



## ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS* В БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТЕПРОДУКТОВ (НА ПРИМЕРЕ БЕНЗИНА)

**Конурбаева М.У.**

Биолого-почвенный институт НАН КР, Бишкек, Кыргызстан

E-mail: tinatin2252@gmail.com

**Доолоткельдиева Т.Д.**

Кыргызско-Турецкий университет «Манас», Инженерный факультет, Бишкек, Кыргызстан

E-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

### Аннотация

Исследовали нефтеокисляющий потенциал двух штаммов бактерий рода *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ISS-4, *P. putida* 5mn-2 на жидкой среде содержащий различный диапазон концентраций бензина. В результате скрининга, был отобран, штамм *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, который оказался более устойчивым к высоким концентрациям бензина (в 100 раз), в жидкой среде. Далее, провели опыты нефтеокисляющей способности штамма на плотной среде, с ещё более высокими концентрациями углеводорода (в 1000 раз превышающий ПДК). Показано, что наиболее устойчивым к действию бензина явился штамм – деструктор, *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, способный к росту на среде с повышенным содержанием бензина.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas*, нефтеокисляющая способность, нефтепродукт, ПДК, концентрация.

### THE STUDY OF *PSEUDOMONAS* STRAINS ABILITY IN BIODEGRADATION OF OIL PRODUCTS (BY THE EXAMPLE OF GASOLINE)

#### Abstract

Oil oxidizing ability of two bacteria of *Pseudomonas* genus: *P. fluorescens* ISS-4 and *P. putida* 5mn-2 on the liquid medium, containing a various range of concentration of gasoline was investigated.

*Pseudomonas fluorescens* ISS-4 has been selected as the most resistant strain to high concentration of gasoline (in 100 times exceeding of maximum concentration limit) as a result of screening in the liquid medium.

Also oil oxidizing ability of *Pseudomonas* bacteria was tested on agar medium with higher concentration of hydrocarbon (in 1000 times exceeding of maximum concentration limit). On agar medium as resistance to high concentration of gasoline was selected the same *Pseudomonas fluorescens* ISS-4 strain, that should be recommended as decomposer of oil pollution in the water and soil environment.

**Key words:** *Pseudomonas* bacteria, oil oxidizing ability, bioremediation of oil pollution.

### Введение

Нефть и нефтепродукты являются одними из самых опасных и широкомасштабных загрязнителей окружающей среды [10]. Если нефтяные загрязнения характерны в основном только для районов добычи, переработки и транспортировки нефти, то загрязнения нефтепродуктами, такими как бензин, дизельное топливо, керосин, смазочные масла, мазут и т.д., распространены повсеместно.

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами приводит к негативным изменениям в биоценозах. Так, один литр нефти лишает кислорода 40000 л воды, тем самым, подавляя, аэробные организмы, а при концентрации нефти в воде всего 0,1-0,01 мг/л икринки рыб погибают за несколько суток. Процесс самовосстановления загрязненной среды, по мнению большинства исследователей, идет более 10-25 лет [11].

В настоящее время существует большое количество методов очистки нефтезагрязненных объектов, но наиболее перспективными являются микробиологические. Большинство ученых привлекают методы биоремедиации, как наиболее дешевые и не наносящие дополнительного ущерба окружающей среде. Описано более 20 родов бактерий и более 10 родов грибов, также некоторые виды дрожжей, способных к биодegradации различных нефтяных углеводородов [1,7,9]. Однако большее предпочтение отдают бактериальным препаратам, т.к. они более жизнеспособны и конкурентноспособны в окружающей среде. На основе активных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов разработаны и созданы биопрепараты для ликвидации нефтезагрязнений окружающей среды, применяемые с различной степенью эффективности [2, 3, 6, 8].

Целый ряд современных биотехнологий предусматривает процесс микробной интродукции - внесение в природные среды (почву, грунты, водоемы, филлосферу растений) микроорганизмов с той или иной полезной функцией.

Одним из приоритетных штаммов – деструкторов являются бактерии из рода *Pseudomonas*, как было указано выше, этот род является одним из активных штаммов, во многих работах указывают на эффективность этого штамма. Некоторые авторы, ставят на второй ряд по эффективности, как активный штамм-нефтедеструктор.

Большинство псевдомонад – типичные хемоорганотрофы. Одним из важных критериев бактерий рода *Pseudomonas*, является особенность углеродного

питания, т.е. их способность усваивать определенный набор органических соединений в качестве единственного источника углерода и энергии [12].

В Кыргызстане микробиологические работы по деструкции нефтепродуктов проводятся впервые.

Целью данной работы являлось определение метаболическую активность штаммов *Pseudomonas* и отбор наиболее способных к утилизации загрязнения нефтепродуктами, на примере бензина в широком диапазоне концентраций.

### **Материал и методы исследования**

В работе использовали активные штаммы из лабораторной рабочей коллекции *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, (выделен из почвенных образцов) и *Pseudomonas putida* 5mn-2 (выделен из речной воды). Для проведения опытов, была использована жидкая среда содержащей стерилизованной речной воды, с добавлением 0,5 % мясо-пептонного бульона.

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл жидкой питательной среды и различных концентраций бензина (Аи76), на круговой качалке (180 об/мин) при 24<sup>0</sup>С в течение 5 суток. Количественный контроль роста микроорганизмов осуществляли методом предельных разведений с высевом на чашки Петри с МПА и последующим подсчетом колоний. Морфологию и жизненный цикл изучали у 6, 12, 24, 36, 72 и 125 часовых культур, с использованием световой микроскопии (фазовый контраст). Инокулирование колб с бензином производили суспензией микроорганизмов 10<sup>6</sup> кл/мл (5 мл на 100 мл среды) с определенной величиной оптической плотности. Оптическую плотность (ОП) определяли на ФЭК-КФК-2 при длине волны 540 нм и толщине кюветы 5,075 см. Также определяли через каждый промежуток времени, рН жидкости (И-120.2).

Деструкцию бензина определяли визуально, в опытных вариантах сплошная пленка разрушается, превращаясь во взвесь мельчайших частиц.

**Таблица 1.** Концентрации бензина в жидких средах.

ПДК	0,05 мг/л
В 2 раза >	0,1 мг/л
В 4 раза >	0,2 мг/л
В 6 раз >	0,3мг/л
В 50 раз >	2,5 мг/л
В 100 раз >	5,0 мг/л
Контроль	-

**Примечание:** ПДК указан для вод предназначенных для хозяйственно-бытовых нужд Кыргызской Республики.

Далее, провели опыты по определению нефтеокисляющей способности штамма на плотной среде. В результате скрининга штамм *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, который оказался более устойчивым к высоким концентрациям бензина (в 100 раз), в жидкой среде. В качестве питательной среды использовали МПА (мясо-пептонный агар). Бензин добавляли к питательной среде в асептических условиях. Чувствительность псевдомонад к содержанию в питательной среде, высоких концентраций бензина выражали характером роста колоний и численностью колониеобразующих единиц (КОЕ). Использовали метод глубинного посева из чистых культур бактерий *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, в концентрации  $10^5$  кл/мл.

**Таблица 2.** Концентрации бензина (мл бензина А76/100мл питательной среды).

ПДК	0,05 мл/л
В 150 раза >	7,5 мл/л
В 250 раза >	12,5 мл/л
В 500 раз >	25 мл/л
В 1000 раз >	50 мл/л
Контроль	-

Результаты и обсуждение.

#### Нефтеокисляющая способность псевдомонад на жидкой среде

В лабораторных условиях исследовали нефтеокисляющий потенциал бактерий рода *Pseudomonas*, на примере бензина, в жидких средах. Бензин представляет собой сложное соединение, легколетучих ациклических углеводородов, в большей части, которого, содержится очень опасная ядовитая соль,  $PbCl_4$ . В бензиновой части нефти доказано присутствие замещенных соединений бензола, содержащих 10 атомов углерода. Согласно опубликованным данным, нефть подавляет активность нитрификаторов и целлюлозаразлагающих микроорганизмов, но стимулирует развитие аммонификаторов, денитрификаторов и азотофиксаторов [13]. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, нами был отнесен к 3 биовару, как активный денитрификатор, рост колоний обильный, с желто-зеленой флюоресценцией, был выделен из темно-каштановых почв Иссык-кульской области. Бактерия, *Pseudomonas putida* 5mp-2 синтезирует темноокрашенные пигменты группы меланинов. Был выделен вблизи авто-заправочной станции, из речной воды (река Аламедин), с маслянистыми накоплениями бензина.

Данные, полученные при измерении оптической плотности штаммов при присутствии различных концентраций бензина и изменения значения рН

среды приведены в таблице 2. Как видно, из таблицы, показатели резко варьируют, так, при выращивании *Pseudomonas fluorescens* ISS-4 на среде содержащей бензин в дозе равной ПДК (0,05 мг/л) наблюдалось небольшое колебание оптической

плотности биомассы растущей культуры. Когда как, через 6 часов инкубации значение равнялось - 0,24, то такое же значение получено через 36 часов, а через 72 и 125 часов зафиксировано снижение значения до 0,20 и 0,22. Следовательно, культура находилась в логарифмической, затем в стационарной фазе между 6 и 36 часами, так как дальнейшего повышения биомассы не произошло, и в следующих фазах естественно наблюдалось снижение количества делящихся клеток. Тогда как при выращивании *Pseudomonas fluorescens* ISS-4 на среде содержащей бензин в дозах в 2, 4, 6, 50 и 100 раз превышающих ПДК через 6 часов происходит заметное возрастание оптической плотности культуры, а при 50 и 100 раз превышающих ПДК дозы ее значения составляли 0,54 и 1,0 соответственно, т.е. 2,5 и 4 раза больше, чем, в контроле (0,23). Следовательно, за это время культура находилась в логарифмической фазе развития, и интенсивно утилизирует внесенные дозы бензина как источник углерода, чем выше доза, тем она набирает темп роста и размножения, тем самым увеличивается биомасса и плотность среды. Через 12 часов начинается некоторое снижение оптической плотности растущей культуры, возможно культура переходит на стационарную фазу, затем начинаются последующие фазы. Следует отметить при некоторых дозах, например при дозах 0,2 мг/л и 0,3 мг/л (4 и 6 раз, превышающий ПДК) оптическая плотность оставалась почти на одном уровне через 6 часов и 125 часов. По-видимому, эти дозы не вызывают резких изменений в активности метаболических путей процесса окисления нефтепродукта.

Через 125 часов сохраняется более высокий уровень активности метаболизма у культуры при присутствии высоких доз бензина, об этом свидетельствует высокие значения оптической плотности в сравнении с контролем.

Измерения значения рН показали что, через 6 часов в среде господствовала кислая среда (от 5,27 до 5,68), со временем она переходит в нейтральную, даже в щелочную (8,05). Это по-видимому, связана с ферментативной активностью клеток бактерий, использующих молекулы ароматических углеводородных соединений как источника углеродного питания. По мере накопления продуктов метаболизма значения рН меняется в сторону щелочного. Многие авторы отмечают, что при рН 5,0-7,5, бактерии наиболее интенсивно очищали воду от нефти, чем при рН 4 или рН 9, даже если плотность их суспензии оставалась почти неизменной [4]. Полученные нами данные также показали, что через 6 часов, когда произошло, наибольшее накопление биомассы, при больших дозах бензина культура работала при кислой реакции среды.

В контроле рН составляла 6,08, а к 5-й сутки – 7,02.

При выращивании второго штамма - *Pseudomonas putida* на среде содержащей бензин в различных дозах мы наблюдали те же тенденции особенности роста культуры при *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, однако следует отметить, что оптическая плотность *Pseudomonas putida* была ниже чем *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, по-видимому это связано с культуральными и физиологическими особенностями этого штамма.

Таблица 3. Показатели оптической плотности растущей культуры и рН среды.

№	Наименование	6 часов		12 часов		24 часов		36 часов		72 часа		125 часа	
<b>Pseudomonas Fluorescens</b>													
1.		ФЭК	рН	ФЭК	рН	ФЭК	рН	ФЭК	рН	ФЭК	рН	ФЭК	рН
2.	ПДК	0,24	5,68	0,21	6,36	0,18	7,56	0,24	7,41	0,20	7,51	0,22	8,02
3.	В 2 раза >	0,25	5,80	0,22	6,44	0,27	7,44	0,21	7,22	0,25	7,38	0,27	7,55
4.	В 4 раза >	0,28	5,82	0,23	6,02	0,20	6,23	0,22	6,55	0,27	7,44	0,3	7,53
5.	В 6 раз >	0,31	5,73	0,28	5,93	0,27	6,15	0,28	6,46	0,3	7,06	0,31	7,57
6.	В 50 раз >	0,54	5,44	0,36	5,82	0,35	6,18	0,41	6,27	0,37	6,97	0,35	8,01
7.	В 100 раз >	1,0	5,27	0,82	5,64	0,6	6,05	0,63	6,12	0,63	6,84	0,65	8,05
8.	Контроль	0,23	6,08	0,26	6,03	0,26	7,05	0,28	6,83	0,28	6,96	0,25	7,02
<b>Pseudomonas Putida</b>													
10.	ПДК	0,12	6,32	0,18	5,93	0,16	6,82	0,17	6,87	0,19	7,21	0,21	7,32
11.	В 2 раза >	0,18	6,03	0,16	5,54	0,27	7,16	0,23	7,12	0,25	6,93	0,26	7,15
12.	В 4 раза >	0,21	5,84	0,20	5,42	0,15	6,15	0,11	6,02	0,13	7,21	0,16	7,44
13.	В 6 раз >	0,27	5,56	0,22	5,33	0,21	6,02	0,19	5,96	0,22	7,02	0,23	7,83
14.	Контроль	0,16	6,09	0,17	6,37	0,19	6,80	0,22	6,85	0,22	6,96	0,20	7,02

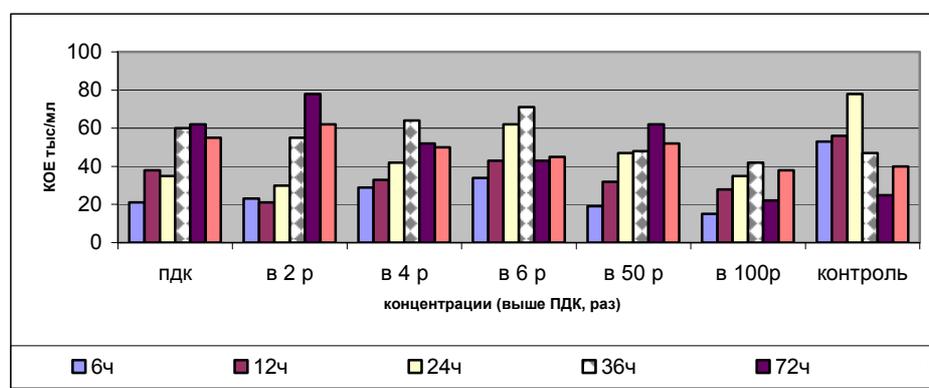
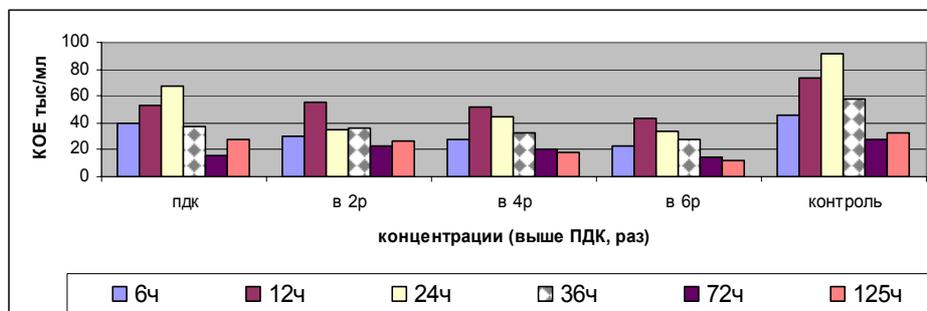
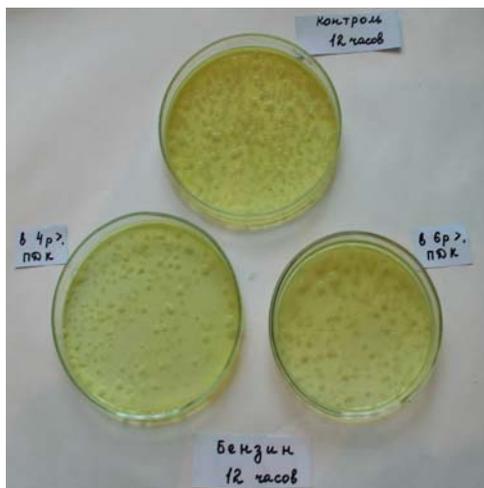


Рис. 1. Динамика КОЕ Pseudomonas fluorescens, в разных концентрациях бензина и на разных промежутках времени.



**Рис. 2.** Динамика КОЕ *Pseudomonas putida*, в разных концентрациях бензина и на разных промежутках времени.



**Рис. 3.** Рост бактерий *Pseudomonas*



**Рис. 4.** Жидкая среда с разными *fluorescens* (12 часовые культуры), концентрациями бензина.

Диаграммы 1, 2 отражают количества выросших колониеобразующих колоний (КОЕ) бактерий рода *Pseudomonas* на плотной агаровой пластинке после посева из жидкой растущей среды с различными дозами бензина, на разных промежутках времени.

В контрольном варианте (без бензина) наибольшее количество КОЕ *Pseudomonas fluorescens* (80 тыс. клеток/мл) было получено из 24 часовой жидкой культуры. Из 6-ти и 12 часовых культур также выросло значительное число КОЕ бактерий (45 тыс и 55 тыс. клеток/мл соответственно). Снижение числа жизнеспособных КОЕ наблюдалось из 36 и 72 часовых жидких культур.

Тогда, как число КОЕ *Pseudomonas fluorescens* было наибольшим (60 тыс и 62 тыс.соответственно) из 36 и 72-часовой культуры со содержанием бензина в дозе 0,05 мг/л (на уровне ПДК). Значительное число выросло и из 125-часовой культуры.

При дозе 0,1 мг/л (в 2 раза, превышающий ПДК), наибольшее количество КОЕ было получено из 72 часовой культуры, значительное число выросло из 36 и 125 - часовой культуры. При дозах 0,2 мг/л и 0,3 мг/л (в 4 и 6 раз, превышающий ПДК) наибольшее количество КОЕ было получено из 36 часовой культуры.

При увеличении дозы до 50 раз и 100 раз, превышающий ПДК, наблюдается уменьшение числа выросших КОЕ *Pseudomonas fluorescens*, в первых фазах развития бактерий. Эти данные указывают, что высокие дозы бензина ингибируют процессы, связанные с делением и размножением клеток. Затем в последующие часы (через 72 часа) наблюдается возрастание выросших клеток, КОЕ на среде.

Таким образом, эффективность утилизирующей способности *Pseudomonas fluorescens* была высока при внесении бензина в дозах 2, 4, 6 и 50 раз больше ПДК. Эта способность культуры четко проявляется через 36 часов после инкубации.

Следует отметить, выделение насыщенного желто-зеленого пигмента в питательную среду в опытных культурах *Pseudomonas fluorescens* отмечалось через 12 часов (рис.3), возможно, это связано с активизацией окисляющих путей метаболизма и адаптивной способностью штамма. В образцах с концентрациями в 50 раз и 100 раз, имели более слабый пигмент, также образовали больше точечных колоний. Как, видно на рис.4, образовавшаяся пленка бензина на поверхности жидкой среды в начале опыта, со временем превращается во взвесь частиц, к 12 часам, которая, оседает по краям посуды. Были зафиксированы изменения в морфологии клеток под микроскопом, при использовании разных концентрациях и в разные часы опыта, Так, в концентрации бензина, превышающей ПДК в 2 раза, клетки оставались без видимых изменений, тогда как при концентрации бензина превышающей ПДК в 100 раз клетки были увеличены в размере, становились сферическими, если они обычно представляют собой тонкие палочки.

Анализ 2- ой диаграммы, показал, что штамм *Pseudomonas putida*, в отличие от *Pseudomonas fluorescens*, проявил невысокую утилизирующую активность в отношении бензина в жидкой среде. На всех промежутках опыта число выросших КОЕ этой культуры, было в 2 раза ниже, чем в контроле. Контрольные варианты отличались обильным пигментообразованием, насыщенного и темно-коричневого цвета, который выделяется в жидкую среду.

Результаты исследований показали, что из двух испытанных штаммов, культура *Pseudomonas fluorescens* обладает высокой утилизирующей активностью, используя намного превышающие ПДК дозы бензина (2, 4, 6 и 50 раз) как источник питания, об этом свидетельствовали активное деление клеток, накопления биомассы на всех промежутках фазы развития. Тогда как штамм *Pseudomonas putida* проявил низкую активность, по сравнению с *Pseudomonas fluorescens*.

### Нефтеокисляющая способность псевдомонад на плотной среде

Как указано выше, ранее была исследована нефтеокисляющая способность 2х штаммов псевдомонад на жидкой среде, в результате был отборан штамм *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, который оказался более устойчивым к высоким дозам бензина.

Изучение количественных закономерностей колониального роста микроорганизмов представляет очевидный интерес: этот тип роста преобладает в природе, а выращивание микроорганизмов на плотных средах – один из основных приемов, принятых в лабораторной практике.

Нефтеокисляющий потенциал штамм *Pseudomonas fluorescens* ISS-4, на примере бензина, с разными концентрациями, исследовали на твердых питательных средах в лабораторных условиях.

Как показывают данные диаграммы 5, высокая численность бактерий, наблюдается в контрольном варианте. На средах содержащие различные концентрации бензина показатели роста резко варьируют. Так, на среде содержащей концентрацию бензина 12,5 мг/л (ПДК в 250 раз выше), отмечается значительное увеличение клеток 194 тыс. клеток, чем при дозе ПДК (0,05мг/л – 152 тыс. клеток). При дозе равной 7,5 мг/л (114 тыс.кл), отмечалось ингибирование роста клеток, численность меньше в 2 раза, по сравнению с контролем. В концентрации 25 мг/л (в 500 раз выше ПДК), количество клеток возрастает по сравнению с дозой равной ПДК(0,05). При перемешивании бензина с питательной средой с дозой 50 мл бензина на 100мл питательной среды, в чашках Петри отдельным слоем выделялась масса бензина, вероятно рост колоний был бы невозможен. Но и при этой высокой дозе, которая превышает дозу ПДК в 1000 раз, абсолютного ингибирования роста клеток не произошло, единицы колоний были получены на поверхности среды. Эти данные еще раз утверждают, что клетки данного штамма могут использовать повышенные концентрации бензина в качестве источника углерода и тем самым утилизировать его накопление в окружающей среде.

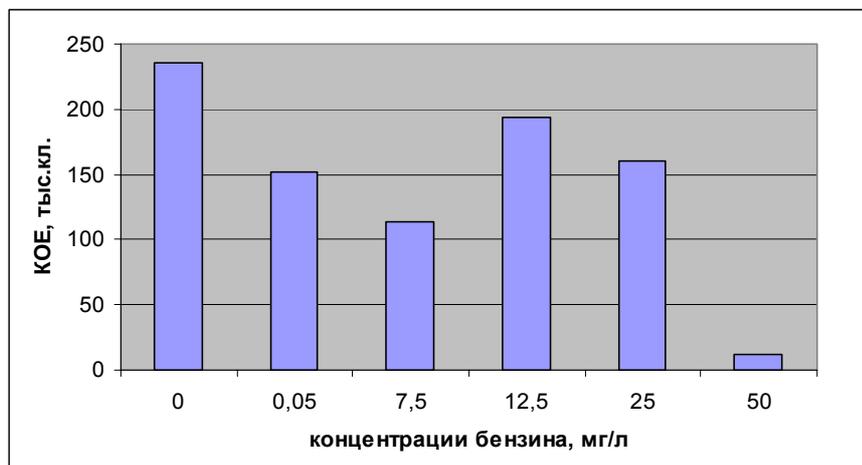


Рис. 5. Численность КОЕ штамма ISS-4, в разных концентрациях бензина.

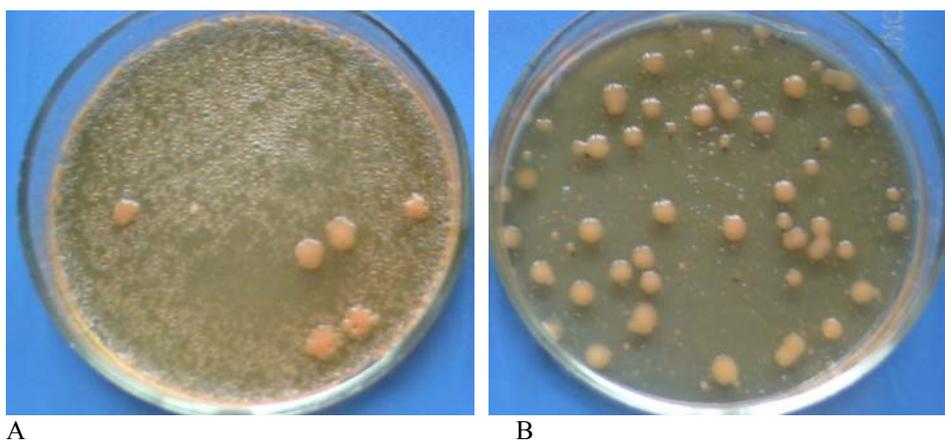


Рис. 6. А - Колонии *Pseudomonas fluorescens* на среде содержащей 50 мг/л бензина, В – на среде 25 мг/л бензина.

Рост клеток отмечался уже на второй день постановки опыта, в особенности в контроле наблюдалось активное увеличение числа клеток. В разных концентрациях по мере возрастания дозы замедлялся рост клеток. Так, в концентрации в 50 мг/л рост колоний наблюдался на третий день постановки опыта. Как видно из рисунка 6 колонии имеют несвойственную им форму, размер и цвет. В концентрации 50 мг/л, колонии имеют более насыщенный кремовый цвет, более крупные чем своего естественного размера, края сильно зубчатые. В то же время в концентрации 25 мг/л колонии имеют определенную форму, размер, но цвет колоний грязно-кремовый. При выделении бактерии из естественной

среды обитания, он синтезировал насыщенный зеленый пигмент, то в повышенных концентрациях бензина это свойство утрачивается. При предыдущем опыте в жидких питательных средах пигментообразование этих бактерий отмечалось даже в концентрации в 2,5 мг/л, колонии синтезировали насыщенные зеленого цвета пигмент, который окрашивал всю питательную среду. При культивировании на твердых питательных средах эти же штаммы под воздействием высоких доз бензина не образуют пигмент.

Также интересная картина была получена в препаратах под микроскопом, где с увеличением дозы бензина, палочки, имеющие форму прямых или слегка изогнутых размеров, раздувались, образуя сферическое тело. Исследования А.Ю. Иванова с соавторами, отмечают, что одним из механизмов резистентности у грамотрицательных бактерий заключается в связывании катионов металлов с белками с богатым содержанием цистеина, которые локализованы в клеточной оболочке [4]. Взаимодействие липофильных соединений, в том числе и углеводов нефти, с клеточными мембранами проявляется на уровне липид-липидных и липид-белковых взаимодействий и должно приводить к изменению структуры мембраны. В результате изменяется толщина фосфолипидного бислоя, его текучесть и активность локализованных в мембране ферментов и транспортных белков [15]. Эти изменения, в свою очередь, приводят к изменениям в функционировании клеточных мембран, в частности, к нарушению их барьерных свойств и увеличению пассивного потока протонов и других внутриклеточных ионов через мембраны. Изменения электроориентационных и оптических измерений в свойствах бактериальных мембран ведет к нарушению структуры и функции мембраны, а это влияет, в свою очередь, на энергетический статус клетки и ее гомеостаз и, в конечном итоге, в критических случаях приводит к снижению их жизнеспособности [16]. Мы полагаем, что те морфологические изменения хорошо различимые в виде раздувания и увеличения объема клеток, связаны с выше описанными явлениями.

Таким образом, полученные результаты показали, что на разных по консистенции средах бактерии *Pseudomonas* по разному проявляют свою способность утилизировать высокие концентрации бензина, как одного из широко распространенных нефтепродуктов.

На жидкой среде бактерии больше накапливают биомассу, дольше сохраняют свою жизнеспособность и способность образовывать пигмент. Это дает основание считать, в условиях глубинного культивирования в жидкой среде бактерии находят более благоприятные условия для проявления ферментативной активности и в способности утилизировать повышенные дозы углеводорода как источников углерода. Следовательно было бы более рационально использовать глубинное культивирование для получения биомассы бактерий в целях использования ее для очистки загрязнений почвенной и водной среды от высоких концентраций нефтепродуктов.

Культивирование бактерий на плотной среде имеют также свои преимущества. Этот способ позволяет нам легко подсчитать численность клеток, т.е. проследить за численностью жизнеспособных клеток, что является неотъемлемой частью лабораторных работ.

Проведенные исследования показали, что бактериальная деструкция нефтепродуктов возможна, поиск активных бактерий способных разлагать высокие дозы загрязнений этими веществами остается целесообразным. Эти исследования имеют продолжение.

### Литература

1. Atlas R.M. // Water Sci. and Technol. 1986. V.18. № 2. P. 59-67.
2. Борзенков И.А., Беляев С.С., Глумов И.Ф., Ибатуллин Р.Р., Иванов М.В., Росчектаева Н.А. 1996. // Патент РФ. №2062669.
3. Демиденко А.Я., Демурджан В.М. 1988. // Пути восстановления нефтезагрязненных почв черноземной зоны Украины. М.: Наука, С.197.
4. Иванов А.Ю., Гаврюшкин А.В. и др. 1999. Устойчивость некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas* к повреждающему действию ионов тяжелых металлов.//Микробиология., Т.68, №3, с. 366-374.
5. Квасников Е.И., Ключникова Т.М. 1981. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наук. Думка, С. 75-85.
6. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В. 1994. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон //Микробиология. Т. 63. Вып.5. С. 917-923.
7. Kawabata Y. // Pat. EP. 1997. № 780166.
8. Kato C., Inoue A., Horikoshi K. // Trends Biotechnol. 1996. V. 14. № 1. P. 6-12.
9. Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Ильинский В.В., Кузьмин Ю.И. 1997. // Прикладная биохимия и микробиология. Т.33. №2. С. 198-201
10. Moller J., Winter P., Lung B., Kirkebjerg L. 1996. // J. Ind. Microbiol.. V. 16. №2. P. 110-118.
11. Орлов Д.Г., Малинина М.С., Мотузува Г.В. 1991. //Химическое загрязнение почв и их охрана. М.: Агропромиздат, С. 303.
12. Оборин А.А., Калачникова И.Г., Масливец Т.А., Базенкова И.Н., Плещева О.В., Оглоблина А.И. 1988. // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, С. 140-159.
13. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. 1990. Киев: Наук. Думка, С. 152-185.

14. Siciliano S. D., Germida J.J. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria.1998. // Environ. Rev. V.6. P. 65-79.
15. Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // Microbiol.Rev. V.59. №2. P. 201-222.
16. Фомченков В.М., Холоденко В.П., Ирхина И.А., Петрунина Т.А. 1998. //Микробиология, Т. 67, № 3, С. 333-337.