

УДК 504:631.46:579.6

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КИСЛОТОУСТОЙЧИВОСТИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ХОДЕ БИОРЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЧВ

Е.В. Плешакова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83

E-mail: plekat@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.12.09 г.

Экологические аспекты кислотоустойчивости нефтеокисляющих микроорганизмов в ходе биоремедиации загрязнённых почв. – Плешакова Е.В. – Из нефтешлама (pH 1.15) выделены 13 микробных штаммов, которые идентифицированы как *Corynebacterium* spp., *Dietzia maris*, *Bacillus* sp. и охарактеризованы как умеренные ацидофилы, способные к деградации нефтяных углеводородов в кислой и нейтральной среде. Показано, что штамм *D. maris* AM3 обладает рядом функциональных и экологических преимуществ, к которым относятся: рост в диапазоне температур (10 – 40°C) и pH (4 – 9), в присутствии 10% NaCl, способность к деградации алкановых и ароматических углеводородов нефти, биоэмульгирующая активность по отношению к нефти. Изученные микроорганизмы рекомендуются для восстановления нефтезагрязнённых почв с повышенной кислотностью. Штаммы переданы в коллекцию микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов).

Ключевые слова: нефтезагрязнённая почва, углеводороды, микробные штаммы, кислотоустойчивость, деградация.

Ecological aspects of oil-oxidizing microorganisms' acid-resistance during contaminated soil bioremediation. – Pleshakova E.V. – 13 microbial strains were isolated from oil slime with pH 1.15, which were identified as *Corynebacterium* spp., *Dietzia maris*, and *Bacillus* sp. and characterized as moderate acidophiles capable of destructing oil hydrocarbons in acidic and neutral media. The strain *D. maris* AM3 has a number of functional and ecological advantages, namely, growth within wide ranges of temperatures (10 – 40°C) and pH (4 – 9) in the presence of 10% NaCl, the ability to destruct alkane and aromatic oil hydrocarbons the bioemulsification activity for oil. The microorganisms investigated are recommended for remediation of oil-contaminated soils with an increased acidity. The strains have been submitted to the Bacteria Collection of the Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (Saratov, Russian Federation).

Key words: oil-contaminated soil, hydrocarbons, microbial strains, acid-resistance, destruction.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в результате антропогенной деятельности происходит широкое масштабное загрязнение окружающей среды токсичными ксенобиотиками. Нефть и нефтепродукты признаны основными загрязнителями окружающей среды (Eurosoil 2008..., 2008). По официальным данным потери нефти и нефтепродуктов в России при добыче, транспортировке, переработке и хранении оцениваются в 8 – 9 млн т в год. Особую нагрузку при этом испытывает почва, что проявляется в ухудшении свойств почвенного покрова, угнетении её самоочищающей способнос-

ти и необратимых изменениях развития и функциональной активности организмов почвенного биоценоза (Пиковский и др., 2003; Stroud et al., 2007). Хронические разливы нефти приводят к быстрой потере продуктивности земель или полной деградации ландшафтов. Ограниченность земельных ресурсов ставит неотложную задачу возврата в хозяйственное использование всех нарушенных и деградированных почв (Бурмистрова и др., 2003).

Поскольку на современном уровне развития нефтяной промышленности не представляется возможным полностью исключить её негативное воздействие на окружающую среду, возникает необходимость разработки методов и технологий восстановления почв, загрязнённых нефтяными углеводородами (Сулейманов и др., 2005). Экологически перспективными являются микробиологические способы очистки от нефтезагрязнений, основанные на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву селекционированных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) (Нечаева и др., 2009; Mishra et al., 2001; Ouyang et al., 2005).

В связи с разнообразием почвенно-климатических условий, физико-химических свойств нефти и нефтепродуктов, уровня и срока действия загрязнения и стоимости мероприятий по рекультивации проблема поиска оптимальных и адаптированных к конкретным условиям методов остаётся весьма актуальной. Так, на территории России и других стран (Широких, 2004; Rothschild, Mancinelli, 2001) существует немало почв, в том числе и нефтезагрязнённых, с повышенной кислотностью, которая обусловлена естественными или антропогенными факторами. До последнего времени недостаточно внимания уделялось изучению деградации органических загрязнителей, в том числе нефти, бактериями в экстремальных условиях, например в почве при пониженных значениях pH.

Цель настоящей работы состояла в изучении ряда биологических и функциональных особенностей кислотоустойчивых нефтеокисляющих микроорганизмов для возможного использования их в технологии биоремедиации нефтезагрязнённых кислых почв.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись микроорганизмы, выделенные из нефтешлама (содержание нефтяных углеводородов 360.5 г/кг, pH 1.15) (г. Саратов) методом мембранных фильтров. Идентификацию микроорганизмов проводили по результатам изучения морфологии, хемотаксономии, физиологии и биохимии клеток по «Определителю бактерий Берджи» (1997), а также оригинальным статьям (Нестеренко и др., 1985; Ившина и др., 1995). Штамм *Dietzia maris* AM3 окончательно был идентифицирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, г. Москва).

В опытах по изучению влияния pH среды на рост бактерий (диапазон от 1.0 до 7.0) питательную среду готовили с использованием цитратно-фосфатного буфера (Справочник биохимика..., 1991). Для определения ростовых значений pH сред бактерии культивировали в пробирках в стационарных условиях в L-бульоне при 28°C в течение 7 сут. Прирост биомассы определяли по показателю оптической плотности, измеренной при $\lambda=540$ нм на фотоэлектроколориметре КФК-2.

При изучении субстратного спектра бактерий в качестве единственного источника углерода и энергии в среду вносили: сырую нефть, керосин, вазелиновое масло, дизельное топливо и ряд индивидуальных углеводов: *n*-алканы и ароматические соединения. Названные субстраты стерилизовали отдельно и вносили в агаризованную среду М9 при равномерном перемешивании в момент розлива среды в чашки Петри. Конечная концентрация субстратов составляла 0.4 г/л. Способность микроорганизмов использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга, согласно которому отмечалось наличие роста культуры вокруг и внутри каплей нефтяного субстрата на поверхности плотной минеральной среды (Теппер и др., 1993). Способность микроорганизмов к деструкции индивидуальных углеводов парафинового ряда (0.4 г/л) определяли с помощью метода лунок (Практикум по микробиологии..., 1976). Углерод вносили в лунку диаметром 8 мм, проделанную стерильным пробочным сверлом в центре агаризованной минеральной среды на чашке Петри. Он равномерно диффундировал в агар, а частично испарялся, так что культивирование проводили одновременно и на твёрдом субстрате, и в парах углеводорода. Вокруг лунки с субстратом производили штрихом посев культур. О деструкции углеводов судили по интенсивности роста тест-культур на 1 – 7 сут. инкубации в термостате при 28°C.

Биотрансформирующую активность бактерий изучали в жидкой минеральной среде М9 с добавлением к ней в качестве единственного источника углерода нефти (1% по весу), мазута (2.5%) и индивидуальных углеводов гептадекана (2.5%), гексадекана (1%), толуола (1%) и декалина (1%). Мазут вносили в минеральную среду в виде 10%-ного раствора в гексане из расчёта 20 мл раствора на 100 мл среды. Среду выдерживали при комнатной температуре в течение 3 сут. для самопроизвольного испарения растворителя, после чего она была готова для внесения микроорганизмов (Грищенко, Гаязов, 1997). Деградацию углеводородных субстратов исследуемыми культурами изучали в жидкой среде при различных значениях pH (3.5, 4.6, 5.0 и 7.0). Культивирование осуществляли в условиях периодического культивирования в 0.25 л колбах Эрленмейера при температуре 28°C на качалке (160 об/мин) в течение 7 – 14 сут. Опыты ставили в трёх повторностях. Контролями служили: минеральная среда с культурой без углеводородного субстрата в среде и минеральная среда с субстратом без засева культурой.

Деструктивную активность микроорганизмов устанавливали по остаточному содержанию нефтяных углеводородов гравиметрическим методом (Методические указания..., 2003) или ИК-спектроскопией (Государственный контроль качества воды..., 2003) на спектрофотометре «Specord IR-75» после их экстракции четырёххлористым углеродом. ИК-спектры гексадекана снимали в области 2700 – 3100 см⁻¹, которые соответствовали асимметричным и симметричным валентным колебаниям CH₂- и CH₃-групп. Суммарную концентрацию углеводородов нефти рассчитывали по интенсивности аналитической полосы поглощения при 2930 см⁻¹. Деструкцию гептадекана, гексадекана и декалина оценивали методом газовой хроматографии (Ларионова и др., 2005; Другов, Родин, 2007) на газовом хроматографе «Биохром 1» с кварцевой капиллярной колонкой, содержащей жидкую фазу SE-54.

Идентификацию хроматографических пиков проводили по временам удерживания. Количество углеводорода оценивали по площади пика методом калибровочного графика. Степень деструкции толуола рассчитывали на основании данных, полученных с помощью УФ-спектрофотометрии (Осипов, Белова, 1968), измеряя УФ-спектры при длине волны $\lambda=263$ нм. О деструкции углеводорода судили по остаточной концентрации субстрата в среде.

При периодическом культивировании штамма *D. maris* AM3 на минеральной среде с гексадеканом (1%) определяли оптическую плотность бактериальной суспензии путём измерения на фотоколориметре КФК-2 при $\lambda=540$ нм через 1, 3 и 7 сут. культивирования. Концентрацию бактериальной биомассы определяли весовым методом, пропуская культуральную жидкость через мембранный фильтр «Владипор». Собранную биомассу высушивали до постоянной массы и взвешивали. По полученным результатам рассчитывали прирост биомассы в г/л (Стабникова и др., 1995).

Эмульгирующую активность бактерий определяли методом Купера (Cooper, Goldenberg, 1987). Выращивали культуры в течение 5 сут. в жидкой минеральной среде М9 с добавлением углеводородного субстрата в качестве единственного источника углерода и энергии. После культивирования клетки от культуральной среды отделяли центрифугированием. Супернатант исследовали на наличие эмульгирующей активности (экзогенной) по отношению к сырой нефти, которую рассчитывали в процентах как отношение объёма эмульсии ($V_э$, мл) к общему объёму жидкости (V , мл), умноженное на 100%, используя формулу: $E_{24;48} = V_э/V \times 100$, где $V = 5$ мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке приёмов биоремедиации нефтезагрязнённых почв, характеризующихся повышенной кислотностью, из нефтешлама с pH 1.15 были выделены 13 микробных штаммов. В качестве единственного источника углерода и энергии при их выделении использовали сырую нефть, поэтому, предположительно, данные штаммы являлись деструкторами нефтяных углеводородов. В связи с экстремальным значением pH в нефтешламе выделенные штаммы могли быть acidофильными или acidотолерантными и, учитывая их способность к деструкции нефтепродуктов, представляли интерес для практического использования на нефтезагрязнённых объектах окружающей среды с повышенной кислотностью.

Штаммы с лабораторными шифрами 1/1; 1/2; 2/1м; 2/1к; 2/2м; 2/3м; 3/1; 3/2; 4/1 и 4/2 по совокупности изученных морфологических, хемотаксономических, физиолого-биохимических признаков были идентифицированы как *Corynebacterium* sp., два штамма: 1/3 и AM3 – как *Dietzia maris*, один штамм 2/5 – как *Bacillus* sp. Полученные результаты полностью согласуются с известными литературными данными о преобладании в сообществах нефтезагрязнённых почв и почвогрунтов представителей группы *Nocardioforms* (Борзенков и др., 2006; van der Geize,

Dijkhuizen, 2004). Кроме того, известно, что эти бактерии способны развиваться в широком диапазоне pH и температуры (Куличевская и др., 1995; Ившина и др., 1995).

В ходе исследований было установлено, что все выделенные микроорганизмы в разной степени устойчивы к повышенной кислотности среды, они росли в жидкой питательной среде в диапазоне pH от 1.0 до 7.0 (табл. 1). У большинства штаммов наблюдался заметный рост при pH 1.0, некоторые из них при pH 1.0 не росли, но были способны к росту при pH 3.0. Бактерии были охарактеризованы как умеренные ацидофилы. Как известно, способность к росту при низких и высоких значениях pH обеспечивает микроорганизмам определённые преимущества в окружающей среде, так как в таких условиях конкуренция со стороны большинства других организмов невелика. Выявленный широкий диапазон роста данных штаммов мог свидетельствовать об их приспособленности к изменяющимся условиям природной среды.

Таблица 1

Рост микроорганизмов через 7 сут. культивирования в МПБ
в интервале pH от 1 до 7 при исходной посевной дозе ($OD_{540}=0.4$ ед.)

Штаммы	Оптическая плотность (OD_{540}) при различных значениях pH			
	7	5	3	1
<i>Corynebacterium</i> sp. 1/1	0.97±0.05	0.20±0.03	0.48±0.04	0.52±0.05
<i>Corynebacterium</i> sp. 1/2	1.16±0.07	0.24±0.03	0.54±0.04	0.50±0.05
<i>D. maris</i> 1/3	3.00±1.17	2.50±1.11	1.39±0.05	0.86±0.06
<i>Corynebacterium</i> sp. 2/1к	1.20±0.05	0.65±0.05	0.44±0.04	0.47±0.04
<i>Corynebacterium</i> sp. 2/1м	1.35±0.06	0.85±0.05	0.77±0.04	0.64±0.05
<i>Corynebacterium</i> sp. 2/2м	1.40±0.05	0.95±0.06	0.72±0.04	0.66±0.05
<i>Corynebacterium</i> sp. 2/3м	1.65±0.08	1.20±0.05	0.89±0.04	0.67±0.05
<i>Bacillus</i> sp. 2/5	2.24±0.12	1.84±1.00	1.29±0.05	0.84±0.06
<i>Corynebacterium</i> sp. 3/1	1.55±0.05	1.08±0.09	0.83±0.05	0.67±0.06
<i>Corynebacterium</i> sp. 3/2	1.06±0.08	0.79±0.07	0.56±0.04	0.48±0.04
<i>D. maris</i> AM3	3.20±0.19	2.68±1.11	1.92±0.07	0.77±0.05
<i>Corynebacterium</i> sp. 4/1	1.56±0.06	1.08±0.04	0.89±0.05	0.56±0.05
<i>Corynebacterium</i> sp. 4/4	1.45±0.06	1.12±0.05	0.51±0.05	0.18±0.02

При изучении деструктивного потенциала исследуемых микроорганизмов было показано, что все выделенные штаммы обладали способностью к росту на агаризованной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии спектр углеводородных субстратов: сырую нефть, керосин, вазелиновое масло, дизельное топливо, ряд индивидуальных углеводородов: *n*-алканы и ароматические соединения (табл. 2).

Все штаммы росли на предлагаемых субстратах, но с различной интенсивностью. По результатам качественного анализа были выделены несколько наиболее активных штаммов-деструкторов нефтяных углеводородов: *D. maris* 1/3, *Bacillus* sp. 2/5 и *D. maris* AM3.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КИСЛОУСТОЙЧИВОСТИ

По данным ИК-спектроскопии деструкция нефти в жидкой среде при pH 3.5 изучаемыми штаммами составила от 29 до 47% за 14 сут. культивирования. У большинства штаммов деструкция углеводов нефти в кислой среде происходила более эффективно, чем в нейтральной, например, у штаммов *D. maris* 1/3, *Bacillus* sp. 2/5 и *Corynebacterium* sp. 4/1, которая составила 44.0, 46.4 и 29.6% соответственно (рис. 1). Несколько штаммов характеризовались одинаковой степенью биоразложения нефти при различных значениях pH среды. Штамм *D. maris* AM3 свою максимальную деструктивную активность (до 70%) проявлял при нейтральных значениях pH (рис. 2), степень деструкции нефтяных углеводов при культивировании этого штамма в среде с pH 3.5 составляла 47%.

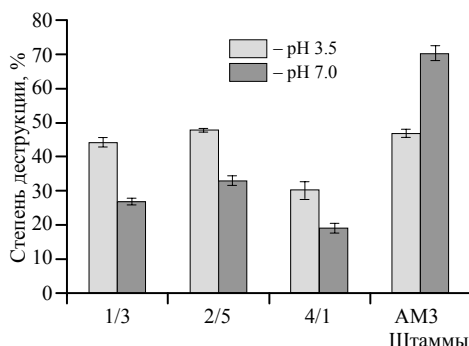


Рис. 1. Деструкция углеводов нефти (10 г/л) наиболее активными штаммами в жидкой среде за 14 сут.

Таблица 2

Субстратный спектр исследуемых микроорганизмов

Субстрат		Оценка роста штаммов												
		1/1	1/2	1/3	2/1к	2/1м	2/2м	2/3м	2/5	3/1	3/2	4/1	4/4	AM3
Сырая нефть		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Вазелиновое масло		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Дизельное топливо		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Керосин		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
n-алканы	Октан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Гексан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Гептан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Декан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Тридекан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Гексадекан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Гептадекан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ароматические углеводороды	Бензол	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
	Толуол	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Ксилол	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	Фенол	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Псевдокумол	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	Амилбензол	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Нафты	Декалин	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. «-» – отсутствие роста; «+» – едва выраженный рост; «+» – небольшой рост; «+» – отчетливый рост.

Наблюдался значительный прирост биомассы *D. maris* AM3 по сырому весу при культивировании штамма на минеральной среде с гексадеканом (10 г/л) в течение 7 сут., который составлял 1.38 г/л при pH 5.0 и 1.62 г/л при pH 7.0, что свидетельствовало о том, что данный углеводород является источником угле-

рода и энергии, обеспечивающим активный рост клеток при исследуемых значениях pH.

По данным газовой хроматографии деструкция гептадекана (25 г/л) штаммом *D. maris* AM3 в жидкой среде за 7 сут. культивирования составляла 53.6% при pH 7.0 и 51.5% при pH 4.6. По данным УФ-спектрофотометрии деструкция толуола (10 г/л) данным штаммом в жидкой среде за 7 сут. культивирования составляла 80.6% при нейтральном pH. Представитель нафтенных углеводородов декалин (10 г/л) разрушался штаммом *D. maris* AM3 в жидкой среде при pH 7.0 на 9.5%. Данный штамм также осуществлял деградацию мазута (25 г/л) на 8.1% в жидкой среде за 14 сут. культивирования.

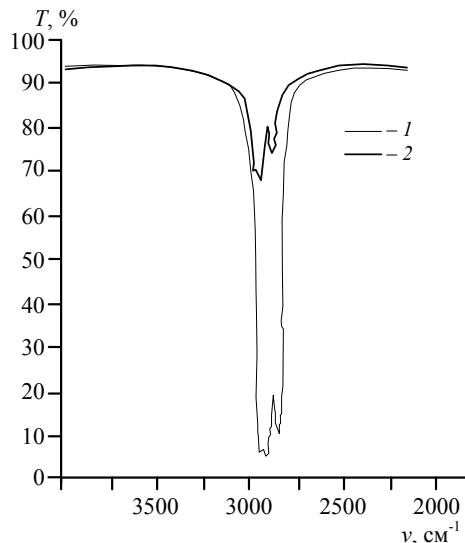


Рис. 2. ИК-спектры нефти (1) – контроль, С=10 г/л и продуктов её деструкции (2) – при культивировании штамма *D. maris* AM3

нефтяных углеводородов этим штаммом в условиях повышенной кислотности.

У *D. maris* AM3 была обнаружена экзогенная эмульгирующая активность по отношению к нефти, которая составляла: $E_{24} = 49.3\%$ и $E_{48} = 37.3\%$. Это свидетельствовало о возможных преимуществах штамма в процессах утилизации нефтепродуктов, так как биоэмульгирующая активность микроорганизма в сочетании с биodeградирующей способностью может обеспечить большую биодоступность углеводородов в различных условиях.

Проведённые нами исследования показали, что *D. maris* AM3 обладал рядом экологических преимуществ, так как хорошо рос в диапазоне pH от 4.0 до 9.0 и температур от 10 до 40°C, а также в присутствии 10% NaCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из микробного сообщества нефтешлама (pH 1.15) были выделены 13 микробных штаммов, которые идентифицированы как *Corynebacterium* spp., *Dietzia maris*, *Bacillus* sp. и охарактеризованы как умеренные ацидофилы, способные к деструкции нефтяных углеводородов в кислой и нейтральной среде.

Среди кислотоустойчивых нефтеокисляющих штаммов выявлен штамм *D. maris* АМЗ, обладающий рядом функциональных и экологических преимуществ, к которым относится рост в диапазоне pH (4 – 9) и температур (10 – 40°C) и в присутствии 10% NaCl, способность к деструкции алкановых и ароматических углеводородов нефти, способность к биоэмульгации нефти ($E_{24}=49.3$). Степень деградации нефти (10 г/л) данным микроорганизмом при pH 7.0 и 3.5 составляет 70.0 и 47.0%, гептадекана (25 г/л) – 53.6 и 51.5%, мазута (25 г/л, pH 7.0) – 8.1%, толуола (10 г/л, pH 7.0) – 80.6% за 7 – 14 сут. культивирования.

По данным исследователей (Жуков и др., 2007) процессы разложения субстрата (дизельное топливо) и роста активных углеводородокисляющих бактерий *Rhodococcus erythropolis* и *R. rubber* практически останавливались при достижении в среде культивирования значений pH 4.75 и 5.65 соответственно. Выделенные и изученные нами бактерии в связи с их способностью к деструкции нефтяных углеводородов в кислой среде, несомненно, представляют значительный интерес для практического использования при очистке нефтезагрязнённых объектов окружающей среды, характеризующихся повышенной кислотностью. Штаммы переданы в коллекцию почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама // Микробиология. 2006. Т. 75, № 1. С. 82 – 89.
- Бурмистрова Т.И., Алексеева Т.П., Перфильева В.Д., Терещенко Н.Н., Стахина Л.Д. Биodeградация нефти и нефтепродуктов в почве с использованием мелиорантов на основе активированного торфа // Химия растительного сырья. 2003. №3. С. 69 – 72.
- Государственный контроль качества воды. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ИПК «Издательство стандартов», 2003. 776 с.
- Грищенков В.Г., Гаязов Р.Р. Бактериальные штаммы-деструкторы топочного мазута: характер деградации в лабораторных условиях // Прикладная биохимия и микробиология. 1997. Т. 33, № 4. С. 423 – 427.
- Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. М.: БИНОМ, 2007. 270 с.
- Жуков Д.В., Мурыгина В.П., Калужный С.В. Кинетические закономерности биodeградации алифатических углеводородов бактериями *Rhodococcus rubber* и *Rhodococcus erythropolis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 6. С. 657 – 663.
- Ивишина И.Б., Бердичевская М.В., Зверева Л.В., Рыбалка Л.В., Еловицова Е.А. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков из различных экосистем // Микробиология. 1995. Т.64, №4. С. 507 – 513.
- Куличевская И.С., Гузев В.С., Паников Н.С. Популяционная динамика углеводородокисляющих дрожжей, интродуцированных в нефтезагрязненную почву // Микробиология. 1995. Т. 64, № 5. С. 668 – 673.
- Ларионова Н.А., Семенова Е.Н., Бреус В.А., Неклюдов С.А., Бреус И.П. Экстракция и анализ углеводов, содержащихся в загрязненных почвах // Технология нефти и газа. 2005. № 4. С. 39 – 49.
- Методические указания определения массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом / Разр. «Тайфун». Утв. Росгидрометом 18.03.2003. Введ. 01.06.2003. 16 с.

Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Киев: Наук. думка, 1985. 336 с.

Нечаева И.А., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // Биотехнология. 2009. № 1. С. 64 – 70.

Определитель бактерий Берджи: В 2 т. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с.; Т. 2. 368 с.

Осипов В.М., Белова Т.Д. Спектрофотометрический метод определения содержания нефтепродуктов в сточной воде // Химия и технология топлив и масел. 1968. №1. С. 58 – 59.

Пиковский Ю.И., Геннадиев А.Г., Чернянский С.С., Сахаров Г.Н. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1132 – 1140.

Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.

Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 543 с.

Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводородов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. Т. 31, № 5. С. 534 – 539.

Сулейманов Р.Р., Габбасова И.М., Ситдииков Р.Н. Изменение свойств нефтезагрязненной серой лесной почвы в процессе биологической рекультивации // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 1. С. 109 – 115.

Тепер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1993. 175 с.

Широких И.Г. Микробные сообщества кислых почв Северо-Востока Европейской части России: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2004. 394 с.

Churchill S.A., Harper J.P., Churchill P.F. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 549 – 552.

Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53, № 2. P. 224 – 229.

Eurosoil 2008: soil – society – environment / Eds. W.H. Blum, M.H. Gerzabek, M. Vondrážka. Vienna: BOKU, 2008. 400 p.

Geize R. van der, Dijkhuizen L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications // Microbiology. 2004. Vol. 7. P. 255 – 261.

Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C., Lal B. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily-sludge-contaminated soil // Appl. and Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67, № 4. P. 1675 – 1681.

Qiyang W., Liu H., Murygina V., Yu Y., Xiu Z., Kalyuzhnyi S. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China // Process Biochem. 2005. Vol. 40. P. 3763 – 3768.

Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // Nature. 2001. Vol. 409. P. 1092 – 1101.

Stroud J.L., Paton G.I., Semple K.T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation // J. Appl. Microbiol. 2007. Vol. 102, № 5. P. 1239 – 1253.