

УДК 579.66

UDC 579.66

ДЕСТРУКЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ РАЗЛИЧНЫМИ МОРФОТИПАМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ АКТИНОБАКТЕРИЙ

DESTRUCTION OF HYDROCARBONS WITH VARIOUS MORPHOTYPES OF OIL OXIDIZING ACTINOBACTERIA

Худокормов Александр Александрович
к.б.н.

Khudokormov Alexander Alexandrovich
Dr.Sci.Biol.

Карасева Эмма Викторовна
к.б.н., профессор

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci., professor

Самков Андрей Александрович
к.б.н.

Samkov Andrey Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Волченко Никита Николаевич
к.б.н., ст. преподаватель

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci., senior lecturer

Козицын Александр Евгеньевич
аспирант
Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

Kozitsin Alexander Evgenyevich
postgraduate student
Kuban State University, Krasnodar, Russia

В работе проводили сравнительное изучение углеводородоокисляющей активности S- и R-морфотипов нефтеокисляющих актинобактерий из коллекции Кубанского госуниверситета. Были отмечены достоверные различия в параметрах роста между S и R-формами нефтеокисляющих актинобактерий. У S-форм выше максимальная удельная скорость роста, для них характерен широкий спектр деградации углеводородов и высокая степень деструкции поллютантов. В опытах с использованием в качестве субстрата нефти и мазута S-формы актинобактерий быстрее адаптировались к условиям среды

In this article we have carried out a comparative study of hydro-carbon-oxidizing activity of S-and R-morphological types of oil oxidizing Actinobacteria from the collection of Kuban State University. Significant differences observed in parameters of growth between S- and R-forms of oil oxidizing Actinobacteria. In S-forms it is higher than the maximum specific growth rate, which is typical for a wide range of hydrocarbon degradation and a high degree of degradation of pollutants. In experiments with the use of oil as a substrate and heavy oil S-forms, Actinobacteria quickly adapted to the environmental conditions

Ключевые слова: АКТИНОБАКТЕРИИ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, БИОДЕГРАДАЦИЯ, БИОРЕМЕДИАЦИЯ, МОРФОТИП

Keywords: ACTINOBACTERIA, CULTIVATION, BIODEGRADATION, BIOREMEDIATION, MORPHOTYPE

Крупнейшей проблемой, стоящей перед человечеством, является разрушение естественных экосистем под действием антропогенной нагрузки. Одним из основных фактором давления общепризнанно считается накопление в биосфере всевозможных поллютантов, в том числе сырой нефти и продуктов её переработки. Мощное негативное влияние нефтепродуктов на атмосферу, гидросферу, почвенный покров Земли обусловлен рядом факторов: активным и всё более возрастающим применением углеводородного сырья во всех отраслях хозяйственной деятельности че-

ловека; широким распространением нефтедобывающих, транспортирующих, перерабатывающих и потребляющих предприятий; характерными физико-химическими и токсическими свойствами углеводородов, обуславливающими их низкую биodeградебельность в естественных экосистемах. Микроорганизмы, способные потреблять углеводороды, являются обычными представителями биоценозов почв и водных экосистем. Основными компонентами углеводородокисляющих бактериоценозов являются актинобактерии, такие, как родококки, нокардии, гордонии, артробактерии [1,2]. В хронически загрязненных нефтью почвах родококки составляют 90%. В почвах с низкой степенью нефтяного загрязнения количество родококков снижается и составляет 60-80% [3]. Даже в незагрязненных почвах концентрация углеводородокисляющих актинобактерий 0,01—0,05% [4]. *Rhodococcus* - постоянный и доминирующий компонент микробиоценозов нефтезагрязненных почв. Не меньшим нефтеокисляющим потенциалом характеризуются *Gordonia*, *Nocardia* [3]. Основной экологической ролью родококков является ассимиляция природных и антропогенных газообразных, жидких n-алканов, ароматических углеводородов [5]. Все родококки, выделяемые из углеводородзагрязнённых экосистем, при культивировании на средах с нефтепродуктами максимальную биомассу накапливают при росте на алканах C₁₅ и C₁₆ [6]. Актинобактерии способны усваивать широкий спектр углеводородов, включая и ароматические, имеют высокую скорость роста [7]. Активность актинобактерий в 70 раз превосходит активность других нефтеокисляющих микроорганизмов. Это связано с более крупными размерами клеток и их способностью окислять большие количества n-алканов, чем это необходимо для удовлетворения своих энергетических и конструктивных потребностей. Избыток окисленного n-алкана родококки и артробактерии переводят в нейтральные липиды, тогда как другие нефтеокисляющие микроорганизмы (например, псевдомонады) внутреннего пула углеводородов не имеют и резервных липи-

дов не образуют. Нефтеокисляющая активность родококков может коррелировать с морфотипом колоний. Так, ранее была показана зависимость способности родококков утилизировать ароматическую фракцию арабской сырой нефти от морфотипа колоний [8,9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования послужили штаммы нефтеокисляющих актинобактерий S- и R-морфотипов, выделенные из углеводородзагрязнённых объектов и входящие в коллекцию микроорганизмов КубГУ

Штамм *Rhodococcus erythropolis* B2. Грамположительные коккобактерии. Колонии кремовые округлые, точечные, непрозрачные, поверхность гладкая, край ровный, консистенция маслянистая.

Штамм *Rhodococcus* sp. J8. Короткие палочки с закруглёнными концами. По Граму окрашиваются положительно. Колонии округлые, точечные, непрозрачные. Поверхность колоний шероховатая, окраска красная, структура однородная.

Штамм *Dietzia maris* J1. Мелкие одиночные грамположительные кокки. Образуют округлые, точечные колонии оранжевого цвета. Край колоний ровный, поверхность шероховатая, выпуклая, консистенция сухая.

Штамм *Gordonia* sp. Z7. Грамположительные изогнутые палочки в виде скоб, дают V-образные структуры. Колонии красно-оранжевые, непрозрачные, шероховатые, край рваный, структура однородная

Штамм *Nocardia* sp. J2. Одиночные грамположительные палочки с обрубленными концами. Дают округлые, непрозрачные, ярко-розовые колонии с гладкой поверхностью и ровным краем.

Штамм *Rhodococcus erythropolis* F1. Тонкие, изящные коккобактерии. По Граму окрашиваются положительно. Образуют V-образные структуры. Колонии кремово-розовые, округлые, блестящие, с гладкой выпуклой поверхностью, край ровный, консистенция маслянистая.

При выборе штаммов руководствовались ранее проведёнными исследованиями, подтверждающими их высокую нефтеокисляющую активность [10]. Для поддержания культур, наработки биомассы клеток и количественного учета использовали плотную питательную среду – питательный агар (ПА) стандартного состава. Для наращивания биомассы клеток, а также исследования биодеструкции нефтепродуктов использовали жидкую минеральную среду следующего состава (минимальную среду): нитрат калия – 4,0 г, однозамещенный фосфат калия – 0,6 г, двузамещенный фосфат натрия (двенадцати водный) – 1,4 г, сульфат магния – 0,8 г, вода дистиллированная 1 л, раствор микроэлементов стандартный №17 – 1 мл. В качестве субстрата использовали сахарозу, гексадекан или нефтепродукты из ряда: дизельное топливо, нефть, мазут, вносимые в среду в необходимом количестве в зависимости от целей культивирования. Для качественного определения деструкции индивидуальных алканов использовали агаризованную среду того же состава. Культивирование на жидких питательных средах осуществлялось в колбах 100-500 мл на орбитальных качалках при частоте вращения 100-200 об/мин при комнатной температуре.

Остаточное содержание нефтепродуктов в минеральной среде и в нефтесодержащих отходах определяли по стандартной методике при помощи концентратомера КН-2М. Для определения количества жизнеспособных клеток производили посев из кратных разведений на ПА в 3-х повторностях. Чашки термостатировали при 25°C в течение 2-3 суток, после этого проводили подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяли число КОЕ на 1 г (мл) субстрата. Обработку результатов осуществляли с помощью статистического пакета Statistica 6.0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проведено сравнительное изучение активности нефтеокисляющих актинобактерий, выделенных из нефтезагрязнённых почв, поч-

вогрунтов и нефтешламов. В качестве источника углеводородного питания использовали нормальные парафины ряда C₁₀ – C₁₈.

При 0,1 %-ной начальной концентрации углеводородных фракций в составе среды (табл. 1) наблюдается интенсивная утилизация всеми исследуемыми культурами актинобактерий в ряду C₁₆–C₁₈.

Таблица 1 - Степень утилизации (%) отдельных фракций углеводородов исследуемыми штаммами актинобактерий, при начальной концентрации субстрата 0,1%

Штамм	Углеводородный субстрат 0,1%							
	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
Rhodococcus erythropolis F1	36	33	32	53	73	100	100	98
Rhodococcus erythropolis B2	33	32	31	43	65	100	98	96
Nocardia sp J2	24	32	32	48	73	98	98	97
Dietzia maris J1	13	13	22	34	53	96	100	91
Gordonia sp. Z7	16	11	19	32	49	92	98	94
Rhodococcus sp J8	27	25	23	27	45	89	94	92
контроль	4	5	3	1	4	2	2	3

При деградации пентадекана наблюдается некоторое различие между S- (Rhodococcus erythropolis F1, Rhodococcus erythropolis B2, Nocardia sp. J2) и R- (Rhodococcus sp. J8, Dietzia maris J1, Gordonia sp. Z7) культурами. S-формы более полно деградируют исследуемый углеводород. Дальнейшее сокращение углеводородной цепочки приводит к угнетению нефтеокисляющей активности, что следует из невысокого процента деградации углеводородных фракций ряда C₁₄–C₁₀. При потреблении этих углеводородов также сохраняется различие в активности между S и R вариантами. Труднее всего R-вариантами потребляются декан и ундекан, степень деструкции, которых не превышает 25%.

При десятикратном увеличении концентрации углеводородов в составе среды также наиболее деградебельными для всех штаммов актинобактерий, используемых в эксперименте, остаются фракции C₁₆–C₁₈ (табл.2)

Таблица 2 - Степень утилизации (%) отдельных фракций углеводов исследуемыми штаммами актинобактерий, при начальной концентрации субстрата 1%

Штамм	Углеводородный субстрат 1%							
	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
<i>Rhodococcus erythropolis</i> F1	35	39	35	50	77	100	98	100
<i>Rhodococcus erythropolis</i> B2	39	37	35	43	69	100	100	100
<i>Nocardia</i> sp J2	28	30	29	44	68	99	99	92
<i>Dietzia maris</i> J1	10	8	19	32	54	93	98	90
<i>Gordonia</i> sp. Z7	15	14	21	28	50	95	92	90
<i>Rhodococcus</i> sp J8	19	22	19	24	47	82	80	79
контроль	7	4	3	5	3	4	3	4

Различия в потреблении углеводов ряда декан – пентадекан между S- и R-формами актинобактерий возрастают по мере увеличения концентрации углеводородного субстрата. Возможно, это связано с различными уровнями синтеза и экскреции биосурфактантов [11]. Общий процент потребления этих фракций углеводов существенно сокращается для штаммов *R. sp. J8*, *D. maris J1*, *Gordonia sp. Z7* и остается практически неизменным для *R. erythropolis F1*, *R. erythropolis B2* и *Nocardia sp. J2*.

При увеличении содержания углеводов в сто раз, по сравнению с начальным, токсическое действие на исследуемые культуры начинает сказываться и в ряду гексадекан – октадекан (табл. 3).

Таблица 2 - Степень утилизации (%) отдельных фракций углеводов исследуемыми штаммами актинобактерий, при начальной концентрации субстрата 10%

Штамм	Углеводородный субстрат 10%							
	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
<i>Rhodococcus erythropolis</i> F1	14	13	19	44	59	63	69	74
<i>Rhodococcus erythropolis</i> B2	25	22	21	50	62	75	78	74
<i>Nocardia</i> sp J2	13	12	21	49	55	67	69	73
<i>Dietzia maris</i> J1	7	7	6	19	33	63	70	62
<i>Gordonia</i> sp. Z7	10	11	12	23	30	54	63	59
<i>Rhodococcus</i> sp J8	11	10	16	22	39	65	63	70
контроль	3	3	5	2	3	3	4	2

Процент деградации этих углеводов при данной концентрации субстрата уменьшается в среднем на 10–30%. Высокую активность по

сравнению с другими культурами сохраняет лишь штамм *R. erythropolis* B2. По-видимому, при увеличении концентрации углеводородного субстрата сверх уровней адаптации изучаемых актинобактерий, выделение ими в среду биосурфактантов не оказывает определяющего вклада в процесс потребления углеводов и снижения их токсического действия на клетку. Степень деградации нефтепродуктов в этом случае детерминируется индивидуальной устойчивостью штамма к токсиканту.

Для дальнейшего исследования углеводородокисляющей способности штаммов и уровня их активности в отношении углеводов в качестве единственного источника углерода использовали наиболее распространённые поллютанты, такие как сырая российская нефть, топочный мазут М40, дизельное топливо, авиационный керосин, минеральные масла марок М8 и М10 и эмульсол, представляющий собой смесь веретенного масла и высокомолекулярных жирных кислот. Субстрат вносился, как и в предыдущем опыте, из расчёта 0,1%, 1% и 10 %. При деградации нефтепродуктов с преобладающим содержанием легких фракций (нефть, дизельное топливо и керосин), наблюдается одинаково высокая нефтеокисляющая активность у всех исследуемых штаммов актинобактерий (табл. 4). Степень деструкции исследуемых субстратов колеблется у разных штаммов от 76 до 96%.

Таблица 4 - Степень утилизации (%) нефтепродуктов и минеральных масел исследуемыми штаммами актинобактерий, при различной начальной концентрации субстрата

Штамм	Углеводородный субстрат 0,1%						
	Керосин	Дизтопливо	Нефть	Масло М8	Масло М10	Эмульсол	Мазут
<i>Rh. erythropolis</i> F1	88	97	93	81	80	80	93
<i>Nocardia</i> sp. J2	85	97	96	57	59	73	84
<i>Rh. erythropolis</i> B2	79	84	91	83	78	85	92
<i>Dietzia maris</i> J1	76	89	92	45	39	59	77
<i>Gordonia</i> sp. Z7	76	88	82	47	44	63	83
<i>Rhodococcus</i> sp. J8	78	94	94	39	42	64	73
контроль	5	6	9	5	8	2	3

	Углеводородный субстрат 1%						
Rh. erythropolis F1	87	95	96	84	87	82	86
Nocardia sp. J2	89	90	92	59	63	65	82
Rh. erythropolis B2	79	88	86	78	84	80	91
Dietzia maris J1	69	73	78	50	41	45	68
Gordonia sp. Z7	79	86	72	37	42	29	61
Rhodococcus sp. J8	55	71	75	43	41	50	73
контроль	3	5	2	2	5	4	3
	Углеводородный субстрат 10%						
Rh. erythropolis F1	63	76	63	56	51	56	59
Nocardia sp. J2	49	51	48	47	43	34	45
Rh. erythropolis B2	50	59	65	52	57	51	52
Dietzia maris J1	36	44	31	32	34	19	22
Gordonia sp. Z7	33	39	34	30	22	14	26
Rhodococcus sp. J8	34	36	34	35	29	18	29
контроль	2	2	3	3	4	2	2

При переходе к минеральным маслам или нефтепродуктам, содержащим большее количество высокомолекулярных углеводов (эмульсол и мазут), более высокую активность показывают штаммы, выделяющие поверхностно-активные вещества. Наиболее показательны в этом плане штаммы *R. erythropolis* B2 и *R. erythropolis* F1, проявляющие наряду с нефтеокисляющими свойствами способность к продукции биосурфактантов [12], чем объясняется наивысшая степень деградации ими всех высокомолекулярных углеводов. При однопроцентной концентрации углеводов в среде вновь, как и в опыте с индивидуальными углеводородами, происходит разделение штаммов на две четко обособленные группы. У актинобактерий, выделяющих экзополисахариды (S-формы), нефтеокисляющая активность по отношению ко всем используемым в эксперименте углеводородам существенно выше, у R - форм. Обособленность групп S- и R-культур в нефтеокисляющей активности сохраняется. В целом же, возросшая концентрация нефтепродуктов не оказала угнетающего воздействия на исследуемые штаммы актинобактерий.

Внесение в питательную среду 10% углеводов в качестве источника углерода вызвало уменьшение нефтеокисляющей активности у

штаммов *R. sp. J8*, *D. maris J1*, *G. sp. Z7* в два-четыре раза (см.табл. 4). Штаммы *R. erythropolis F1* и *R. erythropolis B2* сохранили высокое сродство к углеводородному субстрату, несмотря на его концентрацию. Деструкция ими углеводородного субстрата не опускалась ниже 50%. Возникшая разобщённость между исследуемыми актинобактериальными штаммами сохранилась и при 10%-ной концентрации углеводов. Выраженная разница была между штаммами, выращенными на труднодеградируемых субстратах, содержащих высокомолекулярные углеводороды. Угнетённость штаммов была ниже, чем при использовании индивидуальных углеводов в аналогичной концентрации, что связывается нами с гетерогенностью используемых субстратов. В этом случае ни один из компонентов сложного углеводорода не достиг концентрации, достаточной для оказания существенного ингибирующего воздействия. Самым труднопотребляемым субстратом оказались минеральные масла вне зависимости от их марки. К их активной деструкции были способны лишь два штамма *R. erythropolis F1* и *R. erythropolis B2*, что даёт возможность эффективного использования данных культур как индивидуально, так и в составе консорциумов при ликвидации загрязнения субстрата минеральными маслами или их компонентами. Общий процент деструкции эмульсола был несколько выше, что может объясняться наличием в его составе высокомолекулярных жирных кислот, за счёт которых происходило начальное интенсивное накопление микробного пула. Достоверные отличия между S- и R-морфотипами в потреблении углеводов и минеральных масел сохранялись при любой концентрации поллютанта.

Таким образом, нами была определена степень потребления индивидуальных углеводородных фракций, наиболее часто встречающихся в качестве поллютантов минеральных масел, а также установлены различия в активности между исследуемыми штаммами актинобактерий, проявляющиеся в неоднозначной реакции на пониженные и повышенные концен-

трации нефтепродуктов, содержащих в своём составе легкие и тяжелые фракции.

Для оценки возможности использования штаммов в процессах биоремедиации субстратов, загрязнённых различными углеводородами, проводили изучение скорости роста культур при использовании различных нефтепродуктов в качестве источников углерода. В качестве источников углеродного питания, нами было решено использовать гексадекан (как субстрат, содержащий лёгкие углеводородные фракции), топочный мазут М 40 (как субстрат, содержащий преимущественно тяжелые углеводородные фракции) и сырую российскую нефть (содержащую как легкие, так и тяжелые фракции углеводородов и являющуюся наиболее распространённым загрязнителем окружающей среды) (рис. 1).

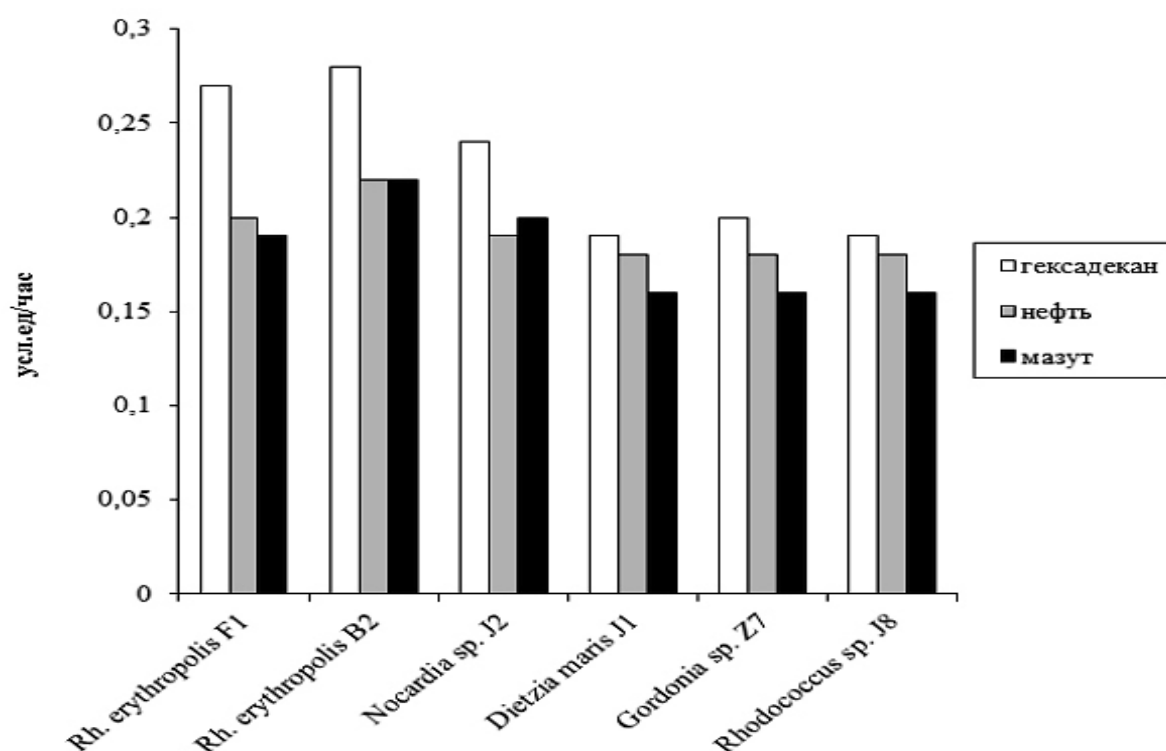


Рисунок 1- Максимальные удельные скорости роста культур актинобактерий при культивировании на различных субстратах

Сравнение удельных скоростей роста показывает, что при любом источнике углеводородного субстрата S-формы бактерий проявляют более

высокую скорость роста по сравнению с R-формами. Для всех исследуемых культур максимальная удельная скорость роста была отмечена на среде с гексадеканом, наименьшая удельная скорость роста отмечена на среде с мазутом. Исключение составляет штамм *Rhodococcus erythropolis* B2, для которого удельные скорости роста при культивировании на среде с нефтью и мазутом были одинаковы, а также культура *Nocardia* sp. J2, для которой удельная скорость роста на среде с мазутом была выше, чем в аналогичной среде с нефтью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе культивирования были отмечены достоверные различия в параметрах роста между S и R-формами нефтеокисляющих актинобактерий. У S-форм выше максимальная удельная скорость роста, для них характерна более быстрая адаптация к новому субстрату. В опытах с использованием в качестве субстрата нефти и мазута S-формы актинобактерий быстрее адаптировались к условиям среды. Таким образом, при проведении работ по биоремедиации целесообразно использовать штаммы *Rhodococcus erythropolis* B2 и *Nocardia* sp. J2, относящиеся к S-формам, как обладающие высокой скоростью роста при различных концентрациях углеводов с различной длиной цепи и фракционным составом.

Список литературы

1. Гирич И.Е., Малахов А.А., Гавриш Е.Ю., Карасева Э.В. Таксономическое разнообразие углеводородокисляющей микрофлоры в нефтезагрязненных почвах Краснодарского края // Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды. Пущино, 2001. С. 24-27
2. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.Н., Поршнева О.В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов экосистем разных климатических зон // Микробиология. 1994. Т. 63, № 5. С. 917-922.
3. Малахов А.А., Гирич И.Е., Нечитайло Т.Ю., Карасева Э.В. Роль нефтеокисляющей микрофлоры в биоремедиации почв и почвогрунтов, загрязненных нефтью // Экология-2000: Мат. межд. научно-практич. конф. Москва, 2000. С. 23-24

4. Oberbremer A., Müller-Hurtig R. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989. V. 31. P. 582-586.
5. Makula R., Finnerty W.R. Microbial assimilation of hydrocarbons, fatty acids derived from normal alkanes // *J. Bacteriol.* 1986. V. 95. P. 2102–2107.
6. Бердичевская М.В. Особенности физиологии родококков разрабатываемых нефтяных залежей // *Микробиология.* 1989. Т. 58. № 1. С. 60-65.
7. Barbeau C., Deschenes L., Karamanev D., Comeau Y., Samson R. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 48. P. 745-752.
8. Wakayama Y, Nakajima M, Murooka H. Isolation and characterization of S and R strains of *Nocardia* sp. CF222. *Bull Coll Agric Vet Med Univ.* 1980;V37. P.99–105.
9. Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi, Hiroshi Anzai, Mutsuyasu Nakajima, Shigeaki Narayama Relationships between Colony Morphotypes and Oil Tolerance in *Rhodococcus rhodochrous* *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 November; 66(11): 5073–5077.
10. Карасева Э.В., Гирич И.Е., Худокормов А.А., Алешина Н.Ю., Карасёв С.Г. Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью // *Биотехнология.* -2005. - № 2. -С. 67-72.
11. Волченко Н.Н., Карасёва Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий - продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама // *Биотехнология.* -2006. -№ 2. -С. 57-62.
12. Карасёва Э.В. Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самков А.А., Карасёв С.Г., Батина Е.В., Самкова С.М. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* B2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* - 2012. - № 83. - С.154-167

References

1. Girich I.E., Malahov A.A., Gavrish E.Ju., Karaseva Je.V. Taksonomicheskoe raznoobrazie uglevodorodokisljajushhej mikroflory v neftezagryznennyh pochvah Krasnodarskogo kraja // *Jekobiotehnologija: bor'ba s nefljanym zagryzneniem okruzhajushhej sredy.* Pushhino, 2001. S. 24-27
2. Koronelli T.V., Dermicheva S.G., Il'inskij V.V., Komarova T.N., Porshneva O.V. Vidovaja struktura uglevodorodokisljajushhih bakteriocenzov jekosistem raznyh klimaticheskikh zon // *Mikrobiologija.* 1994. T. 63, № 5. S. 917-922.
3. Malahov A.A., Girich I.E., Nechitajlo T.Ju., Karaseva Je.V. Rol' nefteokisljajushhej mikroflory v bioremediacii pochv i pochvogrunto, zagryznennyh nef'tju // *Jekologija-2000: Mat. mezhd. nauchno-praktich. konf. Moskva,* 2000. S. 23-24
4. Oberbremer A., Müller-Hurtig R. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1989. V. 31. P. 582-586.
5. Makula R., Finnerty W.R. Microbial assimilation of hydrocarbons, fatty acids derived from normal alkanes // *J. Bacteriol.* 1986. V. 95. P. 2102–2107.
6. Berdichevskaja M.V. Osobennosti fiziologii rodokokkov razrabatyvaemyh nefljanyh zalezhej // *Mikrobiologija.* 1989. T. 58. № 1. S. 60-65.

7. Barbeau C., Deschenes L., Karamanev D., Comeau Y., Samson R. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 48. P. 745-752.

8. Wakayama Y, Nakajima M, Murooka H. Isolation and characterization of S and R strains of *Nocardia* sp. CF222. *Bull Coll Agric Vet Med Univ.* 1980;V37. P.99–105.

9. Noriyuki Iwabuchi, Michio Sunairi, Hiroshi Anzai, Mutsuyasu Nakajima, Shigeaki Harayama Relationships between Colony Morphotypes and Oil Tolerance in *Rhodococcus rhodochrous* *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 November; 66(11): 5073–5077.

10. Karaseva Je.V., Girich I.E., Hudokormov A.A., Aleshina N.Ju., Karasjov S.G. Bioremediacija chernozemnoj pochvy, zagryznennoj neft'ju // *Biotehnologija.* -2005. -№ 2. -S. 67-72.

11. Volchenko N.N., Karasjova Je.V. Skrining uglevodorodokisljajushhijh bakterij - producentov poverhnostno-aktivnyh veshhestv biologicheskoy prirody i ih primenenie v opyte po remediacii neftezagryznennoj pochvy i nefteshlama // *Biotehnologija.* -2006. -№ 2. -S. 57-62.

12. Karasjova Je.V. Volchenko N.N., Hudokormov A.A., Samkov A.A., Karasjov S.G., Batina E.V., Samkova S.M. Nefteokisljajushhij shtamm *Rhodococcus erythropolis* B2 kak osnova sozdaniya biopreparata dlja likvidacii uglevodorodnyh zagryznenij i rekul'tivacii zemel' // *Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* - 2012. - № 83. - S.154-167