petrochemical sludge as a potential resource for waste remediation / R.P. Naumova, T.V. Grigoryeva, A.A. Rizvanov [et al.] // World Appl. Sci. J. – 2009. – V. 6, № 2. – P. 154-157.

758. Nazina, T.N. Functional and phylogenetic microbial diversity in formation waters of a low-temperature carbonate petroleum reservoir / T.N. Nazina, N.M. Shestakova, N.K. Pavlova [et al.] // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2013. – V. 81. – P. 71-81.

759. Nemeč, A. *Acinetobacter colistiniresistens* sp. nov. (formerly genomic species 13 *sensu* Bouvet and Jeanjean and genomic species 14 *sensu* Tjernberg and Ursing), isolated from human infections and characterized by intrinsic resistance to polymyxins / A. Nemeč, L. Radolfova-Krizova, M. Maixnerova, O. Sedo // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2017. – V. 67, № 5. – P. 2134-2141.

760. Nicdao, M.A.C. Two strains of *Gordonia terrae* isolated from used engine oil-contaminated soil utilize short- to long-chain n-alkanes / M.A.C. Nicdao, W.L. Rivera // Philippine Sci. Lett. – 2012. – V. 5, № 2. – P.199-208.

761. Nikitha, T. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment / T. Nikitha, M. Satyaprakash, S. Satya Vani [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. – 2017. – V. 6, № 4. – P. 1627-1639.

762. Noori, R. The effect of oil pollution on *Lathyrus sativus* and *Lens culinaris* with potential of phytoremediation / R. Noori, B. Lorestani, N. Yousefi, N. Kolahchi // J. Chem. Health Risks. – 2012. – V. 2, № 3. – P. 17-20.

763. Noori, A. *Leucanthemum vulgare* Lam. crude oil phytoremediation / A. Noori, H.Z. Maivan, E. Alaie, L.A. Newman // Int. J. Phytoremed. – 2015. – DOI: 10.1080/15226514.2015.1045122.

764. Nrior, R.R. Bioremediation of crude oil contaminated Marshland muddy soil by bioaugmentation approach using *Candida tropicalis* and *Penicillium chrysogenum* / R.R. Nrior, N.F. Onwuka / J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. – 2017. – V. 11, № 10. – P. 57-64.

765. Nwite, J.N. Effect of different levels of spent engine oil on soil porperties, grain yield of maize and its heavy metal uptake in Abakaliki, Southeastern Nigeria / J.N. Nwite, M. Alu, // J. Soil Sci. Environ. Manag. – 2015. – V. 5, № 4. – P. 44-51.

766. Obi, L.U. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria / L.U. Obi, H.I. Atagana, R.A. Adeleke // Springerplus. – 2016. – V. 5, № 1: 1946. – doi: 10.1186/s40064-016-3617-z.

767. Odokuma, L.O. Nitrogen fixing bacteria enhanced bioremediation of a crude oil polluted soil / L.O. Odokuma, M.N. Inor // Global J. Pure Appl. Sci. – 2002. – V. 8, № 4. – P. 455-470.

768. Ogugbue, Ch.J. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in polluted soil augmented with nitrogen-fixing bacteria / Ch.J. Ogugbue, L. Solomon, I.N. Olali // Life Sci. J. – 2017. – V. 14, № 1. – P. 82-91.

769. Oguntoyinbo, F.A. *Halomonas nigrificans* sp. nov., isolated from cheese /F.A. Oguntoyinbo, M. Cnockaert, G.-S. Cho et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – V. 68, № 1. – P. 371-376.

770. Ohadi, M. Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site / M. Ohadi, Gh. Dehghannoudeh, M. Shakibaie [et al.] // Biocatalys. Agricultur. Biotechnol. – 2017. – V. 12. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.007>.

771. Olukunle, O.F. Indigenous bacteria and fungi responsible for bioremediation of oil-polluted soils in Ondo soils in Ondo State, Nigeria / O.F. Olukunle, B. Boboye, O.T. Ikuomola, // Environ. Tropica. – 2012. – V. 8. – P. 138-148.

772. Olukunle, O.F. Biodegradation of crude-oil by fungi isolated from cow dung contaminated soils / O.F. Olukunle, T.S. Oyegoke // Nigerian J. Biotech. – 2016. – V. 31. – P. 46-58.

773. Oluremi, J.R. Compaction characteristics of oil contaminated residual soil / J.R. Oluremi, A.P. Adewuyi, A.A. Sanni // J. Engin. Technol. – 2015. – V. 6, № 2. – P. 75-87.

774. Omotayo, A.E. Hydrocarbon degradation by free-living nitrogen-fixing bacteria / A.E. Omotayo, L.O. Egbomeade, O. Taiwo [et al.] // J. Sci. Res. Dev. – 2013. – V. 14. – P. 75-84.

775. Onur, G. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability / G. Onur, F. Yilmaz, B. Icen // J. Surfactants Detergents. – 2015. – V. 18, № 4. – P. 707-717.

776. Onwuka, J.Ch. Kinetic studies of surface modification of lignocellulosic *Delonix regia* pods as sorbent for crude oil spill in water / J.Ch. Onwuka, E.B. Agbaji, V.O. Ajibola, F.G. Okibe // J. Appl. Res. Technol. – 2016. – V. 14, № 6. – P. 415-424.

777. Orellana, R. Assessing technical and economic feasibility of complete bioremediation for soils chronically polluted with petroleum hydrocarbons / R. Orellana, A. Cumsille, C. Rojas [et al.] // J. Bioremed. Biodegrad. – 2017. – V. 8: 396. – doi: 10.4172/2155-6199.1000396.

778. Oribayo, O. Hydrophobic surface modification of FMSS and its application as effective sorbents for oil spill clean - ups and recovery / O. Oribayo, Q. Pan, X. Feng, G.L. Rempel // AIChE journal. – 2017. – V. 63, № 9. – URL: <https://doi.org/10.1002/aic.15767>.

779. Osuagwu, A.N. Effect of crude oil pollution on growth parameters, chlorophyll content and bulbils yield in air potato (*Dioscorea bulbifera* L.) / A.N. Osuagwu, A.U. Okigbo, I.A. Ekpo [et al.] // Int. J. Appl. Sci. Technol. – 2013. – V. 3, № 4. – P. 37-42.



780. Owen, R.J. Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers / R.J. Owen, L.R. Hill, S.P. Lapage // *Biopolimers*. – 1969. – V. 7, № 4. – P. 503-516.

781. Ozhan, K. How were phytoplankton affected by the Deepwater Horizon oil spill? / K. Ozhan, M.L. Parsons, S. Bargu // *BioScience*. – 2014. – V. 64, № 9. – P. 829-836.

782. Özen, A.I. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? / A.I. Özen, D.W. Ussery // *Microb. Ecol.* – 2012. – V. 63, № 2. – P. 239-248.

783. Palleroni, N.J. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894 / N.J. Palleroni // In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D.R. Boone, R.W. Brenner, J.T. Staley (Eds.). New York: Springer, 2005. – V. 2. – Part B. – P. 323-379.

784. Pandey, P. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: A review / P. Pandey, H. Pathak, S. Dave // *Res. J. Environ. Toxicol.* – 2016. – V. 10, № 1. – P. 1-15.

785. Panhwar, Q.A. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soil and their beneficial effects on rice growth / Q.A. Panhwar, U.A. Naher, S. Jusop [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, № 10. – e97241. – doi: 10.1371/journal.pone.0097241.

786. Pascual, J. *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejada, Almirajara and Alhama Natural Park, Granada, Spain / J. Pascual, M. García-López, G.F. Bills, O. Genilloud // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2015. – V. 65, № 2. – P. 625-632.

787. Passet, V. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. / V. Passet, S. Brisse // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2018. – V. 68, № 1. – P. 377-381

788. Pasumarthi, R. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast / R. Pasumarthi, S. Chandrasekaran, S. Mutnuri // *Mar. Poll. Bull.* – 2013. – V. 15, № 76(1-2). – P. 276-82.

789. Pattern, C.L. Role *Pseudomonas putida* indolacetic acid in development of the host plant root system / C.L. Pattern, B.R. Glick // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V.67. – P. 3795-3801.

790. Patel, A. A sustainable approach to clean contaminated land using terrestrial grasses / A. Patel, D. Patra // In: Phytoremediation potential of bioenergy plants. K. Baudh, B. Singh, J. Korstad (Eds.). – Springer, Singapore, 2017. – P. 305-331.

791. Pérez-Vargas, J. Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria / J. Pérez-Vargas, S.E. Viguera-Carmona, E. Zamudio-Moreno [et al.] // Rev. Int. Contam. Ambie. – 2017. – V. 33. – P. 105-114.

792. Perfumo, A. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry / A. Perfumo, I. Rancich, I.M. Banat // In: Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology. Sen R. (Ed.). – 2010. – V. 672. – P. 135-145.

793. Pirog, T. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium / T. Pirog, A. Sofilkanych, A. Konon [et al.] // Food Bioprod. Proces. – 2013a. – V. 91, № 2. – P. 149-157.

794. Pirog, T.P. Effect of growth factors and some microelements on biosurfactant synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / Pirog T.P., Shevchuk T.A., Mashchenko [et al.] // Microbiol. Zh. – 2013b. – V. 75, № 5. – P. 19-27. (In Russian).

795. Pirog, T.P. Microbial surfactants in environmental technologies / T.P. Pirog, A.D. Konon, I.V. Savenko // Biotechnol. Acta. – 2015a. – V. 8, № 4. – P. 21-39.

796. Pirog, T.P. Improvement of the technology for surfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 / T.P. Pirog, A.D. Konon // Biotechnol. Acta. – 2015b. – V. 8, № 5. – P. 27-38.

797. Pirog, T. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac - 5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on

byproduct of biodiesel production / T. Pirog, M. Shulyakova, A. Sofilkanych, T. Shevchuk, O. Mashchenko // Food Bioprod. Proces. – 2015c. – V. 93, № 1. – P. 11-18.

798. Pirog, T.P. Industrial waste bioconversion into surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 / T.P. Pirog, M.O. Shulyakova, L.V. Nikituk [et al.] // Biotechnol. acta. – 2017. – V. 10, № 2. – P. 22-33.

799. Pirog T.P. Intensification of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants synthesis on waste sunflower oil / T.P. Pirog, L.V. Nikituk, S.I. Antonuk [et al.] // Mikrobiol. Zh. 2018. V. 80, № 1. P. 15-26. (In Russian).

800. Pizarro-Tobías, P. Restoration of a mediterranean forest after a fire: bioremediation and rhizoremediation field-scale trial / P. Pizarro-Tobías, M. Fernández, J.L. Niqui [et al.] // Microb. Biotechnol. – 2015. – V. 8, № 1. – P. 77-92.

801. Płociniczak, T. Improvement of phytoremediation of an aged petroleum hydrocarbon-contaminated soil by *Rhodococcus erythropolis* CD 106 strain / T. Płociniczak, E. Fic, M. Pacwa-Płociniczak, M. Pawlik, Z. Piotrowska-Seget // Int. J. Phytoremed. – 2017. – V. 19, № 7. – P. 614-620.

802. Poi, G. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium / G. Poi, A. Aburto-Medina, P.C. Mok [et al.] // Ecol. Engin. – 2017. – V. 102. – P. 64-71.

803. Prabhakaran, P. Bioremediation of crude oil in synthetic mineral salts medium enriched with aerobic bacterial consortium / P. Prabhakaran, A. Sureshbabu, S. Rajakumar, P.M. Ayyasamy // Int. J. Innov. Res. Sci. Engin. Technol. – 2014. – V. 3, № 2. – P. 9236-9242.

804. Prince, R.C. Prokaryotic hydrocarbon degraders / R.C. Prince, A. Gramain, T.J. McGenity // In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. K.N. Timmis (Ed.). Springer, Berlin, 2010. – P. 1671-1691.

805. *Pseudomonas: Genomics and molecular biology* / P. Cornelis (Ed.). – Caister Academic Press, 2008. – 244 p.

806. Qi, Y.B. Removal capacities of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a newly isolated strain from oilfield produced water / Y.B. Qi, C.Y. Wang, C.Y. Lu [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2017. – V. 14, № 2: – e215. – doi: 10.3390/ijerph14020215.

807. Quezada, M. The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems / M. Quezada, G. Buitrón, I. Moreno-Andrade [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – V. 266, № 1. – P. 75-82.

808. Rahman, A.Z. Influence of oil contamination on geotechnical properties of basaltic residual soil / A.Z. Rahman, U. Hamzah, M.R. Taha [et al.] // American J. Appl. Sci. – 2010. – V. 7, № 7. – P. 954-961.

809. Ramasamy, S. Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater / S. Ramasamy, P. Mathiyalagan, P. Chandran // Petrol. Sci. – 2014. – V. 11, № 3. – P. 439-445.

810. Ramos, E. *Pseudomonas punonensis* sp. nov., a novel species isolated from grasses in Puno region (Peru) / E. Ramos, M. H. Ramírez-Bahena, A. Valverde [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – V. 63. – P. 1834-1839.

811. Raymond, R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons / R.L. Raymond // Develop. Industr. Microbiol. – 1961. – V. 2, №. 1. – P. 23-32.

812. Richardson, V.P.S. Physico-chemical characteristic of a petroleum contaminated soil from the spill site of Jaffna District / V.P.S. Richardson, G.B.B. Herath, C.S. Kalpage, K.B.S.N. Jinadasa // Conf. Structural Engin. Construc. Manag (CSECM): Proceed. 6<sup>th</sup> Int. Conf. – Kandy, Sri Lanka, 2015. – P. 61-65.

813. Rinanti, A. Petroleum residues degradation in laboratory-scale by rhizosphere bacteria isolated from the mangrove ecosystem / A. Rinanti, I.J. Nainggolan // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2018. – 106: 012100. – doi: 10.1088/1755-1315/106/1/012100.

814. Rivas, R. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera* / R. Rivas, P. García-Fraile, P.F. Mateos [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2007. – V. 44, № 2. – P. 181-187.

815. Robertson, L.W. PCBs: Recent advances in environmental toxicology and health effects / L.W. Robertson, L.G. Hansen. – University press of Kentucky, 2015. – 496 p.

816. Rocha e Silva, F.C.P. Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions / F.C.P. Rocha e Silva, B.A.C. Roque, N.M.P. Rocha e Silva [et al.] // AMB Express. – 2017. – V. 7: 202. – URL: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0499-6>.

817. Rogers, J.S. A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleonide sequences / J.S. Rogers, D.L. Swofford // Syst. Biol. – 1998. – V. 47, № 1. – P. 77-89.

818. Romero-Lopez, J. Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination / J. Romero-Lopez, V. Lopez-Rodas, E. Costas // Aquatic Toxicol. – 2012. – V. 124-125. – P. 227-237.

819. Ron, E.Z. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea / E.Z. Ron, E. Rosenberg // Curr. Opin. Biotechnol. – 2014. – V. 27. – P. 191-194.

820. Roy, A.S. Bioremediation of crude oil contaminated tea plantation soil using two *Pseudomonas aeruginosa* strains AS03 and NA108 / A.S. Roy, R. Yenn, A.K. Singh [et al.] // Afric. J. Biotechnol. – 2013. – V. 12, № 19. – P. 2600-2610.

821. Roy, A.S. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study // A.S. Roy, R. Baruah, M. Borah [et al.] // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2014. – V. 94, № 2. – P. 79-89.

822. Rusin, M. The effect of petroleum-derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba* L. / M. Rusin, J. Gospodarek, A. Nadgórska-Socha // Pol. J. Environ. Stud. – 2015. – V. 24, № 5. – P. 2157-2166.

823. Sachdev, D.P. Biosurfactants in agriculture / D.P. Sachdev, S.S. Cameotra // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – V. 97, № 3. – P. 1005-1016.

824. Saitou, N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Mol. Biol. Evol. – 1987. – V. 4, № 4. – P. 406-425.

825. Salam, L.B. Metabolism of waste engine oil by *Pseudomonas* species / L.B. Salam // 3 Biotech. – 2016. – V. 6, № 1: 98. – URL: <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs13205-016-0419-5>.

826. Santisi, S. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium / S. Santisi, S. Cappello, M. Catalfamo [et al.] // Braz. J. Microbiol. – 2015. – V. 46, № 2. – P. 377-387.

827. Santos, D.K.F. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor / D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna [et al.] // J. Petrol. Sci. Engin. – 2013. – V. 105. – P. 43-50.

828. Santos, D.K.F. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century / D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – V. 17, № 3: 401. – doi: 10.3390/ijms17030401.

829. Santos, D.K.F. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product / D.K.F. Santos, A.H.M. Resende, D.G. de Almeida [et al.] // Front Microbiol. – 2017. – V. 8: 767. – URL: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2017.00767>.

830. Sarubbo, L.A. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants / L.A. Sarubbo, R.B. Rocha Júnior, J.M. Luna [et al.] // Chem. Ecol. – 2015. – V. 31. – P. 707-723.

831. Saum, L. Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil / L. Saum, M.B. Jiménez, D. Crowley // Int. J. Phytoremed. – 2018. – V. 20, № 1. – P. 54-60.

832. Shah, N. Biosurfactant: types, detection methods, importance and applications / N. Shah, R. Nikam, S. Gaikwad [et al.] // Indian J. Microbiol. Res. – 2016. – V. 3, № 1. – P. 5-10.

833. Shahsavari, E. Phytoremediation of PCBs and PAHs by grasses: a critical perspective / E. Shahsavari, A. Aburto-Medina, M. Taha, A.S. Ball / In: Phytoremediation. A. Ansari, S. Gill, R. Gill, G. Lanza, L. Newman (Eds.). – Springer, Cham, 2016. – P. 3-19.

834. Shankar, S. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils / S. Shankar, C. Kansrajh, M.G. Dinesh [et al.] // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2014. – V. 11, № 2. – P. 367-376.

835. Sharma, R. Biosurfactant-aided bioprocessing: industrial applications and environmental impact / R. Sharma, H.S. Oberoi // In: Recent advances in applied microbiology. P. Shukla (Ed.). – Springer: Singapore, 2017. – P. 55-88.

836. Sharma, Sh. *Pseudomonas* in Biodegradation / Sh. Sharma, H. Pathak // Int. J. Pure App. Biosci. – 2014. – V. 2, № 1. – P. 213-222.

837. Shtangeeva, I. Potential of wheat (*Triticum aestivum* L.) and pea (*Pisum sativum*) for remediation of soils contaminated with bromides and PAHs / I. Shtangeeva, P. Perämäki, M. Niemelä [et al.] // Int. J. Phytoremed. – 2018. – V. 20, № 6. – P. 560-566.

838. Shumin, Y. Screening and identification of halotolerant yeast for hydrocarbon degrading and its properties studies / Y. Shumin, N. Na, X. Zhaoyanga, T. Jinglia // Afric. J. Microbiol. Res. – 2012. – V. 6, № 8. – P. 1819-1828.

839. Silva, F.S. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills / R. de Cássia, F.S. Silva, D.G. Almeida [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – V. 15. – P. 12523-12542.

840. Silva-Castro, G.A. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments / G.A. Silva-Castro, I. Uad, A. Rodríguez-Calvo [et al.] // Environ. Res. – 2015. – V. 137. – P. 49-58.

841. Singha, L.P. Glutathione and glutathione-S-transferase activity in *Jatropha curcas* in association with pyrene degrader *Pseudomonas*

*aeruginosa* PDB1 in rhizosphere, for alleviation of stress induced by polyaromatic hydrocarbon for effective rhizoremediation / L.P. Singha, P. Pandey // *Ecol. Engin.* – 2017. – V. 102. – P. 422-432.

842. Singhal, N. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis / N. Singhal, M. Kumar, P.K. Kanaujia, J.S. Viridi // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6: 791. – doi: 10.3389/fmicb.2015.00791.

843. Siunova, T.V. Impact of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas* in phytoremediation process / T.V. Siunova, T.O. Anokhina, O.I. Sizova [et al.] // In: *Handbook of Phytoremediation*. I.A. Golubev (Ed.). – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. – Ch. 17. – P. 551-572.

844. Soberon-Chavez, G. Biosurfactants: a general overview / G. Soberon-Chavez // In: *Biosurfactants*. G. Soberon-Chavez (Ed.). – Springer-Verlag: Berlin, 2011. – P. 1-11.

845. Song, B. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments / B. Song, N.J. Palleroni, M.M. Häggblom // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, № 8. – P. 3446-3453.

846. Sorkhoh, N.A. Soil bacteria with the combined potential for oil utilization, nitrogen fixation, and mercury resistance / N.A. Sorkhoh, N. Ali, N. Dashti [et al.] // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2010. – V. 64, № 3. – P. 226-231.

847. Stackebrandt, E. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology / E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G.M. Garrity [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52, № 3. – P. 1043-1047.

848. Starostin, K.V. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach / K.V. Starostin, E.A. Demidov, A.B. Bryanskaya [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5: 16989. – URL: <http://www.nature.com.zhongjivip.net/articles/srep16989>.



849. Sudan, S.K. *Pseudomonas fluvialis* sp. nov., a novel member of the genus *Pseudomonas* isolated from the river Ganges, India / S.K. Sudan, D. Pal, Bh. Bisht [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – V. 68, № 1. – P. 402-408.

850. Suja, F. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations / F. Suja, F. Rahim, M.R. Taha [et al.] // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2014. – V. 90. – P. 115-122.

851. Sun, W. Microbial communities inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China: Implications for active petroleum-degrading capacity / W. Sun, Y. Dong, P. Gao [et al.] // J. Microbiol. – 2015. – V. 53, № 6. – P. 371-378.

852. Sutton, M.A. The European nitrogen assessment / M.A. Sutton, C. Howard, J.W. Erisman [et al.]. – Cambridge University Press, 2011. – 612 p.

853. Suzuki, M. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. / M. Suzuki, Y. Nakagawa, S. Harayama, S. Yamamoto // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51, № 5. – P. 1639-1652.

854. Szulc, A. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies / A. Szulc, D. Ambrożewicz, M. Sydow [et al.] // J. Environ. Manag. – 2014. – V. 132. – P. 121-128.

855. Taheria, M. Phytoremediation modeling in soil contaminated by oil-hydrocarbon under salinity stress by eucalyptus (A comparative study) / M. Taheria, B. Motesharezadeha, A.A. Zolfagharib, I. Javadzarrin // Computers and Electronics in Agriculture. – 2018. – V. 150. – P. 162-169.

856. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Mol. Biol. Evol.* – 1993. – V. 10, № 3. – P. 512-526.

857. Tamura, K. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – V. 28, № 10. – P. 2731-2739.

858. Tatano, F. Lab-scale treatability tests for the thermal desorption of hydrocarbon-contaminated soils / F. Tatano, F. Felici, F. Mangani // *Soil Sediment. Contam. Int. J.* – 2013. – V. 22. – P. 433-456.

859. Tayeb, L. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates / L. Tayeb, E. Ageron, F. Grimont, P.A.D. Grimont // *Res. Microbiol.* – 2005. – V. 156, № 5-6. – P. 763-773.

860. Teli, M.D. Application of modified coir fiber as eco-friendly oil sorbent / M.D. Teli, S.P. Valia // *J. Fashion Technol. Textile Engin.* – 2013. – V. 1, № 1. – doi:10.4172/2329-9568.1000103.

861. Teramoto, M. The potential of *Cycloclasticus* and *Altererythrobacter* strains for use in bioremediation of petroleum-aromatic-contaminated tropical marine environments / M. Teramoto, M. Suzuki, A. Hatmanti, S. Harayama // *J. Biosci. Bioengin.* – 2010. – V. 110, № 1. – P. 48-52.

862. Thavasi, R. Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum* / R. Thavasi, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian, I.M. Banat // *Res. J. Microbiol.* – 2006. – V. 1, № 5. – P. 401-408.

863. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. A. Balows (Ed.). – Berlin, New York: Springer-Verlag, 1992. – V. 1-4.

864. Thibodeaux, L.J. Marine oil fate: knowledge gaps, basic research, and development needs; a perspective based on the Deepwater Horizon spill / L.J. Thibodeaux, K.T. Valsaraj, V.T. John [et al.] // *Environ. Engin. Sci.* – 2011. – V. 28, № 2. – P. 87-93.

865. Thomé, A. Bioventing in a residual clayey soil contaminated with a blend of biodiesel and diesel oil. / A. Thomé, C. Reginatto, I. Cecchin, L.M. Colla // J. Environ. Engin. – 2014. – V. 140, № 11. – URL: [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000863](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000863).

866. Thompson, J.D. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools / J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak [et al.] // Nucleic. Acids. Res. – 1997. – V. 25, № 24. – P. 4876-4882.

867. Timilsina, S. *Pseudomonas floridensis* sp. nov., a bacterial pathogen isolated from tomato / S. Timilsina, G. V. Minsavage, J. Preston [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – V. 68, № 1. – P. 64-70.

868. Tindall, B.J. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes / B.J. Tindall, R. Rosselló-Mora, H.J. Busse [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – V. 60, № 1. – P. 249-266.

869. Tirado-Torres, D. Phylogeny and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation potential of bacteria isolated from crude oil-contaminated site / D. Tirado-Torres, O. Acevedo-Sandoval, B.R. Rodríguez-Pastrana, M. Gayosso-Canales // J. Environ. Sci. Health. Part A. Tox. Hazard Subst. Environ. Engin. – 2017. – V. 52, № 9. – [doi.org/10.1080/10934529.2017.1316170](http://doi.org/10.1080/10934529.2017.1316170).

870. Toseland, A. The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism / A. Toseland, S.J. Daines, J.R. Clark [et al.] // Nat. Clim. Change. – 2013. – V. 3, № 11. – P. 979-984.

871. Trujillo, M.E. Nodulation of *Lupinus* by strains of the new species *Ochrobactrum lupini* sp. nov. / M.E. Trujillo, A. Willems, A. Abril [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71, № 3. – P. 1318-1327.

872. Tsuru, T. Membrane Reactors / T. Tsuru // Access Sci. – 2012. – URL: <https://doi.org/10.1036/1097-8542.YB120346>.

873. Tyc, O. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. Review / O. Tyc, C. Song, J.S. Dickschat [et al.] // Trends microbiol. – 2017. – V. 25, № 4. – P. 280-292.

874. Udgire, M. Enrichment, isolation and identification of hydrocarbon degrading bacteria / M. Udgire, N. Shah, M. Jadhav // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. – 2015. – V. 4, № 6. – P. 708-713.

875. Varjani, S.J. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Bioresour. Technol. – 2016a. – V. 221. – P. 510-516.

876. Varjani, S.J. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Bioresour. Technol. – 2016b. – V. 222. – P. 195-201.

877. Varjani, S.J. Remediation processes for petroleum oil polluted soil / S.J. Varjani // Indian J. Biotechnol. – 2017a. – V. 16. – P. 157-163.

878. Varjani, S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons / S.J. Varjani // Bioresour. Technol. – 2017b. – V. 223. – P. 277-286.

879. Varjani, S.J. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2017a. – V. 120. – P. 71-83.

880. Varjani, S.J. Crude oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Influence of process parameters / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Indian J. Experiment. Biol. – 2017b. – V. 5, № 5. – P. 493-497.

881. Varjani, S.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons from petroleum oil industry activities: effect on human health and their biodegradation / S. Varjani, E. Gnansounou, B. Gurunathan [et al.] // In: Waste bioremediation. Energy, environment and sustainability. – Springer, Singapore, 2018. – P. 185-199.

882. Varvaresou, A. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals / A. Varvaresou, K. Iakovou // Let. Appl. Microbiol. – 2015. – V. 61, № 3. – P. 214-223.

883. Vignesh, R. Isolation identification and characterization of potential oil degrading bacteria from oil contaminated sites / R.Vignesh, A. Arularasan, V. Gandhiraj, R. Charu Deepika // Int. Res. J. Engin. Technol. – 2016. – V. 3, № 4. – P. 2503-2508.

884. Vinothini, C. Biodegradation of petroleum and crude oil by *Pseudomonas putida* and *Bacillus cereus* / C. Vinothini, S. Sudhakar, R. Ravikumar // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – V. 4, № 1. – P. 318-329.

885. Vodyanitskii, Y.N. Promising approaches to the purification of soils and groundwater from hydrocarbons (A review) / Y.N. Vodyanitskii, S.Y. Trofimov, S.A. Shoba // Eurasian Soil Sci. – 2016. – V. 49. – P. 705-713.

886. Walzer, G. The Acinetobacter outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier / G. Walzer, E. Rozenberg, E.Z. Ron // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8, № 6. – P. 1026-1032.

887. Wang, L.T. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group / L.T. Wang, F.L. Lee, C.J. Tai, H. Kasai // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57, № 8. – P. 1846-1850.

888. Wang, Sh. The harm of petroleum-polluted soil and its remediation research / Sh. Wang, Y. Xu, Zh. Lin [et al.] // AIP Conf. Proceed. – 2017. – 1864: 020222. – doi: 10.1063/1.4993039.

889. Wang, Y. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China / Y. Wang, J. Feng, Q. Lin [et al.] // Chin. Geogr. Sci. – 2013. – V. 23, № 6. – P. 708-715.

890. Wang, Zh.-Y. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms / Zh.-Y. Wang, Y. Xu, H.-Y. Wang [et al.] // Pedosphere. – 2012. – V. 22, № 5. – P. 717-725.

891. Wasi, S. Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review / S. Wasi, S. Tabrez, M. Ahmad // Environ. Monit. Assess. – 2013. – V. 185, № 10. – P. 8147-8155.

892. Wayne, L.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics / L.G. Wayne, D.J. Brenner, R.R. Colwell [et al.] // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1987. – V. 37. – P. 463-464.

893. Welker, M. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology / M. Welker, E.R.B. Moore // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2011. – V. 34, № 1. – P. 2-11.

894. Weng, F.Y. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species / F.Y. Weng, C.S. Chiou, P.H.P. Lin, S.S. Yang // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – V. 107, № 2. – P. 452-464.

895. Willems, A. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains / A. Willems, F. Doignon-Bourcier, J. Goris // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – V. 51, № 4. – P. 1315-1322.

896. Willumsen, P.A. Screening of bacteria, isolated from contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers / P.A. Willumsen, U. Karlson // *Biodegradation.* – 1997. – № 7. – P. 415-423.

897. Wolińska, A. Biological activity of autochthonic bacterial community in oil-contaminated soil / A. Wolińska, A. Kuźniar, A. Szafranek-Nakonieczna [et al.] // *Water Air Soil Poll.* – 2016. – V. 227: 130. – doi: 10.1007/s11270-016-2825-z.

898. Woo, S.G. *Ochrobactrum daejeonense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant / S.G. Woo, L.N. Ten, J. Park, M. Lee // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2011. – V. 61, № 11. – P. 2690-2696.

899. Wu, J.G. A *gyrB*-targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus mucilaginosus* / J.G. Wu, J.F. Wang, X.H. Zhang [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 87, № 2. – P. 739-747.

900. Wu, M. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil / M. Wu, W.A. Dick, W. Li [et al.] // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2016. – V. 107. – P. 158-164.

901. Xiao, Y.P. *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor / Y.P. Xiao, W. Hui, Q. Wang [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – V. 59, № 10. – P. 2594-2598.

902. Xu, J. Bioremediation of crude oil contaminated soil by petroleum-degrading active bacteria / J. Xu // In: Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites. L. Romero-Zerón (Ed.). – Publisher InTech, 2012. – P. 207-244.

903. Xu, Y. Microbial remediation of aromatics-contaminated soil / Y. Xu, N.Y. Zhou // Front. Environ. Sci. Eng. – 2017. – V. 11, № 2. – P. 1-9.

904. Xue, J. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review / J. Xue, Y. Yu, Y. Bai [et al.] // Curr. Microbiol. – 2015. – V. 71, № 2. – P. 220-228.

905. Yadav, A. Phytoremediation and phytotechnologies / A. Yadav, N. Batra, A. Sharma // Int. J. Pure App. Biosci. – 2016. – V. 4, № 2. – P. 327-331.

906. Yamamoto, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains / S. Yamamoto, S. Harayama // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 3. – P. 1104-1109.

907. Yamamoto, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes / S. Yamamoto, S. Harayama // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1998. – V. 48, № 3. – P. 813-819.

908. Yang, Ch. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus* / Ch. Yang, Zh.B. Guo, Z.M. Du [et al.] // Biomed. Environ. Sci. – 2012. – V. 25, № 6. – P. 711-717.

909. Yoon, S.-H. Membrane bioreactor processes: principles and applications / S.-H. Yoon. – CRC Press, 2015. – 452 p.

910. Yuniati, M.D. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review / M.D. Yuniati // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2018. – 118: 012063. – doi :10.1088/1755-1315/118/1/012063.

911. Zaki, M.S. Bioremediation of contaminants / M.S. Zaki, O.M. Fawzi // J. Life Sci. – 2013. – V. 10, № 1. – P. 3329-3332.

912. Zamani, S. Evaluation the growth potential of artichoke (*Synara scolymus* L.) and milk thistle (*Sylibum marianum* L.) in petroleum-contaminated soil / S. Zamani,

A. Ghasemnezhad, S. Ebrahimi, M. Fathi // J. Chem. Health Risks. – 2018. – V. 8, № 1. – P. 39-50.

913. Zehr, J.P. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison / J.P. Zehr, B.D. Jenkins, S.M. Short, G.F. Steward // Environ Microbiol. – 2003. – V. 5, № 7. – P. 539-554.

914. Zhan, Y.B. Isolation and construction of petroleum-degrading flora and their degrading characteristics / Y.B. Zhan, Q. Zhang, K.L. Chen [et al.] // Environ. Poll. Control. – 2017. – V. 39. – P. 860-864.

915. Zhang, J.H. Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery / J.H. Zhang, Q.H. Xue, H. Gao [et al.] // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2016. – V. 91, № 4. – P. 865-875.

916. Zhu, W. Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species / W. Zhu, K. Sieradzki, V. Albrecht [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2015. – V. 117. – P. 14-17.

917. Zhu, Z. Biosurfactant production by marine-originated bacteria *Bacillus subtilis* and its application for crude oil removal / Z. Zhu, B. Zhang, B. Chen [et al.] // Water Air Soil Poll. – 2016. – V. 227: 328. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3012-y>.

918. Zou, Ch. Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample towards microbial enhanced oil recovery applications / Ch. Zou, M. Wang, Y. Xing [et al.] // Biochem. Engin. J. – 2014. – V. 90. – P. 49-58.

919. Žur, J. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization: Review / J. Žur, D. Wojcieszynska, U. Guzik // Molecules. – 2016. – V. 21, № 7: 958. – doi:10.3390/molecules21070958.

920. Zurdo-Piñeiro, J.L. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain / J.L. Zurdo-Piñeiro, R. Rivas, M.E. Trujillo [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57, № 4. – P. 784-788.



## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение № 1

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Closed joint stock company  
research-and-production  
company "Biomedchem"

Ulyanov street, 65, Ufa,  
Bashkortostan, Russian  
Federation, 450029

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1. by the

INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
**All-Russian Collection of Microorganisms**  
G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms Russian Academy of Science (IBPM RAS)

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  <b><i>Acinetobacter sp</i></b> <b>№ ИБ ДТ-5.1/1</b>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <b>VKM B- 2753D</b>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input type="checkbox"/> +	a scientific description
<input type="checkbox"/>	a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>18.06.2012</b> (date of the original, deposit)	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: <b>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Science (IBPM RAS)</b>	Signature(s) of person (s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official (s): 
Address: <b>pr. Nauki, 5, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, 142290</b>	Date: <b>31.10.2012</b> 

\* Where Rule 6.A (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority  
was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE


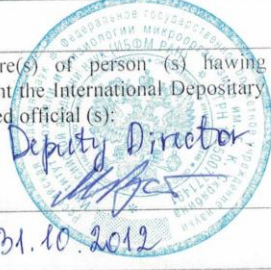
INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1. by the

INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
**All-Russian Collection of Microorganisms**  
G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of  
Microorganisms Russian Academy of Science (IBPM)

ЗАО НПП «Биомедхим»,  
450029, Россия, РБ, г. Уфа,  
ул. Ульяновых, 65

Closed joint stock company  
research-and-production  
company "Biomedchem"  
Ulyanov's street, 65, Ufa,  
Bashkortostan, Russian  
Federation, 450029  
NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  <i>Ochrobactrum</i> sp. № ИБ ДТ-5.3/2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <b>VKM B- 2754D</b>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
<input checked="" type="checkbox"/>	a scientific description
<input type="checkbox"/>	a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on <b>18.06.2012</b> (date of the original, deposit)	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: <b>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Science (IBPM)</b>	Signature(s) of person (s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official (s):  
Adress: <b>pr. Nauki, 5, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation, 142290</b>	Date <b>31.10.2012</b>

' Where Rule 6.A (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority  
was acquired.

## РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**  
**им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук**  
**(ИБФМ РАН)**

просп. Науки, д. 5, г. Пушкино, Московская обл., 142290  
 Тел./факс (495) 956-33-70, (495) 632-78-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru  
 ОГРН 1025007771491, ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 72,  
 Отдел № 34 УФК по Московской области, (ИБФМ РАН лицевой счет 20486Ц87560),  
 Р/с 40501810300002000104 в Отделении 1 Московского ГТУ Банка России, г.Москва 705; БИК 044583001

15.07.2013 № 12310 /02-14-984

на № \_\_\_\_\_

**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
**о депонировании**

Кому ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Ульяновых, д. 65  
 (имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм *Pseudomonas sp.* ИБ-1.1  
 (наименование микроорганизма опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.]

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ ВКМ В-2831D

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	<input type="checkbox"/>
таксономическое определение	<input type="checkbox"/>
научное описание и таксономическое определение	<input checked="" type="checkbox"/>
справку о непатогенности	<input type="checkbox"/>

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрыбина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Дата депонирования 11.07.2013

Заместитель директора Института  
 докт.биол.наук, профессор



*M.B. Vainshstein*

Вайнштейн М.Б.

G.K.SKRYABIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF MICROORGANISMS RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

ALL-RUSSIAN COLLECTION OF MICROORGANISMS



BKM  
All-Russian Collection of Microorganisms  
VKM

✉ 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia  
☎ +7(495)925-74-48 Fax: +7(495)956-33-70  
📧 Internet E-mail: VKM@ibpm.pushchino.ru

CERTIFICATION OF STRAIN DEPOSIT AND AVAILABILITY

This is to certify that strain *Pseudomonas turukhanskensis* IB-1.1 has been deposited in the All-Russian collection of microorganisms (VKM) under the number VKM B- 2935<sup>T</sup>. This strain will be available without any restriction after publication by Korshunova T. Y., Ramírez-Bahena M.-H., Chetverikov S. P., Igual J. M., Peix A., Loginov O. of the scientific paper concerned with the strain description.

Dr. Lyudmila Evtushenko

Head, VKM - All Russian  
Collection of Microorganisms

14.12.2016

## COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Parc Científic Universitat de València  
Catedrático Agustín Escardino, 9  
46980 Paterna (Valencia). España  
Tel.: +34 96 354 46 12  
<http://www.cect.org>



## CERTIFICATE OF DEPOSIT

Paterna, February the 24th 2016

*Pseudomonas turukhanensis*  
strain IB1.1 was deposited in the CECT by

Alvaro Peix Geldart

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SALAMANCA.  
IRNASA-CSIC.

Spain

on 21-01-2016

and was accessioned CECT 9091

This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publically available without restrictions for research and academic purposes.

## *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov., isolated from oil-contaminated soils

Tatiana Y. Korshunova,<sup>1</sup> Martha-Helena Ramírez-Bahena,<sup>2,3</sup>  
Sergey P. Chetverikov,<sup>1</sup> Jose M. Igual,<sup>2,3</sup> Álvaro Peix<sup>2,3</sup> and Oleg Loginov<sup>1</sup>

### Correspondence

Álvaro Peix  
alvaro.peix@csic.es

<sup>1</sup>Laboratory of Biologically Active Agents, Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

<sup>2</sup>Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNASA-CSIC, Salamanca, Spain

<sup>3</sup>Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA (CSIC), Salamanca, Spain

A bacterial strain named IB1.1<sup>T</sup> was isolated in a screening of hydrocarbon-degrading bacteria from oil-contaminated soils on the territory of the Turukhansk District of Krasnoyarsk Krai, East Siberia, Russia. The 16S rRNA gene sequence had 98.7% identity with respect to the closest phylogenetic relative, *Pseudomonas granadensis* F-278,770<sup>T</sup>, and the next most closely related species with 98.6% similarity was *Pseudomonas punonensis*, suggesting that IB1.1<sup>T</sup> should be classified within the genus *Pseudomonas*. The analysis of housekeeping genes *rpoB*, *rpoD* and *gyrB* showed similarities lower than 90% in all cases with respect to the closest relatives, confirming its phylogenetic affiliation. The strain showed a polar flagellum. The respiratory quinone was Q9. The major fatty acids were 16:1 $\omega$ 7c/16:1 $\omega$ 6c (summed feature 3), 18:1 $\omega$ 7c and 16:0. The strain was oxidase- and catalase-positive, but the arginine dihydrolase system was not present. Nitrate reduction, urease and  $\beta$ -galactosidase production, and aesculin hydrolysis were negative. The temperature range for growth was 4–34 °C, and the strain could grow at pH 11. The DNA G+C content was 58.5 mol%. DNA–DNA hybridization results showed values of less than 30% relatedness with respect to the type strains of the eight most closely related species. Therefore, the dataset of genotypic, phenotypic and chemotaxonomic data support the classification of strain IB1.1<sup>T</sup> into a novel species of the genus *Pseudomonas*, for which the name *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov. is proposed. The type strain is IB1.1<sup>T</sup> (=VKM B-2935<sup>T</sup>=CECT 9091<sup>T</sup>).

The Turukhansk District is a large administrative unit of Krasnoyarsk Krai (East Siberia, Russia). Its territory includes one of the sites of the promising Vankor oil and gas field, the development of which has a negative environmental impact. Because of the very continental climate (8-month-long severe winters up to –60 °C, short hot summers up to +35 °C, annual average air temperature –5.8 °C) and peculiar soil features (deep-seated permafrost zones, low nutrient levels, poor aeration, etc.), natural self-purification of oil-contaminated soils by native microbiota

proceeds at a slow rate. Under such conditions, the best biological way for accelerating the process is the introduction of psychrotrophic micro-organisms that have sufficient activity at low temperatures and show considerable ability for degradation of petroleum hydrocarbons. The genus *Pseudomonas* includes several species reported as xenobiotic-degrading bacteria such as *Pseudomonas panipatensis* (Gupta *et al.*, 2008), *P. oleovorans* (Saha *et al.*, 2010), *P. benzenivorans* and *P. saponiphila* (Lang *et al.*, 2010), and some of them were isolated from oil-contaminated soil, such as *Pseudomonas frederiksbergensis* (Andersen *et al.*, 2000), *P. taeanensis* (Lee *et al.*, 2010), *P. sagittaria* (Lin *et al.*, 2013) and the recently described *P. aestusnigri*, isolated from beach intertidal sand samples contaminated after the Prestige oil spill (Sanchez *et al.*, 2014). Moreover, the presence of psychrotolerant members of the genus *Pseudomonas* isolated from soil and able to utilize petroleum hydrocarbons at low temperatures have been reported, such as *P. toyotomiensis* (Hirota *et al.*, 2011).

Abbreviations: ML, maximum-likelihood; NJ, neighbour-joining.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA gene, *rpoD*, *rpoB* and *gyrB* sequences of strain IB1.1<sup>T</sup> are KP306892, LT219438, LT219439 and LT219440, respectively.

Two supplementary figures and one supplementary table are available with the online Supplementary Material.

## Notification that new names of prokaryotes, new combinations and new taxonomic opinions have appeared in volume 66, part 11, of the IJSEM

Aharon Oren<sup>1,\*</sup> and George M. Garrity<sup>2,\*</sup>

This listing of names of prokaryotes published in a previous issue of the IJSEM is provided as a service to bacteriology to assist in the recognition of new names and new combinations. This procedure was proposed by the Judicial

Commission [Minute 11 (ii), *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:185]. The names given herein are listed according to the Rules of priority (i.e. page number and order of valid publication of names in the original articles).

Name/authors	Proposed as:	Page no.
<i>Flaviumibacter sediminis</i> Lee and Cha 2016	sp. nov.	4313
<i>Streptococcus marmotae</i> Niu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4319
<i>Sporolactobacillus pectinivorans</i> Lan <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4327
<i>Desulfotomaculum aquiferis</i> Berlendis <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4336
<i>Desulfotomaculum profundum</i> Berlendis <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4336
<i>Lacinutrix cladophorae</i> Nedashkovskaya <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4343
<i>Lacinutrix iliipiscaria</i> (Shakeela <i>et al.</i> 2015) Nedashkovskaya <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Flavirhabdus iliipiscaria</i> Shakeela <i>et al.</i> 2015)	4345
<i>Arvibacter</i> Chaudhary and Kim 2016	gen. nov.	4351
<i>Arvibacter flaviflagrans</i> Chaudhary and Kim 2016	sp. nov.	4352
<i>Wukongibacter</i> Li <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4357
<i>Wukongibacter baidiensis</i> Li <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4358
<i>Maledivibacter</i> Li <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4360
<i>Maledivibacter halophilus</i> (Fendrich <i>et al.</i> 1991) Li <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Clostridium halophilum</i> Fendrich <i>et al.</i> 1991)*	4360
<i>Paramaledivibacter</i> Li <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4360
<i>Paramaledivibacter caminithermalis</i> (Brisbarre <i>et al.</i> 2003) Li <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Clostridium caminithermale</i> Brisbarre <i>et al.</i> 2003)	4360
<i>Paenibacillus methanolicus</i> Madhaiyan <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4365
<i>Legionella saoudiensis</i> Bajrai <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4370
<i>Dyella humi</i> Chen <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4375
<i>Pontibacter rugosus</i> Kim <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4393
<i>Pontibacter virosus</i> Kohli <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4398
<i>Rufibacter ruber</i> Kýrová <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4403
<i>Pseudoalteromonas profundum</i> Zhang <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4420
<i>Acidipropionibacterium</i> Scholz and Kilian 2016	gen. nov.	4429
<i>Cutibacterium</i> Scholz and Kilian 2016	gen. nov.	4430
<i>Pseudopropionibacterium</i> Scholz and Kilian 2016	gen. nov.	4430
<i>Cutibacterium acnes</i> (Gilchrist 1900) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium acnes</i> (Gilchrist 1900) Douglas and Gunter 1946 (Approved Lists 1980)]	4430
<i>Cutibacterium avidum</i> (Eggerth 1935) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium avidum</i> (Eggerth 1935) Moore and Holdeman 1969 (Approved Lists 1980)]	4430

**Author affiliations:** <sup>1</sup>The Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, The Edmond J. Safra Campus, 91904 Jerusalem, Israel;

<sup>2</sup>Department of Microbiology & Molecular Genetics, Biomedical Physical Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-4320, USA.

\*Correspondence: Aharon Oren, aharon.oren@mail.huji.ac.il; George M. Garrity, garrity@msu.edu

**Keywords:** List; Names; Validation.

cont.

Name/authors	Proposed as:	Page no.
<i>Cutibacterium granulosum</i> (Prévot 1938) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium granulosum</i> (Prévot 1938) Moore and Holdeman 1970 (Approved Lists 1980)]	4430
<i>Acidipropionibacterium jensenii</i> (van Niel 1928) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium jensenii</i> van Niel 1928 (Approved Lists 1980)]	4430
<i>Acidipropionibacterium thoenii</i> (van Niel 1928) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium thoenii</i> van Niel 1928 (Approved Lists 1980)]	4430
<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i> (Orla-Jensen 1909) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium acidipropionici</i> Orla-Jensen 1909 (Approved Lists 1980)]	4430
<i>Acidipropionibacterium microaerophilum</i> (Koussémon <i>et al.</i> 2001) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. (basonym: <i>Propionibacterium microaerophilum</i> Koussémon <i>et al.</i> 2001)	4430
<i>Acidipropionibacterium olivae</i> (Lucena-Padrós <i>et al.</i> 2014) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. (basonym: <i>Propionibacterium olivae</i> Lucena-Padrós <i>et al.</i> 2014)	4431
<i>Acidipropionibacterium damnosum</i> (Lucena-Padrós <i>et al.</i> 2014) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. (basonym: <i>Propionibacterium damnosum</i> Lucena-Padrós <i>et al.</i> 2014)	4431
<i>Pseudopropionibacterium propionicum</i> (Buchanan and Pine 1962) Scholz and Kilian 2016	comb. nov. [basonym: <i>Propionibacterium propionicum</i> (Buchanan and Pine 1962) Charfreitag <i>et al.</i> 1988]	4431
<i>Sphingobacterium jejuense</i> Siddiqi <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4437
<i>Microbacterium faecale</i> Chen <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4447
<i>Rhizobium favelukesii</i> Tejerizo <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4455
<i>Herbivorax Koeck et al.</i> 2016	gen. nov.	4461
<i>Herbivorax saccincola</i> Koeck <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4462
<i>Serpentinicella Mei et al.</i> 2016	gen. nov.	4468
<i>Serpentinicella alkaliphila</i> Mei <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4469
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> (Adékambi <i>et al.</i> 2006) Tortoli <i>et al.</i> 2016	subsp. nov. †	4477
<i>Mycobacterium sarraceniae</i> Tran and Dahl 2016	sp. nov.	4484
<i>Mycobacterium helvum</i> Tran and Dahl 2016	sp. nov.	4484
<i>Paenibacillus solani</i> Liu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4490
<i>Microbacterium diaminobutyricum</i> Fidalgo <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4498
<i>Sedimibacterium aquarii</i> Kim <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4504
<i>Croceicoccus pelagius</i> Wu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4509
<i>Croceicoccus mobilis</i> Wu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4510
<i>Rickettsia asemonensis</i> Maina <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4515
<i>Campylobacter hepaticus</i> Van <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4523
<i>Chelatococcus reniformis</i> Gu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4528
<i>Mycobacterium oryzae</i> Ramaprasad <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4534
<i>Paraburkholderia pallidirosea</i> Lv <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4539
<i>Altererythrobacter aerius</i> Xue <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4547
<i>Mucilaginibacter puniceus</i> Lee <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4552
<i>Pedobacter psychrotolerans</i> Manandhar <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4564
<i>Mucilaginibacter fluminis</i> Sheu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4572
<i>Wenzhouxiangella sediminis</i> Guo <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4577
<i>Silicimonas Crenn et al.</i> 2016	gen. nov.	4586
<i>Silicimonas algicola</i> Crenn <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4586
<i>Marinifilum albidiflavum</i> Xu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4592
<i>Polaribacter marinae</i> Wang <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4598
<i>Williamsia herbipolensis</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4612
<i>Akkermansia glycaniphila</i> Ouwerkerk <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4619
<i>Sphingomonas naphthae</i> Chaudhary and Kim 2016	sp. nov.	4625
<i>Paenibacillus hispanicus</i> Menéndez <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4631
<i>Nocardia jiangsuensis</i> Bai <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4637
<i>Falcatimonas Watanabe et al.</i> 2016	gen. nov.	4642
<i>Falcatimonas natans</i> Watanabe <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4642
<i>Saccharibacillus qingshengii</i> Han <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4648
<i>Polygonibacillus Hirota et al.</i> 2016	gen. nov.	4655



cont.

Name/authors	Proposed as:	Page no.
<i>Polygonibacillus indicireducens</i> Hirota <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4655
<i>Pseudomonas turukhanskensis</i> Korshunova <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4661
<i>Microbacterium aureliae</i> Kaur <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4668
<i>Pseudoduganella danionis</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4674
<i>Flaviumibacter stibioxidans</i> Han <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4679
<i>Litorisediminivivens</i> Park <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4683
<i>Litorisediminivivens gilvus</i> Park <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4683
<i>Haoranjiana</i> Zhang <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4688
<i>Haoranjiana flavu</i> Zhang <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4689
<i>Balneicella</i> Fadhlouli <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4695
<i>Balneicella halophila</i> Fadhlouli <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4695
<i>Balneicellaceae</i> Fadhlouli <i>et al.</i> 2016	fam. nov.	4696
<i>Halomonas lutescens</i> Wang <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4702
<i>Brachybacterium aquaticum</i> Kaur <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4709
<i>Hoyosella subflava</i> (Wang <i>et al.</i> 2010) Hamada <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Amycoliticoccus subflavus</i> Wang <i>et al.</i> 2010)	4714
<i>Hoyosella rhizosphaerae</i> Li <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4721
<i>Scopulibacillus daqui</i> Yao <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4727
<i>Novosphingobium lotistagni</i> Ngo <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4732
<i>Micromonospora profundu</i> Veyisoglu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4741
<i>Bacillus wiedmannii</i> Miller <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4751
<i>Lysobacter rhizophilus</i> Yan <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4757
<i>Pullulanibacillus camelliae</i> Niu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4764
<i>Xylella taiwanensis</i> Su <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4770
<i>Alteribacillus alkaliphilus</i> Azmatnisa Begum <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4775
<i>Alteribacillus iranensis</i> (Bagheri <i>et al.</i> 2012) Azmatnisa Begum <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Bacillus iranensis</i> Bagheri <i>et al.</i> 2012)	4777
<i>Actinocrispum</i> Hatano <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4781
<i>Actinocrispum wychmicini</i> Hatano <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4782
<i>Saccharothrix isguenensis</i> Bouznada <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4788
<i>Vibrio europaeus</i> (Prado <i>et al.</i> 2016) Dubert <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4795
<i>Mesorhizobium sediminum</i> Yuan <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4800
<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>oralis</i> (Bridge and Sneath 1982) Jensen <i>et al.</i> 2016	subsp. nov.	4818
<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i> (Camelo-Castillo <i>et al.</i> 2014) Jensen <i>et al.</i> 2016	subsp. nov.†	4818
<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>tigurinus</i> (Zbinden <i>et al.</i> , 2012) Jensen <i>et al.</i> 2016	subsp. nov.§	4818
<i>Hymenobacter nivis</i> Kojima <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4824
<i>Maribacter arenosus</i> Thongphrom <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4830
<i>Allofrancisella</i> Qu <i>et al.</i> 2016.	gen. nov.	4835
<i>Allofrancisella inopinata</i> Qu <i>et al.</i> 2016.	sp. nov.	4837
<i>Allofrancisella frigidaquae</i> Qu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4837
<i>Allofrancisella guangzhouensis</i> (Qu <i>et al.</i> 2013) Qu <i>et al.</i> 2016	comb. nov. (basonym: <i>Francisella guangzhouensis</i> Qu <i>et al.</i> 2013)	4837
<i>Piscinibacter defluvii</i> Cho <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4842
<i>Marinibaculum</i> Yu <i>et al.</i> 2016	gen. nov.	4847
<i>Marinibaculum pumilum</i> Yu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4848
<i>Actinoplanes subglobosus</i> Ngaemthao <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4853
<i>Streptomyces ovatisporus</i> Veyisoglu <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4861
<i>Blastococcus capsensis</i> Hezbri <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4870
<i>Methanomicrobium antiquum</i> Mochimaru 2016	sp. nov.	4876
<i>Borrelia mayonii</i> Pritt <i>et al.</i> 2016	sp. nov.	4879

\*The authors erroneously gave Fendrich *et al.* 1990.

†The authors gave comb. nov. (basonym: *Mycobacterium massiliense* Adékambi *et al.* 2006). However, based on Rules 34a, 40d and 50b of the ICNP this is a subsp. nov. and not a comb. nov.

†The authors gave comb. nov. (basonym: *Streptococcus dentisani* Camelo-Castillo *et al.* 2014). However, based on Rules 34a, 40d and 50b of the ICNP this is a subsp. nov. and not a comb. nov.

§The authors gave comb. nov. (basonym: *Streptococcus tigurinus* Zbinden *et al.* 2012). However, based on Rules 34a, 40d and 50b of the ICNP this is a subsp. nov. and not a comb. nov.

The following taxonomic opinions (i.e. the emendation of circumscriptions or the creation of synonyms) cannot be considered as validly published nor, in any

other way, approved by the International Committee on Systematics of Prokaryotes and its Judicial Commission.

Name/authors	Page no.
<i>Lacinatrix</i> Bowman and Nichols 2005 emend. Nedashkovskaya <i>et al.</i> 2016	4345
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> pro synonym. <i>Propionibacterium shermanii</i> (van Niel 1928) Holdeman and Moore 1970	4429
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> pro synonym. <i>Propionibacterium shermanii</i> (van Niel 1928) Holdeman and Moore 1970	4429
<i>Propionibacterium</i> Orla-Jensen 1909 (Approved Lists 1980) emend. Scholz and Kilian 2016	4429
<i>Brevibacterium massiliense</i> Roux and Raoult 2009 pro synonym. <i>Brevibacterium ravensturgense</i> Mages <i>et al.</i> 2009	4443
<i>Brevibacterium ravensturgense</i> Mages <i>et al.</i> 2009 emend. Bernard <i>et al.</i> 2016	4443
<i>Mycobacterium abscessus</i> (Moore and Frerichs 1953) Kusunoki and Ezaki 1992 emend. Tortoli <i>et al.</i> 2016	4477
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> Leao <i>et al.</i> 2011 emend. Tortoli <i>et al.</i> 2016	4477
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (Adékambi <i>et al.</i> 2006) Leao <i>et al.</i> 2011 emend. Tortoli <i>et al.</i> 2016	4477
<i>Microbacterium</i> Orla-Jensen 1919 emend. (Approved Lists 1980) Fidalgo <i>et al.</i> 2016	4498
<i>Altererythrobacter</i> Kwon <i>et al.</i> 2007 emend. Xue <i>et al.</i> 2016	4547
<i>Elizabethkingia endophytica</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2015 pro synonym. <i>Elizabethkingia anophelis</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2011	4555
<i>Elizabethkingia anophelis</i> Kämpfer <i>et al.</i> 2011 emend. Doijad <i>et al.</i> 2016	4558
<i>Hoyosella</i> Jurado <i>et al.</i> 2009 emend. Hamada <i>et al.</i> 2016	4714
<i>Hoyosella altamirensis</i> Jurado <i>et al.</i> 2009 emend. Hamada <i>et al.</i> 2016	4714
<i>Hoyosella</i> Jurado <i>et al.</i> 2009 emend. Li <i>et al.</i> 2016	4720
<i>Scopulibacillus</i> Lee and Lee 2015 emend. Yao <i>et al.</i> 2016*	4725
<i>Alteribacillus</i> Didari <i>et al.</i> 2012 emend. Azmatnisa Begum <i>et al.</i> 2016	4777
<i>Vibrio tubiashii</i> Hada <i>et al.</i> 1984 emend. Dubert <i>et al.</i> 2016	4795
<i>Streptococcus oligofermentans</i> Tong <i>et al.</i> 2003 pro synonym. <i>Streptococcus cristatus</i> Handley <i>et al.</i> 1991	4818
<i>Streptococcus oralis</i> Bridge and Sneath 1982 emend. Jensen <i>et al.</i> 2016	4818
<i>Piscibacter</i> Stackebrandt <i>et al.</i> 2009 emend. Cho <i>et al.</i> 2016	4842
<i>Blastococcus</i> Ahrens and Moll 1970 (Approved Lists 1980) emend. Hezbri <i>et al.</i> 2016	4869
<i>Blastococcus aggregatus</i> Ahrens and Moll 1970 (Approved Lists 1980) emend. Hezbri <i>et al.</i> 2016	4869
<i>Blastococcus endophyticus</i> Zhu <i>et al.</i> 2013 emend. Hezbri <i>et al.</i> 2016	4869
<i>Blastococcus jejuensis</i> Lee 2006 emend. Hezbri <i>et al.</i> 2016	4870
<i>Blastococcus saxosidens</i> Urzì <i>et al.</i> 2004 emend. Hezbri <i>et al.</i> 2016	4870

\*The authors erroneously gave Lee and Lee 2009.

#### Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at [microbiologyresearch.org](http://microbiologyresearch.org).

## РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**  
 им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук  
 (ИБФМ РАН)

просп. Науки, д. 5, г. Пушкино, Московская обл., 142290  
 Тел./факс (495) 956-33-70, (495) 632-78-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru  
 ОГРН 1025007771491, ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОКПО 02699702, ОКВЭД 73.10, ОКОПФ 72,  
 Отдел № 34 УФК по Московской области, (ИБФМ РАН лицевой счет 20486187560),  
 Р/с 40501810300002000104 в Отделении I Московского ГТУ Банка России, г.Москва 705; БИК 044583001

15.07.2013 № 12310 /02-14-986

на № \_\_\_\_\_

**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
 о депонировании

Кому ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Ульяновых, д. 65  
 (имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм *Pseudomonas sp. ИБ-4*  
 (наименование микроорганизма опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.]

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ ВКМ В-2830D

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	<input type="checkbox"/>
таксономическое определение	<input type="checkbox"/>
научное описание и таксономическое определение	<input checked="" type="checkbox"/>
справку о непатогенности	<input type="checkbox"/>

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрыбина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Дата депонирования 11.07.2013

Заместитель директора Института  
 докт.биол.наук, профессор



*M. B. Vainstein*

Вайнштейн М.Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**СВИДЕТЕЛЬСТВО**

на товарный знак (знак обслуживания)

№ 253033

**ЛЕНОЙЛ**

Правообладатель: *Общество с ограниченной ответственностью "Биомедхим-реагент", 450071, Башкортостан респ., г.Уфа, ул.Менделеева, 213/1 (RU)*

Приоритет товарного знака 14 ноября 2002 г.

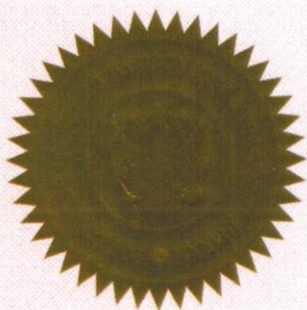
Зарегистрировано в Государственном реестре товарных знаков и знаков обслуживания Российской Федерации 15 августа 2003 г.

Срок действия регистрации истекает 14 ноября 2012 г.

Генеральный директор Российского агентства по патентам и товарным знакам

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'А.Д. Корчагин'.

А.Д. Корчагин



## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПРИЛОЖЕНИЕ

к свидетельству на товарный знак (знак обслуживания)

№ 253033

Продление срока действия регистрации товарного знака

Правообладатель: *Закрытое акционерное общество  
Научно-производственное предприятие "Биомедхим", 450029,  
г. Уфа, ул. Ульяновых, 65 (RU)*

Дата, до которой продлен срок действия регистрации: *14 ноября 2022 г.*

Запись внесена в Государственный реестр  
товарных знаков и знаков обслуживания  
Российской Федерации *14 декабря 2012 г.*

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(190) **RU** (111) **253033**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Товарные знаки, знаки обслуживания и наименования мест происхождения товаров

Товарные знаки, знаки обслуживания

(540) *Изображение товарного знака, знака обслуживания:***ЛЕНОЙЛ**

Извещения об изменениях, относящихся к регистрации товарного знака

Продление срока действия регистрации товарного знака

(732) *Правообладатель:*

Закрытое акционерное общество Научно-производственное предприятие "Биомедхим", 450029, г.Уфа, ул. Ульяновых, 65 (RU)

(186) *Дата, до которой продлен срок действия регистрации:* 14.11.2022(580) *Дата внесения изменений в Госреестр ТЗ:* 14.12.2012*Опубликовано:* 12.01.2013

Изменение наименования, фамилии, имени, отчества правообладателя и/или места нахождения или места жительства

(771) *Прежнее наименование/имя правообладателя:*

Закрытое акционерное общество Научно-производственное предприятие "БИОМЕДХИМ", 450001, Республика Башкортостан, г.Уфа, ул.Собинова, 27 (RU)

(732) *Правообладатель:*

Закрытое акционерное общество Научно-производственное предприятие "Биомедхим", 450029, г.Уфа, ул. Ульяновых, 65 (RU)

(580) *Дата внесения изменений в Госреестр ТЗ:* 14.12.2012*Опубликовано:* 12.01.2013

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека**


**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН»  
АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР**

Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Шафиева д.7, тел 237-64-00, Факс 237-42-48  
ОКПО: 75824463, ОГРН: 1050204212255, ИНН/КПП: 0276090570/027601001

Аттестат аккредитации  
№ ГСЭН.RU.ЦОА.062  
№ РОСС RU.0001.510408 от 30.07.2008  
действителен до 30.07. 2013 г.  
Свидетельство об аккредитации  
№ 79-АК от 27.07.2011 г.  
Действительно до 01.03.2015 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач ФБУЗ  
«Центр гигиены и эпидемиологии  
в Республике Башкортостан»  
Г.Д. Минин

2012г.



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ Т-130**

по токсикологической оценке

биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП

УФА – 2012 год

1. **Наименование продукции:** Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®, СХП.
2. **Назначение продукции:** Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®, СХП предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв и очистки водных объектов.
3. **Заявитель:** ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65.
4. **Нормативно-техническая документация:** ТУ 9291-001-33822935-2011 «Биопрепараты-нефтедеструкторы «Ленойл»®-гранд, СХП и «Ленойл»®-супер, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г). Технические условия».
5. **Общие положения:** Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®, СХП представляет собой сухой порошок (СХП), в состав которого входит ассоциация жизнеспособных клеток микроорганизмов, растущих на нефти и дизельном топливе. В состав биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП входят вегетативные клетки непатогенных штаммов культур *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1, *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3.

#### 1. Токсикологические исследования.

Целью настоящих исследований является токсикологическая оценка образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП с определением следующих параметров токсичности:

- установление параметров острой токсичности и класса опасности при внутрижелудочном поступлении;
- определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях;
- определение влияния на слизистые оболочки глаз;
- определение раздражающего действия на кожу;
- определение кожно-резорбтивного действия;
- определение кумулятивного действия;
- оценка сенсибилизирующего действия.

Токсикологическая оценка образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП проведена в соответствии со следующей нормативной документацией:

- МУ 4230-86 «Показатели токсикометрии, подлежащие определению на разных стадиях производства и применения химических веществ»;
- МУ 2163-80 «Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны»;



- МУ 2102-79 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи»;
- МУ 1.1.578-96 «Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию ПДК промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы»

#### **6.1. Установление параметров острой токсичности (ДЛ<sub>50</sub>) и класса опасности при внутрижелудочном поступлении.**

Исследование токсичности биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП при однократном поступлении в желудок проводили на белых крысах. Препарат вводился в виде водной взвеси в максимальной дозе до 6,4 г/кг (в пересчете на основной препарат). Внешних признаков интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено. Среднесмертельная доза (ДЛ<sub>50</sub>) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг.

Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» при однократном внутрижелудочном поступлении биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®,СХП следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).

#### **6.2. Определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях.**

Однократная двухчасовая статическая ингаляционная затравка в условиях насыщающих концентраций образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП проводилась на белых мышах.

В указанных условиях моделирования в ходе затравки у животных признаков раздражения дыхательных путей и интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено.

#### **6.3. Определение влияния на слизистые оболочки глаз.**

Для изучения местного действия на слизистую оболочку глаз белых крыс вносили по 1 капле водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП. Результат учитывался в течение первых суток, через 48 и 72 часов. В первые часы после нанесения биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП отмечался быстрый спазм глазной щели, слезотечение и гиперемия слизистых оболочек глаз. Указанные явления проходили через 24 часа после нанесения.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП обладает раздражающим действием на слизистые оболочки глаз при однократном контакте.

#### 6.4. Определение раздражающего действия на кожу.

Раздражающее действие биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП на кожу изучалось на белых крысах «пробирочным методом». После однократной экспозиции хвостов крыс в водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП признаков раздражения не отмечено. После повторных аппликаций (ежедневно, по 4 часа в течение 2-х недель) заметного раздражающего действия не отмечено.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП не обладает раздражающим действием на кожу при повторных аппликациях.

#### 6.5. Определение кожно-резорбтивного действия.

Оценка кожно-резорбтивного действия проводилась методом «хвостовых» проб в течение 1 месяца на белых крысах. Время экспозиции – 4 часа ежедневно, за исключением выходных дней. Хвосты крыс размещались в водной взвеси биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП. В качестве показателей кожно-резорбтивного действия использовались:

- ❖ Общее состояние животных (активность и подвижность)
- ❖ Динамика массы тела.
- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)
- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

Таблица 1

Показатели кожно – резорбтивного действия  
биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
Физиологические показатели				
Масса тела:	грамм			
Фон		189,2±5,3	185,8±6,2	>0,05
Конец опыта		215,8±7,1	221,7±5,4	>0,05

Поведенческие реакции:	усл. ед.			
- вертикальная подвижность		3,5±0,7	2,7±0,2	>0,05
- горизонтальная подвижность		6,8±0,7	5,3±0,7	>0,05
- «норковый» рефлекс		8,8±0,9	7,3±0,7	>0,05
- суммарная подвижность		19,3±1,9	14,3±1,6	<0,05

## Гематологические показатели

Эритроциты	млн/мл	9,74±0,16	9,63±0,18	>0,05
Гемоглобин	г/л	159,6±5,9	170,7±8,41	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	5,9±0,4	7,0±0,3	>0,05

## Биохимические показатели сыворотки крови

АЛТ	ммоль/ч.л	4,50±0,57	4,70±0,27	>0,05
SH – группы	мк·моль/ 100мл	46,6±1,4	47,1±1,2	>0,05

## Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)

* печень	Относ.ед.	34,0±0,9	32,4±0,9	>0,05
* почки	Относ.ед.	5,8±0,1	6,0±0,2	>0,05
* селезенка	Относ.ед.	3,5±0,3	3,7±0,4	>0,05
* сердце	Относ.ед.	3,4±0,1	3,2±0,1	>0,05
* легкие	Относ.ед.	6,7±0,3	7,1±0,2	>0,05

В ходе эксперимента у животных опытной группы, по сравнению с контрольной) активность и подвижность не отличались. Признаков интоксикации не отмечено. Летальных исходов в ходе эксперимента не установлено. Статистически достоверной разницы в гематологических и биохимических показателях крови, как в опытной, так и в контрольной группах не зафиксировано. При патоморфологическом исследовании внутренних органов патологических изменений нет (табл. 1).

Таким образом, у образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП заметного кожно-резорбтивного действия не установлено.

### 6.6. Оценка кумулятивных свойств.

Оценка кумулятивных свойств биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП проведена на беспородных белых крысах при ежедневном введении в желудок 33% водной взвеси в дозе 1,0 г/кг массы тела (в пересчете на основное вещество). Продолжительность эксперимента – 1 месяц. В качестве показателей интоксикации использовались:

- ❖ Общее состояние животных (активность и подвижность)
- ❖ Динамика массы тела.
- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)

- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

Таблица 2.

Показатели кумулятивных свойств биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
<b>Физиологические показатели</b>				
Масса тела:	грамм			
Фон		176,7±3,5	178,3±3,5	>0,05
Конец опыта		230,8±6,2	215,8±4,4	>0,05
Поведенческие реакции:	усл. ед.			
- вертикальная подвижность		1,2±0,2	1,0±0,2	>0,05
- горизонтальная подвижность		7,5±1,2	3,0±0,5	<0,05
- «норковый» рефлекс		7,8±0,9	5,8±0,4	>0,05
- суммарная подвижность		17,0±2,1	9,5±1,2	<0,05
<b>Гематологические показатели</b>				
Эритроциты	млн/мл	10,13±0,06	10,22±0,03	>0,05
Гемоглобин	г/л	142,7±3,9	147,0±1,9	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	6,2±0,3	7,8±0,3	<0,05
<b>Биохимические показатели сыворотки крови</b>				
АЛТ	ммоль/ч.л	4,70±0,27	4,97±0,26	>0,05
SH – группы	мк·моль/ 100мл	47,6±1,4	42,9±1,2	<0,05
<b>Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)</b>				
* печень	Относ.ед.	31,1±0,6	33,8±0,4	<0,05
* почки	Относ.ед.	6,1±0,2	6,7±0,4	>0,05
* селезенка	Относ.ед.	3,8±0,4	4,2±0,4	>0,05
* сердце	Относ.ед.	3,5±0,1	3,7±0,2	>0,05
* легкие	Относ.ед.	6,8±0,3	6,8±0,7	>0,05

Из таблицы 2 видно, что у крыс, получавших биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®,СХП в течение 1 месяца, отмечены статистически достоверные увеличение содержания в крови лейкоцитов, снижена активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови. Одновременно у опытных животных отмечены изменения в поведенческих реакциях (снижена активность и подвижность). При вскрытии животных выявлены увеличение коэффициентов относительной массы печени, свидетельствующих о развитии отежности. Летальных исходов не установлено.

Таким образом, у представленного образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП признаков материальной кумуляции не отмечено, но изменение некоторых показателей интоксикации, указанных выше, свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП.

#### **6.7 Оценка сенсибилизирующего действия.**

Для выявления сенсибилизирующего действия биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП использовался метод воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. Между животными контрольной и опытной групп статистически достоверного различия не установлено.

Следовательно, у представленного на исследование образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП сенсибилизирующего действия не отмечено.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ\***

1. Среднесмертельная однократная доза ( $DL_{50}$ ) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг. По существующей классификации ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» изученный образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП при однократном внутрижелудочном поступлении следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).
2. После однократной ингаляционной затравки в статических условиях при насыщающих концентрациях биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП раздражения дыхательных путей и признаков интоксикации не отмечено.
3. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®СХП обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.
4. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®СХП раздражающим действием на кожные покровы не обладает.
5. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®СХП кожно-резорбтивным действием не обладает.
6. Кумулятивные свойства не выражены, но изменение некоторых показателей интоксикации (функциональные сдвиги в центральной нервной системе (поведенческие реакции), признаки лейкоцитоза, пониженная активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови, увеличение коэффициентов массы печени), свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®СХП.

7. У исследуемого образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®, СХП сенсibiliзирующего действия не отмечено..

Заведующий отделом профилактической токсикологии, к. м. н.



Секретарев В.И.

Врач по санитарно-гигиеническим лабораторным исследованиям



Яндимирова С.С.

\* Свидетельство об аккредитации (Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения; обеспечение защиты прав потребителей и потребительского рынка) № 79-АК от 27.07.2011 г. Действительно до 01.03.2015 г.

Заключение по токсикологической оценке не может быть воспроизведено полностью или частично без письменного разрешения ИЛЦ  
Результаты испытаний распространяется только на образцы, прошедшие испытания

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и  
благополучия человека**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РЕСПУБЛИКЕ  
БАШКОРТОСТАН»  
АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР**

Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Шафиева д.7, тел 237-64-00, Факс 237-42-48  
ОКПО: 75824463, ОГРН: 1050204212255, ИНН/КПП: 0276090570/027601001

Аттестат аккредитации  
№ ГСЭН.RU.ЦОА.062  
№ РОСС RU.0001.510408 от 30.07.2008  
действителен до 30.07.2013 г.  
Свидетельство об аккредитации № 79-АК  
от 27.07.2011 г.  
Действительно до 01.03.2015 г.



УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач ФБУЗ

«Центр гигиены и эпидемиологии  
в Республике Башкортостан»

Г.Д. Минин

2012г.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ Т-132**

**по токсикологической оценке**

**биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП**

УФА – 2012 год

1. **Наименование продукции:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - супер, СХП.
  2. **Назначение продукции:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - супер, СХП предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв и очистки водных объектов.
  3. **Заявитель:** ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65.
  4. **Нормативно – техническая документация:** ТУ 9291-001-33822935-2012 «Биопрепараты-нефтеструкторы «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® - гранд, СХП, «Ленойл»® - супер, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г). Технические условия.
  5. **Общие положения:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - супер, СХП представляет собой сухой порошок (СХП), в состав которого входит ассоциация жизнеспособных клеток микроорганизмов, растущих на нефти и дизельном топливе. В состав биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - супер, СХП входят вегетативные клетки непатогенных штаммов культур. *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ – 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ – 5.3/2 и *Pseudomonas* sp. ИБ – 4.
6. **Токсикологические исследования.**

Целью настоящих исследований является токсикологическая оценка образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - гранд, СХП с определением следующих параметров токсичности:

- установление параметров острой токсичности и класса опасности при внутрижелудочном поступлении;
- определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях;
- определение влияния на слизистые оболочки глаз;
- определение раздражающего действия на кожу;
- определение кожно-резорбтивного действия;
- определение кумулятивного действия;
- оценка сенсibilизирующего действия.

Токсикологическая оценка образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - гранд, СХП проведена в соответствии со следующей нормативной документацией:

- МУ 4230-86 «Показатели токсикометрии, подлежащие определению на разных стадиях производства и применения химических веществ»;
- МУ 2163-80 «Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны»;



- МУ 2102-79 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи»;
- МУ 1.1.578-96 «Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию ПДК промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы»

#### **6.1. Установление параметров острой токсичности ( $DL_{50}$ ) и класса опасности при внутрижелудочном поступлении.**

Исследование токсичности биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП при однократном поступлении в желудок проводили на белых крысах. Препарат вводился в виде водной взвеси суспензии в максимальной дозе до 6,4 г/кг (в пересчете на основной препарат). Внешних признаков интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено. Среднесмертельная доза ( $DL_{50}$ ) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг.

Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» при однократном внутрижелудочном поступлении биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-супер,СХП следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).

#### **6.2. Определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях.**

Однократная двухчасовая статическая ингаляционная заправка в условиях насыщающих концентраций образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП проводилась на белых мышах.

В указанных условиях моделирования в ходе заправки у животных признаков раздражения дыхательных путей и интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено.

#### **6.3. Определение влияния на слизистые оболочки глаз.**

Для изучения местного действия на слизистую оболочку глаз белых крыс вносили по 1 капле водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП. Результат учитывался в течение первых суток, через 48 и 72 часов. В первые часы после нанесения биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП отмечался быстрый спазм глазной щели, слезотечение и гиперемия слизистых оболочек глаз. Указанные явления проходили через 24 часа после нанесения.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП обладает раздражающим действием на слизистые оболочки глаз при однократном контакте.

#### 6.4. Определение раздражающего действия на кожу.

Раздражающее действие биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП на кожу изучалось на белых крысах «пробирочным методом». После однократной экспозиции хвостов крыс в водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП признаков раздражения не отмечено. После повторных аппликаций (ежедневно, по 4 часа в течение 2-х недель) заметного раздражающего действия не отмечено.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП не обладает раздражающим действием на кожу при повторных аппликациях.

#### 6.5. Определение кожно-резорбтивного действия.

Оценка кожно-резорбтивного действия проводилась методом «хвостовых» проб в течение 1 месяца на белых крысах. Время экспозиции – 4 часа ежедневно, за исключением выходных дней. Хвосты крыс размещались в водной взвеси биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП. В качестве показателей кожно-резорбтивного действия использовались:

- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)
- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

Таблица 1

Показатели кожно – резорбтивного действия биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
Физиологические показатели				
Масса тела:	грамм			
Фон		189,2±5,3	186,7±7,9	>0,05
Конец опыта		215.8±7,1	212,5±7,1	>0,05

Поведенческие реакции:	усл. ед.			
- вертикальная подвижность		3,5±0,7	2,5±0,4	>0,05
- горизонтальная подвижность		6,8±0,7	5,0±0,3	>0,05
- «норковый» рефлекс		8,8±0,9	7,2±0,3	>0,05
- суммарная подвижность		19,3±1,9	14,7±0,7	>0,05

## Гематологические показатели

Эритроциты	млн/мл	9,74±0,16	8,79±0,16	>0,05
Гемоглобин	г/л	159,6±5,9	148,9±0,6	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	5,6±0,3	6,2±0,2	>0,05

## Биохимические показатели сыворотки крови

АЛТ	ммоль/ч.л	4,50±0,57	5,00±0,22	>0,05
SH – группы	мк·моль/ 100мл	46,6±1,4	47,2±1,2	>0,05

## Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)

* Печень	Относ. ед.	34,0±0,9	32,7±0,7	>0,05
* почки	Относ. ед.	5,8±0,1	6,4±0,3	>0,05
* селезенка	Относ. ед.	3,5±0,3	3,3±0,1	>0,05
* сердце	Относ. ед.	3,4±0,1	3,6±0,1	>0,05
* легкие	Относ. ед.	6,7±0,3	6,6±0,2	>0,05

В ходе эксперимента у животных опытной группы, по сравнению с контрольной) активность и подвижность не отличались. Признаков интоксикации не отмечено. Летальных исходов в ходе эксперимента не установлено. Статистически достоверной разницы в гематологических и биохимических показателях крови, как в опытной, так и в контрольной группах не зафиксировано. При патоморфологическом исследовании внутренних органов патологических изменений нет (табл. 1).

Таким образом, у образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП заметного кожно-резорбтивного действия не установлено.

#### 6.6. Оценка кумулятивных свойств.

Оценка кумулятивных свойств биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП проведена на беспородных белых крысах при ежедневном введении в желудок 33% водной взвеси в дозе 1,0 г/кг массы тела (в пересчете на основное вещество). Продолжительность эксперимента – 1 месяц. В качестве показателей интоксикации использовались:

- ❖ Общее состояние животных (активность и подвижность)
- ❖ Динамика массы тела.

- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)
- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

В ходе субхронического эксперимента летальных исходов не отмечено. После завершения 4-х недельной заправки у животных были сняты физиологические, гематологические, биохимические и морфологические показатели.

Таблица 2.  
Показатели кумулятивных свойств биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер, СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
<i>Физиологические показатели</i>				
Масса тела:	грамм			
Фон		176,7±3,5	176,7±3,5	>0,05
Конец опыта		230,8±6,2	222,3±5,3	>0,05
Поведенческие реакции:	усл. ед.			
- вертикальная подвижность		1,2±0,2	2,7±0,2	>0,05
- горизонтальная подвижность		7,5±1,2	5,3±0,7	>0,05
- «норковый» рефлекс		7,8±0,9	7,3±0,7	>0,05
- суммарная подвижность		17,0±2,1	14,3±1,6	>0,05
<i>Гематологические показатели</i>				
Эритроциты	млн/мл	10,13±0,16	10,01±0,19	>0,05
Гемоглобин	г/л	142,7±3,9	156,3±0,9	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	6,2±0,3	8,0±0,3	<0,05
<i>Биохимические показатели сыворотки крови</i>				
АЛТ	ммоль/ч.л	4,70±0,27	4,8±0,6	>0,05
SH- группы	мк-моль/100мл	47,6±1,4	43,0±0,9	<0,05
<i>Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)</i>				
* печень	Относ.ед.	31,1±0,6	34,8±0,3	<0,05
* почки	Относ.ед.	6,1±0,2	6,5±0,2	>0,05
* селезенка	Относ.ед.	3,8±0,4	3,4±0,4	>0,05
* сердце	Относ.ед.	3,5±0,1	3,9±0,3	>0,05
* легкие	Относ.ед.	6,8±0,3	6,6±0,5	>0,05

Из таблицы 2 видно, что у крыс, получавших биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-супер,СХП в течение 1 месяца, отмечены статистически достоверные увеличение содержания в крови лейкоцитов, снижена активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови. При вскрытии животных выявлены увеличение коэффициентов относительной массы печени, свидетельствующих о развитии отечности.

Таким образом, у представленного образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП явлений материальной кумуляции не отмечено, но изменение некоторых показателей интоксикации, указанных выше, свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП.

#### 6.7. Оценка сенсибилизирующего действия.

Для выявления сенсибилизирующего действия биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП использовался метод воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. Между животными контрольной и опытной групп статистически достоверного различия не установлено.

Следовательно, у представленного на исследование образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП сенсибилизирующего действия не установлено.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ\*

1. Среднесмертельная однократная доза ( $DL_{50}$ ) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг. По существующей классификации ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» изученный образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП при однократном внутрижелудочном поступлении следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).
2. После однократной ингаляционной затравки в статических условиях при насыщающих концентрациях биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП раздражения дыхательных путей и признаков интоксикации не отмечено.
3. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-супер,СХП обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.
4. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-супер,СХП раздражающим действием на кожные покровы не обладает.
5. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-супер,СХП кожно-резорбтивным действием не обладает.

6. Кумулятивные свойства не выражены, но изменение некоторых показателей интоксикации (признаки лейкоцитоза, пониженная активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови, увеличение коэффициентов массы печени), свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП.
7. У исследуемого образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-супер,СХП сенсibiliзирующего действия не отмечено.

Заведующий отделом профилактической  
токсикологии, к. м. н.



Секретарев В.И.

Врач по санитарно-гигиеническим  
лабораторным исследованиям



Яндимирова С.С.

\* Свидетельство об аккредитации (Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения; обеспечение защиты прав потребителей и потребительского рынка) № 79-АК от 27.07.2011 г. Действительно до 01.03.2015 г.

Заключение по токсикологической оценке не может быть воспроизведено полностью  
или частично без письменного разрешения ИЛЦ  
Результаты испытаний распространяется только на образцы, прошедшие испытания

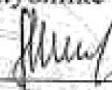
**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РЕСПУБЛИКЕ  
БАШКОРТОСТАН»  
АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР**

Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Шафиева д.7, тел 237-64-00, Факс 237-42-48  
ОКПО: 75824463, ОГРН: 1050204212255, ИНН/КПП: 0276090570/027601001

Аттестат аккредитации  
№ ГСЭН.RU.ЦОА.062  
№ РОСС RU.0001.510408 от 30.07.2008  
действителен до 30.07. 2013 г.  
Свидетельство об аккредитации № 79-АК  
от 27.07.2011 г.  
Действительно до 01.03.2015 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач ФБУЗ  
«Центр гигиены и эпидемиологии  
в Республике Башкортостан»

  
Г.Д. Минин  
«28» сентября 2012г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ Т-131

по токсикологической оценке

биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП

УФА – 2012 год

1. **Наименование продукции:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - гранд, СХП.
2. **Назначение продукции:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - гранд, СХП предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв и очистки водных объектов.
3. **Заявитель:** ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65.
4. **Нормативно – техническая документация:** ТУ 9291-001-33822935-2012 «Биопрепараты-нефтеструкторы «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® - гранд, СХП, «Ленойл»® - супер, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г). Технические условия.
5. **Общие положения:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - гранд, СХП представляет собой сухой порошок (СХП), в состав которого входит ассоциация жизнеспособных клеток микроорганизмов, растущих на нефти и дизельном топливе. В состав биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - гранд, СХП входят вегетативные клетки непатогенных штаммов культур. *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ – 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ – 5.3/2, *Pseudomonas* sp. ИБ – 4 и *Paenibacillus ehimensis* ИБ – 739.

#### 6. Токсикологические исследования.

Целью настоящих исследований является токсикологическая оценка образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - гранд, СХП с определением следующих параметров токсичности:

- установление параметров острой токсичности и класса опасности при внутрижелудочном поступлении;
- определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях;
- определение влияния на слизистые оболочки глаз;
- определение раздражающего действия на кожу;
- определение кожно-резорбтивного действия;
- определение кумулятивного действия;
- оценка sensibilizing действия.

Токсикологическая оценка образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - гранд, СХП проведена в соответствии со следующей нормативной документацией:

- МУ 4230-86 «Показатели токсикометрии, подлежащие определению на разных стадиях производства и применения химических веществ»;
- МУ 2163-80 «Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны»;



- МУ 2102-79 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи»;
- МУ 1.1.578-96 «Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию ПДК промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы»

#### **6.1. Установление параметров острой токсичности ( $DL_{50}$ ) и класса опасности при внутрижелудочном поступлении.**

Исследование токсичности биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП при однократном поступлении в желудок проводили на белых крысах. Препарат вводился в виде водной взвеси суспензии в максимальной дозе до 6,4 г/кг (в пересчете на основной препарат). Внешних признаков интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено. Среднесмертельная доза ( $DL_{50}$ ) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг.

Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» при однократном внутрижелудочном поступлении биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-гранд,СХП следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).

#### **6.2. Определение ингаляционной токсичности в статических условиях при насыщающих концентрациях.**

Однократная двухчасовая статическая ингаляционная заправка в условиях насыщающих концентраций образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП проводилась на белых мышах.

В указанных условиях моделирования в ходе заправки у животных признаков раздражения дыхательных путей и интоксикации не отмечено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не установлено.

#### **6.3. Определение влияния на слизистые оболочки глаз.**

Для изучения местного действия на слизистую оболочку глаз белых крыс вносили по 1 капле водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП. Результат учитывался в течение первых суток, через 48 и 72 часов. В первые часы после нанесения биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП отмечался быстрый спазм глазной щели, слезотечение и гиперемия слизистых оболочек глаз. Указанные явления проходили через 24 часа после нанесения.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП обладает раздражающим действием на слизистые оболочки глаз при однократном контакте.

#### **6.4. Определение раздражающего действия на кожу.**

Раздражающее действие биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП на кожу изучалось на белых крысах «пробирочным методом». После однократной экспозиции хвостов крыс в водной суспензии биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП признаков раздражения не отмечено. После повторных аппликаций (ежедневно, по 4 часа в течение 2-х недель) заметного раздражающего действия не отмечено.

Следовательно, образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП не обладает раздражающим действием на кожу при повторных аппликациях.

#### **6.5. Определение кожно-резорбтивного действия.**

Оценка кожно-резорбтивного действия проводилась методом «хвостовых» проб в течение 1 месяца на белых крысах. Время экспозиции – 4 часа ежедневно, за исключением выходных дней. Хвосты крыс размещались в водной взвеси биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП. В качестве показателей кожно-резорбтивного действия использовались:

- ❖ Общее состояние животных (активность и подвижность)
- ❖ Динамика массы тела.
- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)
- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

Таблица 1

Показатели кожно – резорбтивного действия  
биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®- гранд,СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
<i>Физиологические показатели</i>				
Масса тела: Фон	грамм	189,2±5,3	185,8±6,2	>0,05
Конец опыта		215,8±7,1	211,7±4,4	>0,05
Поведенческие реакции: - вертикальная подвижность - горизонтальная подвижность - «норковый» рефлекс - суммарная подвижность	усл. ед.	3,5±0,7 6,8±0,7 8,8±0,9 19,3±1,9	3,0±0,3 5,2±0,3 6,2±0,3 14,3±0,5	>0,05 >0,05 >0,05 >0,05
<i>Гематологические показатели</i>				
Эритроциты	млн/мл	9,74±0,16	10,08±0,12	>0,05
Гемоглобин	г/л	159,6±5,9	168,0±7,05	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	5,6±0,30	6,8±0,35	>0,05
<i>Биохимические показатели сыворотки крови</i>				
АЛТ	ммоль/ч.л	4,50±0,57	4,7±0,40	>0,05
SH – группы	мк·моль/ 100мл	46,6±1,4	43,6±1,3	>0,05
<i>Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)</i>				
* Печень	Относ.ед.	34,0±0,9	34,8±0,9	>0,05
* почки	Относ.ед.	5,8±0,1	6,5±0,4	>0,05
* селезенка	Относ.ед.	3,5±0,3	4,4±0,5	>0,05
* сердце	Относ.ед.	3,4±0,1	3,6±0,2	>0,05
* легкие	Относ.ед.	6,7±0,3	7,1±0,3	>0,05

В ходе эксперимента у животных опытной группы, по сравнению с контрольной) активность и подвижность не отличались. Признаков интоксикации не отмечено. Летальных исходов в ходе эксперимента не установлено. Статистически достоверной разницы в гематологических и биохимических показателях крови, как в опытной, так и в контрольной группах не зафиксировано. При патоморфологическом исследовании внутренних органов патологических изменений нет (табл. 1).

Таким образом, у образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП заметного кожно-резорбтивного действия не установлено.

#### 6.6. Оценка кумулятивных свойств.

Оценка кумулятивных свойств биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®- гранд,СХП проведена на беспородных белых крысах при

ежедневном введении в желудок 33% водной взвеси в дозе 1,0 г/кг массы тела (в пересчете на основное вещество). Продолжительность эксперимента – 1 месяц. В качестве показателей интоксикации использовались:

- ❖ Общее состояние животных (активность и подвижность)
- ❖ Динамика массы тела.
- ❖ О состоянии центральной нервной системы судили по поведенческим реакциям (вертикальная и горизонтальная подвижность, «норковый» рефлекс)
- ❖ Гематологические показатели крови (содержание эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов).
- ❖ Биохимические показатели крови (аланинаминотрансфераза, сульфгидрильные группы).
- ❖ Коэффициент массы внутренних органов и их макроскопическое исследование (печень, почки, селезенка, сердце, легкие).

В ходе подострого эксперимента летальных исходов не отмечено. После завершения 4-х недельной затравки у животных были сняты физиологические, гематологические, биохимические и морфологические показатели.

Таблица 2.  
Показатели кумулятивных свойств биопрепарата-нефтодеструктора «Ленойл»®- гранд, СХП

Показатели	Единица измерения	Контроль	Опыт	P
<b>Физиологические показатели</b>				
Масса тела: Фон	грамм	176,7±3,5	178,3±3,4	>0,05
Конец опыта		230,8±6,2	220,0±8,0	>0,05
Поведенческие реакции: - вертикальная подвижность	усл. ед.	1,2±0,2	1,0±0,2	>0,05
- горизонтальная подвижность		6,8±0,7	3,5±0,5	<0,05
- «норковый» рефлекс		7,5±1,2	4,0±0,5	>0,05
- суммарная подвижность		17,0±2,1	8,5±1,2	<0,05
<b>Гематологические показатели</b>				
Эритроциты	млн/мл	10,13±0,06	9,72±0,19	>0,05
Гемоглобин	г/л	142,7±3,9	134,8±5,8	>0,05
Лейкоциты	п·10 <sup>9</sup> /л	6,2±0,3	7,6±0,1	<0,05
<b>Биохимические показатели сыворотки крови</b>				
АЛТ	ммоль/ч.л	4,70±0,27	4,51±0,23	>0,05
SH – группы	мк·моль/ 100мл	47,6±1,4	48,6±2,3	>0,05

Морфологические показатели (коэффициенты массы внутренних органов)

* Печень	Относ.ед.	31,1±0,6	36,0±1,6	<0,05
* почки	Относ.ед.	6,1±0,2	7,3±0,3	>0,05
* селезенка	Относ.ед.	3,8±0,4	4,6±0,3	>0,05
* сердце	Относ.ед.	3,5±0,1	3,5±0,2	>0,05
* легкие	Относ.ед.	6,8±0,3	7,0±0,3	>0,05

Из таблицы 2 видно, что у крыс, получавших биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-гранд,СХП в течение 1 месяца, отмечены статистически достоверные увеличение содержания в крови лейкоцитов, снижена активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови. Одновременно у опытных животных отмечены изменения в поведенческих реакциях (снижена активность и подвижность). При вскрытии животных выявлены увеличение коэффициентов относительной массы печени, свидетельствующих о развитии отечности. Летальных исходов не установлено.

Таким образом, у представленного образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП явлений материальной кумуляции не отмечено, но изменение некоторых показателей интоксикации, указанных выше, свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП.

#### 6.8. Оценка сенсибилизирующего действия.

Для выявления сенсибилизирующего действия биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП использовался метод воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. Между животными контрольной и опытной групп статистически достоверного различия не установлено.

Следовательно, у представленного на исследование образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП сенсибилизирующего действия не отмечено.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ\*

1. Среднесмертельная однократная доза ( $DL_{50}$ ) биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП при внутрижелудочном поступлении составила более 6,4 г/кг. По существующей классификации ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Общие требования безопасности» изученный образец биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП при однократном внутрижелудочном поступлении следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное).

2. После однократной ингаляционной заправки в статических условиях при насыщающих концентрациях биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП раздражения дыхательных путей и признаков интоксикации не отмечено.
3. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-гранд,СХП обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.
4. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-гранд,СХП раздражающим действием на кожные покровы не обладает.
5. Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-гранд,СХП кожно-резорбтивным действием не обладает.
6. Кумулятивные свойства не выражены, но изменение некоторых показателей интоксикации (некоторые функциональные сдвиги в центральной нервной системе (поведенческие реакции), признаки лейкоцитоза, пониженная активность сульфгидрильных групп в сыворотке крови, увеличение коэффициентов массы печени), свидетельствует о реальной возможности развития хронического отравления при длительном поступлении в организм биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®,СХП.
7. У исследуемого образца биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-гранд,СХП сенсибилизирующего действия не отмечено.

Заведующий отделом профилактической  
токсикологии, к. м. н.



Секретарев В.И.

Врач по санитарно-гигиеническим  
лабораторным исследованиям



Яндимирова С.С.

\* Свидетельство об аккредитации (Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения; обеспечение защиты прав потребителей и потребительского рынка) № 79-АК от 27.07.2011 г. Действительно до 01.03.2015 г.

Заключение по токсикологической оценке не может быть воспроизведено полностью или частично без письменного разрешения ИЛЦ  
Результаты испытаний распространяется только на образцы, прошедшие испытания

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН»  
АККРЕДИТОВАННЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР**

Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Шафиева д.7, тел 237-64-00, Факс 237-42-48  
ОКПО: 75824463, ОГРН: 1050204212255, ИНН/КПП: 0276090570/027601001

Аттестат аккредитации испытательной  
лаборатории (центра) № РОСС RU.0001.510408.  
Срок действия аттестата аккредитации  
с 11.06.2014г. по 22.07.2018г.  
Аттестат аккредитации органа инспекции  
№ RA.RU.710014  
выдан 27 апреля 2015 г.

  
УТВЕРЖДАЮ  
Главный врач ФБУЗ  
«Центр гигиены и эпидемиологии  
в Республике Башкортостан»  
А.А. Казак.  
« \_\_\_\_\_ » 2016 г.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ 9763**

**по токсикологической оценке**

**Биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - NORD,**

**СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г)**

УФА – 2016 г.

1. **Наименование продукта:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г);
2. **Назначение продукта:** предназначен для биологической обработки нефтезагрязненных почв, грунтов, водных поверхностей с целью ускорения биоразложения нефти, восстановления продуктивности рекультивируемых почв и очистки водных объектов в условиях низких положительных температур Крайнего севера и Западной Сибири;
3. **Заявитель:** ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65;
4. **Акт отбора проб:** от 01.07.2016 г. ЗАО НПП «Биомедхим»;
5. **Нормативно-техническая документация:** ТУ 9291-007-33822935-2016 «Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г). Технические условия» с изменением № 1;
6. **Общие положения:** Биопрепарат – нефтеструктор «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) по внешнему виду порошок светло-кремового цвета.

**7. Токсикологические исследования.**

8. Целью настоящих исследований является токсикологическая оценка образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) с определением следующих параметров:

Токсикологические показатели:

- установление параметров острой токсичности и класса опасности при внутрижелудочном поступлении;
- определение ингаляционной токсичности в статических условиях;
- определение влияния на слизистые оболочки глаз;
- определение кожно-раздражающего действия;
- сенсibiliзирующее действие.

Токсикологические исследования образца биопрепарата – нефтеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) проведены на основании направления отделения гигиены труда ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан» от 15 июля 2016 года в соответствии со следующей нормативной документацией:

- МУ 4230-86 «Показатели токсикометрии, подлежащие определению на разных стадиях производства и применения химических веществ»;
- МУ 2163-80 «Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны»;
- МУ 2102-79 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи»;



- МУ 1.1.578-96 «Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию ПДК промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы».
- ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности;

### **7.1. Установление параметров острой токсичности (ДЛ<sub>50</sub>) и класса опасности при внутрижелудочном поступлении.**

Исследование острой токсичности образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) при однократном поступлении в желудок проводили на белых крысах. Для внутрижелудочного введения образец биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) растворяли в дистиллированной воде. Клиническая картина отравления в первые сутки после введения выражалась в угнетенном состоянии животных, отказе от пищи, малоподвижности. Летальные исходы не отмечены.

Среднесмертельная доза (ДЛ<sub>50</sub>) образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) при однократном поступлении в желудок белым крысам составила более 5000 мг/кг. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» при внутрижелудочном поступлении исследуемый образец биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) следует отнести к 4 классу опасности (малоопасное вещество).

### **7.2. Определение ингаляционной токсичности в статических условиях.**

Однократная двухчасовая статическая ингаляционная затравка в условиях насыщающих концентраций образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) проводилась на белых мышах.

В указанных условиях моделирования у подопытных животных в ходе затравки признаков раздражения дыхательных путей и клинических признаков интоксикации не установлено. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не отмечено.

### **7.3. Определение влияние на слизистые оболочки глаз.**

Для изучения местного действия образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) готовили водную вытяжку и наносили на конъюнктиву глаза белым крысам. Результат исследований учитывался в течение первых суток, через 48 и 72 часа. После однократного нанесения образца биопрепарата – нефтедеструктора

«Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) отмечались слезотечение и слабая гиперемия слизистых оболочек (1 балл). Признаки гиперемии проходили через 5-6 часов после нанесения. Через 24, 48 и 72 часа следов гиперемии не отмечено.

Следовательно, образец биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз при однократном контакте (1 балл).

#### 7.4. Определение кожно-раздражающего действия.


Раздражающее действие образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) на кожу изучалось на белых крысах «пробирочным методом». Для проведения эксперимента по выявлению кожно-раздражающего действия готовили водную вытяжку образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г). После однократной экспозиции в данном образце признаков раздражения не отмечено. После повторных аппликаций (ежедневно, по 4 часа в течение 2-х недель) наблюдаются признаки сухости кожных покровов хвостов.

Следовательно, образец биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) обладает слабым раздражающим действием на неповрежденную кожу при повторных аппликациях (1 балл).

#### 7.5. Оценка сенсibiliзирующего действия.

Для оценки сенсibiliзирующего действия образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) использовался метод воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. Среднегрупповой показатель ГЗТ контрольной группы составил  $11,4 \pm 1,3\%$ , а опытной группы  $13,5 \pm 2,0\%$ . Критерий  $t$  (критерий Стьюдента), вычисленный на основании экспериментальных данных ( $t^0=0,9$ ), меньше табличного ( $t^T=2,10$ ) при доверительной вероятности 0,95.

Следовательно, у представленного на исследование образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) сенсibiliзирующего действия не отмечено.

Зав. отделом санитарно-гигиенических исследований  Т.А.Васильева

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Среднесмертельная однократная доза образца биопрепарата – нефтедеструктора «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г)

- при внутрижелудочном поступлении составила более 5000 мг/кг. По существующей классификации ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» изученный образец биопрепарата – нефтеструктура «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) следует отнести к 4 классу опасности (вещество малоопасное);
2. После однократной статической ингаляционной затравки в условиях насыщающих концентраций образец биопрепарата – нефтеструктура «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) не вызывает признаков раздражения дыхательных путей и клинических признаков интоксикации. В последующий стандартный срок наблюдения (2 недели) летальных исходов не отмечено;
  3. Образец биопрепарата – нефтеструктура «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) обладает слабым раздражающим действием на слизистые оболочки глаз при однократном контакте (1 балл);
  4. Образец биопрепарата – нефтеструктура «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) обладает слабым раздражающим действием на кожные покровы при повторных аппликациях (1 балл);
  5. У исследуемого образца биопрепарата – нефтеструктура «Ленойл»® - NORD, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г) сенсibiliзирующего действия не отмечено при воспроизведении реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Зав. отделением гигиены труда



С.К. Иванова

ОКП 92 9197

Группа С 05

УТВЕРЖДАЮ  
 Генеральный директор  
 ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н.  
 И. М. Султанов  
 «13» июня 2012 г.



**Биопрепараты - нефтеструкторы «Ленойл»® , СХП, «Ленойл» ®  
 – гранд, СХП и «Ленойл» ® – супер, СХП  
 (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г)**


**ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ****ТУ 9291-001-33822935-2012**

Вводятся впервые

Дата введения «    » \_\_\_\_\_ 2012 г.

## СОГЛАСОВАНО

Учреждение Российской академии  
 наук Институт биологии  
 Уфимского научного центра РАН  
 Зав. лабораторией биологически  
 активных веществ, д.б.н., проф.  
 О.Н. Логинов  
 «13» июня 2012 г.




## РАЗРАБОТАНО

ЗАО НПП «Биомедхим», зав.  
 лабораторией промышленной  
 микробиологии, к.б.н.  
 Е.А. Столярова  
 «13» июня 2012 г.



ЗАО НПП «Биомедхим», зав.  
 контрольно-аналитической  
 лабораторией, к.б.н.  
 С.П. Четвериков  
 «13» июня 2012 г.



ЗАО НПП «Биомедхим»

Начальник ПТО, к.б.н.

Н.В. Кобызева

«13» июня 2012 г.

ОКП 92 9197

ОКС 07.100.99

УТВЕРЖДАЮ  
 Генеральный директор  
 ЗАО НИП «Биомедхим», к.б.н.  
 И. М. Султанов  
 «10» февраля 2014 г.



Извещение №1

об изменении ТУ 9291-001-33822935-2012

**Биопрепараты - нефтедеструкторы «Ленойл»® , СХП, «Ленойл» ®  
 – гранд, СХП и «Ленойл» ® – супер, СХП  
 (титр не менее 1 × 10<sup>8</sup> КОЕ/г)**

Дата введения «10» февраля 2014 г.

СОГЛАСОВАНО

Учреждение Российской академии наук  
 Институт биологии  
 Уфимского научного центра РАН  
 Зав. лабораторией биологически  
 активных веществ, д.б.н., проф.  
 О.Н. Логинов  
 «10» февраля 2014 г.



Старший научный сотрудник лабора-  
 тории биологически активных  
 веществ, к.б.н.  
 Т.Ю. Коршунова  
 «10» февраля 2014 г.

РАЗРАБОТАНО

ЗАО НИП «Биомедхим», зав.  
 лабораторией промышленной  
 микробиологии, к.б.н.  
 Е.А. Столярова  
 «10» февраля 2014 г.



ЗАО НИП «Биомедхим», зав.  
 контрольно-аналитической  
 лабораторией, к.б.н.  
 С.П. Четвериков  
 «10» февраля 2014 г.



ЗАО НИП «Биомедхим»  
 Начальник ПТО, к.б.н.  
 Н.В. Кобызева  
 «10» февраля 2014 г.

Федеральное агентство  
 по техническому регулированию и метрологии  
 ФБУ «ЦСМ Республики Башкортостан»  
 Внесен в реестр 10.02.14  
 За № 058/017/2014/01  
 Директор А.М. Муратшин

Уфа 2014

ОКП 92 9197

ОКС 07.100.99

УТВЕРЖДАЮ  
 Генеральный директор  
 ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н.  
 И. М. Султанов  
 «19» 11 2014 г.




**Биопрепарат - нефтедеструктор «Ленойл» ® – NORD, СХП  
 (титр не менее 1 × 10<sup>8</sup> КОЕ/г)**

**ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ  
 ТУ 9291-007-33822935-2014  
 Вводятся впервые**

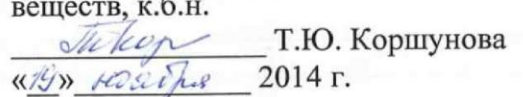
Дата введения «10» декабря 2014 г.

**СОГЛАСОВАНО**

Учреждение Российской академии  
 наук Институт биологии  
 Уфимского научного центра РАН  
 Зав. лабораторией биологически  
 активных веществ, д.б.н., проф.  
 О.Н. Логинов  
 «19» ноября 2014 г.



Старший научный сотрудник лабора-  
 тории биологически активных  
 веществ, к.б.н.  
 Т.Ю. Коршунова  
 «19» ноября 2014 г.



**РАЗРАБОТАНО**

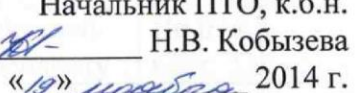
ЗАО НПП «Биомедхим», зав.  
 лабораторией промышленной  
 микробиологии, к.б.н.  
 Е.А. Столярова  
 «19» ноября 2014 г.



ЗАО НПП «Биомедхим», зав.  
 контрольно-аналитической  
 лабораторией, д.б.н.  
 С.П. Четвериков  
 «19» ноября 2014 г.



ЗАО НПП «Биомедхим»  
 Начальник ПТО, к.б.н.  
 Н.В. Кобызева  
 «19» ноября 2014 г.



Федеральное агентство  
 по техническому регулированию и метрологии  
 ФБУ «ЦСМ Республики Башкортостан»  
 Внесен в реестр 10.12 2014 г.  
 За № 056/012403  
 Директор А.М. Муратшин



Уфа 2014

**СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р**  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**



# СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

№ РОСС RU.НА34.Н04574

Срок действия с 24.05.2018

по 23.05.2021

№ 0103729

**ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ**

RA.RU.11НА34

Орган по сертификации продукции ООО "Вега" Адрес: 248033, РОССИЯ, Калужская область, Калуга, Первый академический проезд, дом 5, корпус 1Д. Телефон 8-909-356-1455, адрес электронной почты: veга.infor@yandex.ru

**ПРОДУКЦИЯ**

Биопрепараты - нефтеструктуры торговой марки «Ленойл»®. Серийный выпуск.

код ОК  
21.20.23

**СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ**

ТУ 9291-001-33822935-2012, ГОСТ 15846-2002

код ТН ВЭД  
3002 90 500 0

**ИЗГОТОВИТЕЛЬ** Закрытое акционерное общество Научно-производственное предприятие «Биомедхим». ОГРН: 1040204590183, ИНН: 0278099673. Адрес: 450029, РОССИЯ, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, д. 65/11 офис 2, телефон/факс: (347) 264-02-29/ 240-23-22, адрес электронной почты: elena-azolen@yandex.ru.

**СЕРТИФИКАТ ВЫДАН** Закрытое акционерное общество Научно-производственное предприятие «Биомедхим». ОГРН: 1040204590183, ИНН: 0278099673. Адрес: 450029, РОССИЯ, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, д. 65/11 офис 2, телефон/факс: (347) 264-02-29/ 240-23-22, адрес электронной почты: elena-azolen@yandex.ru

**НА ОСНОВАНИИ** Протокол испытаний № 2393-ИТЛ/ВР-2018 от 23.05.2018 Испытательная лаборатория ООО «ПромТехСтандарт» аттестат аккредитации № РОСС RU.31391.04ИБФ0.В08 выдан 18.09.2016

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Схема сертификации: 3



Руководитель органа

*А.Н. Золотов*  
подпись

А.Н. Золотов

инициалы, фамилия

Эксперт

*А.А. Белянин*  
подпись

А.А. Белянин

инициалы, фамилия

Сертификат не применяется при обязательной сертификации

**СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р**  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**



## СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

№ РОСС RU.ПЦ01.Н05032

Срок действия с 26.07.2016

по 25.07.2019

№ **2109515**

**ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ** рег. № RA.RU.11ПЦ01

Орган по сертификации продукции "Контур" ООО "Контур-Сертификация"

Место нахождения: Российская Федерация, 101000, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 41, стр. 4. Фактический адрес:

Российская Федерация, 101000, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 41, стр. 4. Телефон (495) 665-21-90

Адрес электронной почты: info@kontur-rus.ru

**ПРОДУКЦИЯ** Биопрепарат-нефтедеструктор «Ленойл»®-NORD. Серийный выпуск по ТУ 9291-007-33822935-2014.

код ОК 005 (ОКП):

92 9197

**СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ**

ТУ 9291-007-33822935-2014, ГОСТ 15846-2002

код ТН ВЭД России:

3002 90 500 0

**ИЗГОТОВИТЕЛЬ** Закрытое акционерное общество НПП «БИОМЕДХИМ»

ОГРН: 1040204590183, ИНН: 0278099673, КПП: 027701001. Адрес: 450029, Россия, Республика Башкортостан, г.

Уфа, ул. Ульяновых, д. 65. Телефон: (347) 264-02-29, Факс: (347) 240-23-22, E-mail: bmch@inbox.ru.

**СЕРТИФИКАТ ВЫДАН** Закрытое акционерное общество НПП «БИОМЕДХИМ»

ОГРН: 1040204590183, ИНН: 0278099673, КПП: 027701001. Адрес: 450029, Россия, Республика Башкортостан, г.

Уфа, ул. Ульяновых, д. 65. Телефон: (347) 264-02-29, Факс: (347) 240-23-22, E-mail: bmch@inbox.ru.

**НА ОСНОВАНИИ** Протокола испытаний № 5628-1015 от 25.07.2016 года, Испытательного центра "ХимПромТест" аттестат № 875/77-879 от 25.11.2015 года.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

Схема сертификации: 3



Руководитель органа

*[Signature]*  
подпись

С.А. Никифоров  
инициалы, фамилия

Эксперт

*[Signature]*  
подпись

И.А. Александрова  
инициалы, фамилия

Сертификат не применяется при обязательной сертификации



Закрытое акционерное общество  
Научно-производственное предприятие «Биомедхим»

«Утверждаю»

Генеральный директор  
ЗАО НПЦ «Биомедхим», к.б.н.  
И. М. Султанов  
«24» ноября 2014 г.



ВНУТРЕННИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ  
на получение биопрепарата «Ленойл» ®, СХП, «Ленойл» ® - гранд, СХП,  
«Ленойл» ® - супер, СХП (титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г)  
(ТУ 9291-001-33822935 – 2012 г.)

Для внутреннего пользования  
Экземпляр №1

СОГЛАСОВАНО

РАЗРАБОТАНО

Зав. лабораторией биологически-  
активных веществ  
ФГБУН ИБ УНЦ РАН, д.б.н.

О.Н. Логинов  
2014 г.



Зав. контрольно - аналитической  
лабораторией  
ЗАО НПЦ «Биомедхим», д.б.н.

С.П. Четвериков  
«24» ноября 2014 г.

Зав. лабораторией промышленной  
микробиологии  
ЗАО НПЦ «Биомедхим», к.б.н.

Е.А. Столярова  
«24» ноября 2014 г.



С.н.с. лаборатории биологически  
активных веществ  
ФГБУН ИБ УНЦ РАН, к.б.н.

Т.Ю. Коршунова  
«24» ноября 2014 г.

Уфа 2014

Закрытое акционерное общество  
Научно-производственное предприятие «Биомедхим»

«Утверждаю»  
Генеральный директор  
ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н.  
И. М. Султанов  
«15» декабря 2014 г.



ВНУТРЕННИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ  
на получение биопрепарата «Ленойл»® - NORD, СХП  
(титр не менее  $1 \times 10^8$  КОЕ/г)  
(ТУ 9291-007-33822935-2014)

Для внутреннего пользования  
Экземпляр №1

СОГЛАСОВАНО

РАЗРАБОТАНО

Зав. лабораторией биологически-  
активных веществ  
ФГБУН УИБ РАН, д.б.н.

  
О.Н. Логинов  
«15» декабря 2014 г.



Зав. контрольно - аналитической  
лабораторией  
ЗАО НПП «Биомедхим», д.б.н.

  
С.П. Четвериков  
«15» декабря 2014 г.

Зав. лабораторией промышленной  
микробиологии  
ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н.

  
Е.А. Столярова  
«15» декабря 2014 г.



С.н.с. лаборатории биологически  
активных веществ  
ФГБУН УИБ РАН, к.б.н.

  
Т.Ю. Коршунова  
«15» декабря 2014 г.

Уфа 2014

УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор  
 ЗАО НПП «Биомедхим»  
 \_\_\_\_\_ Логина Е.В.  
 « 30 » ноября 2018 г.



## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований, полученных в ходе выполнения диссертационной работы Коршуновой Татьяны Юрьевны на тему: «Микробиологические технологии ликвидации нефтезагрязнений в различных климатических условиях» для производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл» ®

**Наименование предложения для внедрения:** технология производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл» ®.

**Кем предложено, адрес исполнителя:** Коршуновой Т.Ю., старшим научным сотрудником лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054, г. Уфа, проспект Октября, д. 69.

**Где и когда внедрено:** в производственном цехе закрытого акционерного общества научно-производственного предприятия «Биомедхим» (ЗАО НПП «Биомедхим», 450029, г. Уфа, ул. Ульяновых, д. 65/11) с июня 2012 г.

**Эффективность внедрения:** разработанная технология производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл» ® позволяет получать указанные биопрепараты в полном соответствии с техническими условиями и в достаточном количестве, как в жидкой, так и в сухой препаративной форме. За годы производства было получено 384200 л препаратов в жидком виде и 75210 кг – в сухом виде.

Ответственные за внедрение:

Зам. генерального директора по развитию

Т.К. Давлетшин

Заведующая лабораторией  
 промышленной микробиологии, к.б.н.

Е.А. Столярова

**СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ  
«ПРОМТЕХСТАНДАРТ»**

№ РОСС RU.31391.04ИБФ0 в едином реестре зарегистрированных систем добровольной сертификации

## СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ



Регистрационный номер РОСС RU.31391.04ИБФ0.564

Срок действия с 25.10.2018 по 24.10.2021

0013908

**ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ**

№ РОСС RU.31391.04ИБФ0

Общество с ограниченной ответственностью «Сертификат РБ»

Республика Башкортостан, 450027, г. Уфа, ул. Индустриальное шоссе, дом 112/1, офис 408,  
тел. : +7 (347) 248-29-11, +7 (347) 246-51-32, +7 987 247-89-47, факс: +7 (347) 246-51-32, email: 2482911@mail.ru

### ВЫДАН

**Закрытое акционерное общество**

**Научно-производственное предприятие «Биомедхим»**

ИНН: 0278099673 ОГРН: 1040204590183

Юридический адрес: 450029, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа,  
ул. Ульяновых, 65/11, офис 2

### НАСТОЯЩИЙ СЕРТИФИКАТ УДОСТОВЕРЯЕТ, ЧТО СИСТЕМА МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА

применительно к видам работ: производство биопрепаратов экологического назначения  
(биопрепараты – нефтеструктуры «Ленойл» ® и прочие), производство биопрепаратов для  
сельского хозяйства, производство биопрепаратов бытового назначения.

### СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ СТАНДАРТА

### ГОСТ Р ИСО 9001-2015 (ISO 9001:2015)

Выдан на основании решения экспертной комиссии,  
протокол № РОСС RU.04ИБФ0.564П от 25.10.2018



Проверка  
подлинности  
сертификата  
соответствия



**Руководитель органа**

подпись

**А.Ф. Ахметзянов**

инициалы, фамилия

**Эксперт**

подпись

**К.В. Фокина**

инициалы, фамилия

Настоящий сертификат соответствия обязывает организацию поддерживать состояние выполняемых работ в соответствии с вышеуказанным стандартом, что будет находиться под контролем органа по сертификации системы добровольной сертификации «ПромТехСтандарт» и подтверждаться при прохождении ежегодного инспекционного контроля



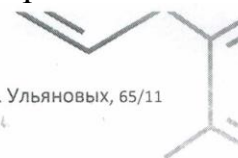
ЗАО НПП «Биомедхим»

Адрес: 450029, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65/11

Тел./факс: (347) 264-02-29, 240-23-22

E-mail: elena-azolen@yandex.ru

Web: [www.biomedhim.ru](http://www.biomedhim.ru)



ИНН 0278099673; КПП 027701001; Р/С 40702810700810001232 в филиале ПАО «Банк УралСиб» г. Уфа,

к/с 30101810600000000770 БИК 048073770

Исх. № 0275 от «30» ноября 2018 г.

### СПРАВКА

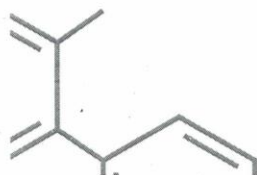
За период с 15 июня 2012 г. по 30 ноября 2018 г. произведено и продано биопрепаратов серии «Ленойл» ® в жидком виде – 384 200 л, в сухом виде – 75 210 кг.

Основными покупателями продукции были следующие организации: ПАО «Орскнефтеоргсинтез» (г.Орск), ПАО «Сургутнефтегаз» (г.Сургут), ПАО «Татнефть» (г.Альметьевск), ООО «СпецПромЭкология» (г.Красноярск), ООО «ЭКО-СПАС БАТАЙСК» (г.Ростов-на-Дону), ООО "Томскнефть-Сервис" (г.Томск), ООО «САНЭКО» (г.Уфа), ООО «Чепецкнефтепродукт» (г. Кирово-Чепецк), ТОО «Аксенгир» (г.Актау, Республика Казахстан), ТОО «НШТ «СК» (г.Жанаозен, Республика Казахстан), ООО «Рада-Трейд» (г.Уфа), ООО «Биохим-реагент» (г.Уфа), ООО «Альянс 2000» (г.Казань).

Главный бухгалтер



Аксенова О.А.



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2303061

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS**

Патентообладатель(ли): *Закрытое акционерное общество  
научно-производственное предприятие "Биомедхим" (ЗАО  
НПП "Биомедхим") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2005127843

Приоритет изобретения 06 сентября 2005 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре  
изобретений Российской Федерации 20 июля 2007 г.

Срок действия патента истекает 06 сентября 2025 г.

*Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной  
собственности, патентам и товарным знакам*

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 303 061** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005127843/13, 06.09.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.09.2005

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2007

(45) Опубликовано: 20.07.2007 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: СИДОРОВ М.А., СКОРОДУМОВ Д.И., ФЕДОТОВ В.Б. Справочник. Определитель зоопатогенных микроорганизмов. - М.: КОЛОС, 1995, с.168. RU 2203945 C1, 17.08.2001. SU 644824 A1, 30.01.1979. MD 2341 C2, 24.07.2001. RU 2213774 C1, 10.10.2003. RU 2130265 C1, 20.05.1999.

Адрес для переписки:

450071, г.Уфа, ул. Менделеева, 213/1, ЗАО  
научно-производственное предприятие  
"Биомедхим", Р.М. Шайнурову

(72) Автор(ы):

Логинов Олег Николаевич (RU),  
Силищев Николай Николаевич (RU),  
Коршунова Татьяна Юрьевна (RU),  
Четвериков Сергей Павлович (RU),  
Асабина Елена Антоновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество научно-  
производственное предприятие "Биомедхим"  
(ЗАО НПП "Биомедхим") (RU)

(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано при культивировании бактерий Pseudomonas. Питательная среда содержит в качестве источника аминокислот

автолизат отработанных дрожжей 7-8 генерации,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  и водопроводную воду. Изобретение позволяет увеличить выход биомассы бактерий рода Pseudomonas. 2 табл.

RU 2 3 0 3 0 6 1 C 2

RU 2 3 0 3 0 6 1 C 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2539148

**СПОСОБ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ НЕФТИ В УСЛОВИЯХ  
НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР  
ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *Pseudomonas*  
sp. ИБ-1.1**

Патентообладатель(ли): *Закрытое акционерное общество научно-производственное предприятие "Биомедхим" (ЗАО НПП "Биомедхим") (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра РАН (ФГБУН ИБ УНЦ РАН) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013138963

Приоритет изобретения 20 августа 2013 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 26 ноября 2014 г.

Срок действия патента истекает 20 августа 2033 г.

*Врио руководителя Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

Л.Л. Кирий





РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 539 148** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК  
*B09C 1/10* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12R 1/38* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013138963/13, 20.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.08.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 20.08.2013

(45) Опубликовано: 10.01.2015 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2378060 C2, 10.01.2010 . RU  
2067993 C1, 20.10.1996. US 6313374 B1,  
06.11.2001. . . . .

Адрес для переписки:

450029, г.Уфа, ул. Ульяновых, 65, ЗАО НПП  
"Биомедхим", Султанову И.М.

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество научно-  
производственное предприятие "Биомедхим"  
(ЗАО НПП "Биомедхим") (RU),  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биологии  
Уфимского научного центра РАН (ФГБУН  
ИБ УНЦ РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ НЕФТИ В УСЛОВИЯХ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ  
ТЕМПЕРАТУР ПСИХРОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
биотехнологии защиты окружающей среды, в  
частности к способам очистки почв от нефтяных  
загрязнений в сокращенные сроки в условиях  
низких положительных температур. Способ  
включает внесение в почву суспензии микробного

препарата на основе суспензии  
психротолерантного штамма бактерий  
*Pseudomonas* sp. ИБ 1.1, с титром не менее  $2,0 \cdot 10^8$   
КОЕ/мл. Изобретение позволяет за 1 месяц  
провести биодegradацию нефти со степенью  
деструкции углеводов свыше 90%. 1 табл.

RU 2 539 148 C 1

RU 2 539 148 C 1

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2553540

**КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ  
Acinetobacter SP. И Ochrobactrum SP., ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ  
ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ И ПОЧВЫ ОТ НЕФТИ И  
НЕФТЕПРОДУКТОВ**

Патентообладатель(ли): *Закрытое акционерное общество научно-производственное предприятие "Биомедхим" (ЗАО НПП "Биомедхим") (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Уфимского научного центра РАН (ФГБУН ИБ УНЦ РАН) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012151289

Приоритет изобретения **29 ноября 2012 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **20 мая 2015 г.**

Срок действия патента истекает **29 ноября 2032 г.**

*Врио руководителя Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

*Л.Л. Кирий*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 553 540** (13) **C2**

(51) МПК  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C02F 3/34* (2006.01)  
*B09C 1/10* (2006.01)  
*C02F 101/32* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012151289/10, 29.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2012

(43) Дата публикации заявки: 10.06.2014 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 20.06.2015 Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2232806 C2, 20.07.2004. KZ 23423  
A4, 15.12.2010. RU 2107722 C1, 27.03.1998. RU  
2067993 C1, 20.10.1996

Адрес для переписки:

450029, г.Уфа, ул. Ульяновых, 65, Закрытое  
акционерное общество научно-производственное  
предприятие "Биомедхим", Султанову И.М.

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество научно-  
 производственное предприятие "Биомедхим"  
 (ЗАО НПП "Биомедхим") (RU),  
 Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение науки Институт биологии  
 Уфимского научного центра РАН (ФГБУН  
 ИБ УНЦ РАН) (RU)

(54) КОНСОРЦИУМ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ *Acinetobacter* sp. И *Ochrobactrum* sp.,  
ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ И ПОЧВЫ ОТ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано при биологической очистке воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. Предложен консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ВКМ В-2753D и *Ochrobactrum* sp. ВКМ В-2754D,

обладающий нитрогеназной активностью. Консорциум способен к фиксации атмосферного азота и обладает высокой утилизирующей способностью по отношению к нефти и нефтепродуктам при их высоком содержании в субстрате. 1 табл., 3 пр.

RU 2 553 540 C 2

RU 2 553 540 C 2

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2627598

СПОСОБ ОЧИСТКИ ВОДНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ  
НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Патентообладатели: *Закрытое акционерное общество научно-производственное предприятие "Биомедхим" (ЗАО НПП "Биомедхим") (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук (УИБ РАН) (RU)*

Авторы: *Коришупова Татьяна Юрьевна (RU), Четвериков Сергей Павлович (RU), Логинов Олег Николаевич (RU)*

Заявка № 2015157018

Приоритет изобретения 29 декабря 2015 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений


Российской Федерации 09 августа 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 29 декабря 2035 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 627 598**<sup>(13)</sup> **C2**(51) МПК  
C12N 1/20 (2006.01)  
C02F 3/34 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015157018, 29.12.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.12.2015Дата регистрации:  
09.08.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.12.2015

(43) Дата публикации заявки: 05.07.2017 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 09.08.2017 Бюл. № 22

Адрес для переписки:

450029, г. Уфа, ул. Ульяновых, 65, п/я 10,  
Закрытое акционерное общество Научно-  
производственное предприятие "Биомедхим",  
Султанову И.М.

(72) Автор(ы):

Коршунова Татьяна Юрьевна (RU),  
Четвериков Сергей Павлович (RU),  
Логинов Олег Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество  
научно-производственное предприятие  
"Биомедхим" (ЗАО НПП "Биомедхим") (RU),  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Уфимский Институт  
биологии Российской академии наук (УИБ  
РАН) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2241032 С2, 27.11.2004.КОРШУНОВА Т.Ю.,  
МУХАМАТДЬЯРОВА С.Р., ЛОГИНОВ  
О.Н. Консорциум микроорганизмов,  
окисляющий нефтяные углеводороды,  
Вестник Башкирского Университета, 2013,  
т.18, N 3, стр. 734-735. КОРШУНОВА Т.Ю.,  
МУХАМАТДЬЯРОВА С.Р., ЛОГИНОВ  
О.Н. Консорциум микроорганизмов-  
нефтедеструкторов, IX Молодежная школа-  
конференция с Международным (см.  
прод.)

## (54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ВОДНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и  
может быть использовано для очистки водных  
поверхностей от нефтяного загрязнения. Способ  
предусматривает внесение в водный объект  
микробного препарата на основе консорциума  
микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ 5.1/1 и  
*Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ 5.3/2 с титром не менее10<sup>8</sup> КОЕ/мл в культуральной жидкости. При этом  
процесс очистки осуществляют при помощи  
аэрации водного объекта. Изобретение позволяет  
сократить сроки и повысить эффективность  
очистки водных объектов от нефтяных  
загрязнений. 2 пр.

(56) (продолжение):

участием "Актуальные аспекты современной микробиологии", Тезисы, М, 21-23 октября 2013  
года, стр.39-41. КОРШУНОВА Т.Ю., МУХАМАТДЬЯРОВА С.Р., ЛОГИНОВ О.Н. Свойства и  
филогенетическое положение бактерии *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, Известия Самарского  
научного центра РАН, 2013, т.15, N 3(5), стр.1645-1648. КОРШУНОВА Т.Ю.,  
МУХАМАТДЬЯРОВА С.Р., ЛОГИНОВ О.Н. Окислительная и нитрогеназная активность

RU 2 6 2 7 5 9 8 C 2

RU 2 6 2 7 5 9 8 C 2

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Кобызева, Н.В. Использование биопрепарата «Ленойл» для локальной очистки производственных сточных вод, загрязненных углеводородами и их производными / Н.В. Кобызева, **Т.Ю. Коршунова**, Н.Н. Силищев, О.Н. Логинов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – № 75. – С. 161-163. ИФ 0,373
2. Четвериков, С.П. Биоремедиация замазученного грунта с помощью микробиологических препаратов / С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, Э.Р. Гареева, М.Д. Бакаева, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Вестник Башкирского университета. – 2013. – № 3. – С. 723-725. ИФ 0,283
3. **Коршунова, Т.Ю.** Консорциум микроорганизмов, окисляющий нефтяные углеводороды / **Коршунова Т.Ю.**, Мухаматдьярова С.Р., Логинов О.Н. // Вестник Башкирского университета. – 2013. – № 3. – С. 734-735. ИФ 0,283
4. **Коршунова, Т.Ю.** Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ohrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1637-1640. ИФ 0,240
5. **Коршунова, Т.Ю.** Свойства и филогенетическое положение бактерии *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1645-1648. ИФ 0,240
6. **Коршунова, Т.Ю.** Опыт применения консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводов для обезвреживания нефтеотходов / **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. – URL: <http://www.science-education.ru/117-13407>. ИФ 0,358
7. **Коршунова, Т.Ю.** Уточнение таксономического статуса бактерии-нефтедеструктора масс-спектрометрическими методами по результатам анализа клеточных белков и исследования состава жирных кислот / **Т.Ю. Коршунова**,

С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – № 3. – С. 272-277. Scopus, ИФ 0,893

8. **Коршунова, Т.Ю.** Влияние бактериальных препаратов на содержание нефтепродуктов и численность микроорганизмов в отвалах отработанной отбеливающей глины / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Экология и промышленность России.– 2016. – Т. 20, № 2. – С. 25-31. Scopus, ИФ 0,423

9. **Коршунова, Т.Ю.** Влияние углеводородокисляющих микроорганизмов на деградацию нефти в песчаном грунте / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – № 1. – С. 45-51. ИФ 0,207

10. **Коршунова, Т.Ю.** Биотехнологический потенциал бактерии *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 как основы полифункционального биопрепарата / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, О.Н. Логинов // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 1. – С. 93-99. ИФ 0,168

11. **Коршунова, Т.Ю.** Перспективы использования консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязненной почвы Крайнего Севера / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Теоретическая и прикладная экология. – 2016. – № 1. – С. 88-94. Scopus, ИФ 0,253

12. Рафикова, Г.Ф. Новый штамм бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 как перспективный агент биологического контроля фитопатогенов / Г.Ф. Рафикова, **Т.Ю. Коршунова**, Л.Ф. Миннебаев, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 317-326. WoS, Scopus, ИФ 1,489

13. **Korshunova, T.Y.** *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov., isolated from oil-contaminated soils / T.Y. Korshunova, M.-H. Ramírez-Bahena, S.P. Chetverikov, J.M. Igual, A. Peix, O. Loginov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66, № 11. – P. 4657-4664. WoS, Scopus, IF 2,134

14. **Коршунова, Т.Ю.** Молекулярно-генетическая и хемотаксономическая идентификация бактерии рода *Ochrobactrum*, обладающей нефтеокисляющей и азотфиксирующей активностью / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2017. – № 5. – С. 507-515. Scopus, ИФ 0,893

15. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологические исследования биопрепарата для деструкции нефти / **Т.Ю. Коршунова, О.Н. Логинов** // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 2. – С. 45-49. ИФ 0,207

16. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологическая оценка биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»® / **Т.Ю. Коршунова, О.Н. Логинов** // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 3. – С. 47-51. ИФ 0,207

17. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологическая оценка биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-NORD, СХП / **Т.Ю. Коршунова, О.Н. Логинов** // Токсикологический вестник. – 2017. – № 3 – С. 58-60. ИФ 0,441

18. **Коршунова, Т.Ю.** Полифункциональные биопрепараты-нефтедеструкторы: влияние на растения и содержание нефти в почве / **Т.Ю. Коршунова, М.Д. Бакаева, О.Н. Логинов** // Экология и промышленность России. – 2018. – № 9. – С. 18-22. Scopus, ИФ 0,423

#### Патенты

19. Патент № 2303061 Российская Федерация. Питательная среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* / **О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ю. Коршунова, С.П. Четвериков, Е.А. Асабина.** Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим». Заявл. 06.09.2005; опубл. 20.07.2007. Бюл. № 20.

20. Патент № 2539148 Российская Федерация. Способ очистки почв от нефти в условиях низких положительных температур психротолерантными бактериями *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 / **О.Н. Логинов, С.П. Четвериков, Т.Ю. Коршунова, Э.Г. Валиуллин, М.Д. Бакаева, Д.Ф. Фарухшин.** Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и ФГБУН ИБ УНЦ РАН. Заявл. 20.08.2013; опубл. 10.01.2015. Бюл. № 1.

21. Патент № 2553540 Российская Федерация. Консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. и *Ochrobactrum* sp., используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / **О.Н. Логинов, И.М. Султанов, С.П. Четвериков, Т.К. Давлетшин, Т.Ю. Коршунова, Е.А. Столярова, С.Р. Мухаматдьярова, Н.В. Кобызева.** Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и ФГБУН ИБ УНЦ РАН. Заявл. 29.11.2012; опубл. 20.06.2015. Бюл. № 17.



22. Патент № 2627598 Российская Федерация. Способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов. Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и УИБ РАН. Заявл. 29.12.2015; опубл. 09.08.2017. Бюл. № 22.

#### Статьи, опубликованные в прочих изданиях

23. **Коршунова, Т.Ю.** Микроорганизмы, разлагающие нефтяные углеводороды при пониженной температуре / **Т.Ю. Коршунова**, А.А. Сабиров, С.П. Четвериков, М.Д. Бакаева, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2012. – № 3. – С. 76-82. ИФ 0,207

24. **Коршунова, Т.Ю.** Новый штамм бактерии рода *Ochrobactrum*: свойства и филогенетическое положение / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 2. – С. 90-94. ИФ 0,207

25. **Коршунова, Т.Ю.** Окисление бактериями *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 нефти и нефтяных углеводородов / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 16-18. ИФ 0,207

26. **Коршунова, Т.Ю.** Состав жирных кислот клеточной стенки бактерии *Raenibacillus ehimensis* IB-739 / **Т.Ю. Коршунова**, С.Г. Ковальская, А.И. Мелентьев, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2015. – № 1. – С. 47-52. ИФ 0,207

#### Избранные тезисы докладов и материалов конференций

27. Кобызева, Н.В. Локальная очистка сточных вод, загрязненных нефтепродуктами, с помощью биопрепарата «Ленойл» / Н.В. Кобызева, **Т.Ю. Коршунова**, Н.Н. Силищев, О.Н. Логинов // Материалы Международной научно-технической конференции «Нефтегазопереработка и нефтехимия-2007» (22 мая 2007 г., Уфа). – Уфа, 2007. – С. 313-314.

28. Сабиров, А.А. Психрофильные микроорганизмы-деструкторы нефтяных углеводородов / А.А. Сабиров, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2012» (17-18 мая 2012 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2012. – С. 32-33.

29. Сабиров, А.А. Психрофильные микроорганизмы-деструкторы толуола / А.А. Сабиров, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (30 июля – 3 августа 2012 г., г. Пущино). – Пущино, 2012. – С. 40-41.

30. **Коршунова, Т.Ю.** Биодеструкция нефтяных углеводов на примере β-метилнафталина в условиях пониженной температуры / **Т.Ю. Коршунова**, А.А. Сабиров, О.Н. Логинов // Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (30 июля – 3 августа 2012 г., г. Пущино). – Пущино, 2012. – С. 75-76.

31. Сабиров, А.А. Определение нитрогеназной активности штаммов *Pseudomonas* sp. 1.1 и *Ochrobactrum* sp. 1.7 / А.А. Сабиров, С.П. Четвериков, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (24-28 сентября 2012 г., г. Саратов). – Саратов: Научная книга, 2012. – С. 87.

32. **Коршунова, Т.Ю.** Скрининг психротолерантных микроорганизмов, деградирующих нефтяные углеводороды / **Т.Ю. Коршунова**, Н.В. Позолотина // Материалы научно-практической конференции «Государственная политика в области охраны окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (8-10 октября 2012 г., г. Уфа). – Уфа, 2012. – С. 30-31.

33. Сабиров, А.А. Определение окислительной активности микроорганизмов штамма *Pseudomonas* sp. 1.1 / А.А. Сабиров, С.П. Четвериков, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов VIII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (29-31 октября 2012 г., г. Москва). – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 38-40.

34. **Коршунова, Т.Ю.** Микроорганизмы, деградирующие углеводороды нефти при низких положительных температурах / **Т.Ю. Коршунова**, Н.В., Позолотина, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (22-23 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2012. – С. 70-72.

35. Мухаматдьярова, С.Р. Бактерия *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, разлагающая нефтяные углеводороды / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (22-23 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2012. – С. 95-96.

36. Мухаматдьярова, С.Р. Описание представителя рода *Acinetobacter*, способного к деструкции углеводородов нефти / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник трудов V Международной заочной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники» (22-24 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2012. – С. 194-195.

37. Мухаматдьярова, С.Р. Окисление углеводородов микроорганизмами штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (ВТСНТ-2013) (27-29 марта 2013 г., г. Томск). – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2013. – Т. 2. – С. 100-101.

38. Мухаматдьярова, С.Р. Окисление алифатических углеводородов консорциумом микроорганизмов-нефтедеструкторов / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов IX Молодежной школы конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (21-23 октября 2013 г., г. Москва). – М.: МАКС Пресс, 2013. – С. 39-41.

39. Мухаматдьярова, С.Р. Очистка нефтезагрязненной почвы Крайнего Севера с помощью консорциума микроорганизмов / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Сборник тезисов школы-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (24-25 октября 2013 г., г. Пущино). – Пущино, 2013. – С. 92.

40. Мухаматдьярова, С.Р. Перспективы применения консорциума микроорганизмов для деградации нефти и нефтяных фракций / С.Р.

Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник докладов III Международной научно-практической конференции с элементами научной школы для молодежи «Экологические проблемы нефтедобычи» (21-23 октября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2013. – С. 6-8.

41. Мухаматдьярова, С.Р. Эмульгирующие свойства штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, способного к деструкции углеводов нефти / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник материалов VII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (11-12 ноября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: РИЦ УГНТУ, 2013. – С. 85.

42. Мухаматдьярова, С.Р. Окисление микроорганизмами штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 углеводов парафинового ряда / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов VI Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2013» (22-23 ноября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2013. – С. 52-53.

43. Мухаматдьярова, С.Р. Разложение нефтеотходов бактериями *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции «Современные тенденции в образовании и науке» (28 ноября 2014 г., г. Тамбов). – Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2014. – Ч. 9. – С. 89-90.

44. Мухаматдьярова, С.Р. Эффективность процесса биодеструкции нефтеотходов в полевом эксперименте / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VIII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (24-25 ноября 2014 г., г. Уфа). – Уфа: РИЦ УГНТУ, 2014. – С. 116.

45. Мухаматдьярова, С.Р. Полевой эксперимент по обезвреживанию нефтесодержащих отходов с использованием консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова** //

Сборник докладов IX Международной конференции аспирантов и студентов «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов». (15-16 апреля 2015 г., г. Донецк). – Донецк: ГВУЗ «ДонГУ», 2015. – С. 245-247.

46. Валиуллин, Э.Г. Деградация нефти в песчаной почве углеводородокисляющими микроорганизмами / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. II. – С. 200-203.

47. Валиуллин, Э.Г. Углеводородоокисляющая активность психротолерантных бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. II. – С. 203-206.

48. Мухаматдьярова, С.Р. Состав жирных кислот липидов клеточной стенки микроорганизма *Ochrobastrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. I. – С. 222-225.

49. Валиуллин, Э.Г. Нитрогеназная активность психротолерантных бактерий *Pseudomonas* sp. ИВ-1.1 / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы IX Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (24-25 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – С. 98-99.

50. **Korshunova, T.Yu.** Effect of polyfunctional bacterial preparations on plant growth and development and oil content in soil / **T.Yu. Korshunova**, M.D. Вакаева, O.N. Loginov // Материалы Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (13-17 июня 2018 г., г. Уфа). – Электронное издание. URL: <http://plamic.ru/sbornik>. – С. 41.