



находится на высоте 5 м, ориентирован на юг. В момент обнаружения дятлы насиживали кладку, сменяясь через каждый час. Выкармливание птенцов наблюдалось 30.05.2011. Если наблюдатель находился рядом, птицы вели себя очень осторожно и не подлетали к дуплу. Следует отметить, что птицы использовали для гнездования старое дупло, в котором в 2010 г. выводил птенцов большой пестрый дятел. Вторая пара сирийских дятлов была отмечена во второй половине апреля 2011 г. в лесопарке г. Энгельса Саратовской области на левом берегу р. Волги (51°29'27.7" с.ш., 46°04'04.7" в.д.). Наблюдалось спаривание особей, что позволяет предположить в исследованном пойменном осокорнике наличие гнездового дупла, которого, однако, найти не удалось.

Таким образом, приведенные факты подтверждают гнездование сирийского дятла в Саратовской области. Птица в значительной степени приурочена к антропогенному ландшафту и к лесным массивам с высокой антропогенной нагрузкой.

УДК 579.6:631.46:504

ИНТРОДУКЦИЯ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАГРЯЗНЁННУЮ ПОЧВУ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Е. В. Плешакова

Саратовский государственный университет
E-mail: biofac@sgu.ru

В обзорной статье суммированы сведения о микроорганизмах-деструкторах нефтяных углеводородов, биопрепаратах, используемых для ремедиации нефтезагрязнённых почв. Рассмотрены спорные вопросы, связанные с применением технологии биоаугментации, обобщены результаты многочисленных исследований, доказывающих целесообразность интродукции в загрязнённую почву селекционированных нефтеокисляющих микроорганизмов. **Ключевые слова:** нефтезагрязнённая почва, биоремедиация, биоаугментация, нефтеокисляющие микроорганизмы.

Introduction of Oil-Oxidizing Microorganisms into Contaminated Soil: the Problems and Perspectives

E. V. Pleshakova

The facts on microorganisms-destroyers of petroleum hydrocarbons, the biopreparates used for remediation of oil-contaminated soils are summarised in a review. The debatable questions connected with application of bioaugmentation technology are considered, results of the numerous researches proving expediency of introduction of selected oil-oxidizing microorganisms into contaminated soil are generalised. **Key words:** oil-contaminated soil, bioremediation, bioaugmentation, oil-oxidizing microorganisms.

Нефть является основой современной промышленности и цивилизации. Повсеместное

Список литературы

1. Кукиш А. И., Музаев В. М. Сирийский дятел – новый гнездящийся в Калмыкии вид // Актуальные проблемы изучения и охраны птиц Восточной Европы и Северной Азии : материалы междунар. конф. (XI Орнитол. конф.). Казань, 2001. С. 341–342.
2. Завьялов Е. В., Альберти Л. Г. Сирийский дятел *Dendrocopos syriacus* в Волгоградской области // Русский орнитол. журн. 1996. Экспресс-вып. № 1. С. 3–4.
3. Иванчев В. П., Назаров И. П. О некоторых авифаунистических находках в 2002 году в Окском заповеднике и Рязанской области // Тр. Окского заповедника. 2003. Вып. 22. С. 675–678.
4. Архипов В. Ю., Хедберг Т. Встреча сирийского дятла *Dendrocopos syriacus* в Поленово (Тульская область) // Русский орнитол. журн. 2004. Т. 13, экспресс-вып. № 268. С. 701–702.
5. Барышников Н. Д. Сирийский дятел – новый гнездящийся вид Воронежской области // Орнитология. 2001. № 29. С. 282.
6. Птицы севера Нижнего Поволжья: в 5 кн. Кн. III. Состав орнитофауны / Е. В. Завьялов, Г. В. Шляхтин, В. Г. Табачишин, Н. Н. Якушев, Е. Ю. Мосолова, К. В. Угольников. Саратов, 2007. 328 с.



использование нефти и нефтепродуктов наносит серьёзный ущерб окружающей среде [1, 2]. При добыче, транспортировке, переработке и использовании нефти и нефтепродуктов теряется около 50 млн т в год [3], что составляет около 2% годовой добычи, причём из них 22 млн т теряется на суше. На территории России в настоящее время эксплуатируется более 200 тыс. км магистральных и 350 тыс. км промысловых нефтепроводов, из-за аварий ежегодно разливается 15–20 млн т нефти [4].

Экологический ущерб от загрязнения почв углеводородами весьма велик – от снижения качества и продуктивности почв до вывода земель из сельскохозяйственного оборота. Создаётся опасность загрязнения подземных и поверхностных вод в результате попадания нефтепродуктов в водоносные горизонты, реки и водоёмы [5]. Аварийные разливы нефти зачастую приводят к формированию техногенных пустынь, процесс самовосстановления которых, по мнению большинства исследователей, длится 10–25 лет [6, 7]. Поскольку на современном уровне развития нефтяной промышленности не представляется



возможным исключить её негативное воздействие на окружающую среду, возникает необходимость разработки методов и технологий восстановления почв, загрязнённых нефтью. В связи с разнообразием почвенно-климатических условий, физико-химических свойств добываемой нефти и стоимости мероприятий по рекультивации проблема поиска оптимальных и адаптированных к конкретным условиям методов остаётся весьма актуальной. Главный принцип, которым следует руководствоваться при проведении рекультивационных мероприятий, не нанести экосистеме больший вред, чем уже нанесён при загрязнении.

В настоящее время в мировой практике используют два основных приёма микробной ремедиации нефтезагрязнённой почвы. Приём биостимуляции основан на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов, естественно содержащихся в загрязнённой почве или воде и потенциально способных утилизировать загрязнитель, но не способных делать этого эффективно из-за отсутствия полного набора пищевых элементов (недостаток соединений азота, фосфора, калия и др.) [8, 9]. Технология биоаугментации (от английского слова *bioaugmentation* – «биоулучшение»): в этом случае в загрязнённую почву вносят относительно большие количества специализированных микроорганизмов, которые заранее были выделены из различных загрязнённых источников и/или специально генетически модифицированы [10, 11].

Анализ литературных данных (научные статьи, патенты, коммерческие предложения) свидетельствует о том, что интродукция специализированных штаммов-деструкторов нефтяных углеводородов в настоящее время широко рекламируется и нередко используется как в России, так и других странах. В то же время с использованием приёма биоаугментации связано много спорных моментов.

Известно немало бактерий-деструкторов нефтепродуктов, которые в настоящее время предлагаются к использованию для очистки почв от нефтяного загрязнения. Их спектр включает в себя бактерии родов *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, дрожжи рода *Candida*, микромицеты *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Penicillium* и др. [12]. На основе микроорганизмов-деструкторов созданы и создаются биопрепараты, предназначенные для очистки почв и воды от нефтяных загрязнений. Подбор бактерий-деструкторов, как правило, основывается на их способности к интенсивному росту на питательных средах с инди-

видуальными углеводородами или сырой нефтью в качестве единственного источника углерода. Известны биопрепараты, созданные на основе бактериальных монокультур или состоящие из нескольких штаммов. Причём последние могут состоять как из модельных сочетаний селекционированных штаммов, так и из консорциумов микроорганизмов, целиком изолированных из природных источников. Здесь у учёных возникают первые разногласия. По мнению исследователей, использование отдельных культур и смешанных ассоциаций микробных культур-деструкторов углеводородов нефти, которые создаются объединением штаммов с известными способностями к деструкции, имеет свои недостатки [13]. Сторонники использования ассоциаций считают, что любой бактериальный штамм разрушает ограниченное число компонентов нефти, и для достижения полной и эффективной биодеградации нефти необходимо использование консорциума со многими штаммами [14]. Деструкторы *n*-алканов, известные из литературных данных, обычно не затрагивают ароматические кольца, а деструкторы ПАУ не разрушают *n*-алканы. Известно несколько штаммов, способных к деградации как высокомолекулярных ПАУ, так и *n*-алканов [15], однако это редкое сочетание деструктивных свойств. Деструкторы ароматических соединений используют либо моноароматические углеводороды или углеводороды с двумя, тремя кольцами или углеводороды с тремя, четырьмя кольцами. Кроме того, немного известно о бактериях, усваивающих алкилированные ПАУ с тремя или большим числом колец, очень распространённых в нефтях [16, 17].

Другие исследователи указывают на то, что в процессе деградации смеси углеводородов селекционированными микроорганизмами в результате кометаболизма может накопиться много неизвестных промежуточных персистентных и токсичных соединений [18].

Тем не менее, активность биопрепаратов на основе монокультур, согласно описываемым результатам, не уступает активности микробных консорциумов. Например, препарат «Родотрин» (*Rhodococcus erythropolis* ВКМ АС-1339Д) осуществляет деструкцию нефтешлама на 91% в верхнем (10 см) и на 87% в нижнем (20 см) слое за 12 мес. [19]; «Псевдомин» (*Pseudomonas putida* 91–96) способствует разложению нефти при концентрации её в торфе 19.7% на 75.6% за 3 мес. [20]; «Биоприн» или «Олеоворин» (*Acinetobacter oleovorans* (штаммы ВСБ-712 или ВСБ-568)) способен разрушать нефть до 20 г/кг за 1 мес. [21]. Биопрепарат «Родер» (R-диссоцианты двух штаммов (*Rhodococcus ruber* ВКМ АС-1513Д и *Rhodococcus erythropolis* ВКМ АС-1514Д) осуществляет дес-



трукцию нефти в грунте в лабораторных условиях на 81%, в природных условиях на 65% за один сезон [22]; использование препарата «Биосэт» (три вида аэробных микроорганизмов *Micrococcus varians* и два – рода *Arthrobacter*) при концентрации нефтепродуктов в почве 0.6% приводит к их деструкции на 77% за 4 мес. [23]; биопрепарат «Деворойл» (*Rhodococcus* sp., *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida* sp.) при концентрации нефти в почве 60, 120 и 180 м³/га способствует её деструкции на 81.9; 35.1 и 58.1% за 12 мес. и на 82.4, 50.0 и 72.6% за 17 мес. соответственно [24]; микробиологический препарат «СОВЕ-10» на основе 6 бактериальных штаммов, идентифицированных как *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Providencia* sp. и *Citrobacter* sp., способствует удалению углеводородов дизельного топлива в почве на 91% за 8 недель по сравнению с 44%-ной убылью в контрольном участке почвы [25].

О. Н. Логинов с соавторами [26] сравнил эффективность различных биопрепаратов и установил, что биопрепараты «Деворойл» и «Ленойл», содержащие ассоциации микроорганизмов, способны адаптироваться к высоким дозам нефти и эффективно утилизировать субстрат независимо от типа почв и особенностей загрязнителя. Биопрепараты-монокультуры «Бациспектин» и «Дестройл», делают выводы учёные, целесообразнее использовать при концентрациях поллютантов не более 10%. Другие учёные [27] показали, что отдельные штаммы-деструкторы нефтепродуктов (бактериальные и грибные) лучше деградировали нефть, чем их ассоциации.

Значительные дискуссии об эффективности биоаугментации были связаны с необходимостью добавления в почву лиофилизированных штаммов или жидких культур, аборигенных или экзогенных микроорганизмов для ускорения процесса ремедиации почв [28].

Остро стоит вопрос о целесообразности использования технологии биоаугментации. Каждому из существующих в настоящее время препаратов на основе микроорганизмов-деструкторов присущи определённые достоинства, бактерии способны утилизировать нефть и нефтепродукты в почве, в пресной и морской воде, в диапазоне pH и температуры окружающей среды. Разрабатывая всё новые биопрепараты, исследователи идут по пути отбора уникальных свойств, присущих определённым микроорганизмам-деструкторам углеводородов нефти.

Накопленный опыт по применению технологий свидетельствует, что существуют ситуации, в которых биоаугментация является целесообразным, а подчас и единственным вариантом очистки.

1. Концентрация загрязнителя в почве или относительно высока (аборигенная микрофлора не справляется с количеством загрязнителя), или низка (аборигенная микрофлора не справляется с качеством загрязнителя) [29]. Биопрепарат «Нафтокс», как показали исследователи [20], отличается способностью к деструкции нефти при высоком (до 584 г/кг) уровне загрязнения, что связано с физиологическими и биохимическими особенностями составляющих его микроорганизмов.

2. Загрязнитель – устойчивое соединение, которое плохо поддаётся разложению естественной микрофлорой, даже в том случае, если для неё созданы оптимальные условия роста. Например, нефтешламы, компоненты которых, как известно [30], обладают канцерогенным и иммунотоксическим действием. Плотность популяции и метаболическая активность природных углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в нефтешламах в большинстве случаев крайне низкие, поэтому здесь очевидно использование биоаугментации. Авторы описывали рекультивацию нефтешламовых амбаров различных сроков загрязнения (уровень загрязнения от 79 до 20 г нефти на кг почвы) с использованием бактериального препарата «Нафтокс». Отмечается при этом, что эффективность применения технологии составила от 65 до 99% к абсолютному значению, а содержание загрязнителей снизилось до 2–0.5 г/кг [31]. Учёные [32] производили оценку добавления бактериального консорциума для стимуляции биоремедиации загрязнённой нефтешламами почвы, в которой численность аборигенных УОМ была невысокой (10^3 – 10^4 кл/г почвы). Обработка участков консорциумом в сочетании с питательными добавками привела к удалению углеводородов нефти на 89.7–92.0% за 1 год. Контрольный участок заметно отличался степенью разложения углеводородов, в котором она составляла всего 14%. Сравнивая эффективность использования различных методов очистки нефтешламов, авторы [33] отмечают, что биоаугментация на основе бактериального препарата способствовала убыли общих углеводородов нефти на 45–53%, биостимуляция естественного сообщества – на 13–23% и биокомпостирование – на 31%.

Большое внимание уделяют учёные микроорганизмам-деструкторам углеводородов, которые обладают способностью продуцировать биосурфактанты, вещества, эмульгирующие нефть и нефтепродукты и увеличивающие биодоступность загрязнителей [34]. Интродукция таких штаммов в нефтезагрязнённую почву может значительно повысить эффективность биоремедиации [35, 36].



3. Физико-химические характеристики места загрязнения делают невозможным рост и функционирование естественной микрофлоры. В качестве примера можно привести экстремальные значения рН, например, существует немало загрязнённых почв с повышенной кислотностью, которая обусловлена естественными или антропогенными факторами. Образование таких загрязнённых участков происходит в металлообрабатывающей и угольной промышленности. Из таких мест целесообразно выделить ацидофильные микроорганизмы, способные к деструкции нефтяных углеводородов, и впоследствии использовать их в биоаугментации [37]. Или влияние температурных условий. В северных районах, например, где тёплый сезон непродолжителен, активизация местной микрофлоры ограничена во времени. В настоящее время известно немало психрофильных штаммов-нефтедеструкторов, преимущественно это родококки, которые составляют основу биопрепаратов для очистки от нефтяных загрязнений [38]. Показано [39], что консорциум микроорганизмов, состоящий из культур *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp. и *Arthrobacter* sp., при внесении в нефтезагрязнённую почву интенсивно активизирует жизнедеятельность аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры и процессы окисления нефтепродуктов в почвах различных климатических зон Ханты-Мансийского автономного округа. Есть и другие микроорганизмы, например, авторы [40] сообщали об изучении аборигенных психроактивных УОМ рода *Cytophaga*, выделенных из нефтезагрязнённых почв Республики Коми. Среди психротолерантных штаммов-нефтедеструкторов, выделенных из различных районов Сибири, авторы [41] описывают микроорганизмы рода *Arthrobacter*, *Bacillus*, дрожжи рода *Yarrowia*.

4. Загрязнитель попал в почву в результате недавнего разлива органических соединений. Естественной микрофлоре необходимо время для адаптации к ксенобиоту. Авторами сообщалось [42] о значительной деградаци нефтяных углеводородов в почве, свежезагрязнённой дизельным топливом: на 72.7% лёгкой ($C_{12}-C_{23}$) и на 75.2% тяжёлой ($C_{23}-C_{40}$) фракции при использовании приёма биоаугментации. Причём, как отмечали исследователи, природное самоочищение и биостимуляция значительно уступали по эффективности интродукции селекционированных микроорганизмов, ранее выделенных из окружающей среды.

5. Есть реальная возможность ускорить время биоремедиации и/или улучшить её качество, т.е. достигнуть более низких значений остаточной концентрации загрязнителя. Учёные предлагают для этого разные способы усовершенствования

технологии биоаугментации. Например, Тен Хак Мун с соавторами [43] рекомендует для очистки почвы от нефтепродуктов использовать жидкую культуру фотосинтезирующих бактерий, которые обладают азотфиксирующей способностью в симбиозе с органотрофными микроорганизмами и в качестве донора водорода используют низкомолекулярные органические соединения, в том числе жирные кислоты. В почве, загрязнённой нефтью, в процессе деструкции органических веществ в большом количестве потребляется кислород и ингибируется деятельность УОМ, что авторы связывают с накоплением масляной кислоты, образующейся в анаэробных условиях. Обработка почвы жидкой культурой фотосинтезирующих бактерий способствует деградаци нефтепродуктов, что связано с потреблением масляной и других органических кислот этими бактериями и созданием благоприятных условий для активной деятельности УОМ. Другие исследователи [44] сообщают о перспективном подходе для биоремедиации нефтезагрязнённой почвы – внесении факультативно анаэробных микроорганизмов, способных использовать в качестве терминального акцептора электронов и кислород, и нитрат-ионы – денитрифицирующего нефтеокисляющего сообщества. Степень разложения углеводородов нефти в вариантах биоремедиации за первые 2 месяца увеличилась в ряду: самоочищение (40%) < внесение нитрата (42%) < интродукция денитрифицирующего нефтеокисляющего сообщества (50%) < интродукция денитрифицирующего нефтеокисляющего сообщества + внесение нитрата (60%). Авторами [45] показано, что бактерии рода *Azotobacter* способны усваивать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и энергии и фиксировать азот при их использовании, а также стимулировать рост других УОМ. При интродукции в нефтезагрязнённые почвы бактерии рода *Azotobacter* ускоряли деструкцию нефти и восстанавливали биологическую активность почвы, что позволило учёным рекомендовать эти бактерии для повышения эффективности биоремедиации нефтезагрязнённых почв. Применяют также комплекс биодеструкторов, например, сочетание микробиологического препарата и дождевых червей, которое, как было показано [46], способствует более эффективной элиминации нефти из загрязнённых почв, чем названные биодеструкторы по отдельности. Было установлено, что присутствие азотфиксирующих фотогетеротрофных пурпурных бактерий компенсирует недостаток азота в среде, оказывает положительное влияние на окисление углеводородов аэробными гетеротрофными бактериями *Dietzia maris* [47].



Многими учёными показано, что иммобилизация бактерий, предназначенных для биоремедиации нефтезагрязнённых почв, на различных носителях – торфе, опилках, вермикулите и др. – способствует повышению жизнеспособности и активности этих бактерий, улучшая качество очистки [48]. Работы в этом направлении продолжаются, так, С. О. Obuekwe и Е. М. Al-Muttawa [49] показали, что иммобилизация УОМ на носителях способствовала стабильному образованию у них экзополисахаридов и стабильной деградации углеводов. В работе Г. А. Коваленко с соавторами [50] исследованы адсорбционные свойства макроструктурированных углеродсодержащих керамических носителей по отношению к нерастущим клеткам дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и растущим клеткам актинобактерий *Rhodococcus ruber*. Показано, что носители со слоем каталитического волокнистого углерода обладают оптимальной морфологией поверхности, обеспечивая прочное связывание микробных клеток с носителем, а также полное сохранение ферментативной (инвертазной и оксигеназной) активности микроорганизмов и максимальную стабилизацию полученных биокатализаторов. запатентован способ восстановления загрязнённых почв с использованием комбинированного биосорбента – химически модифицированной плодовой оболочки семян подсолнечника с иммобилизованными на ней нефтеокисляющими микроорганизмами препарата «Деворойл» [51].

К факторам, ограничивающим эффективность природного самоочищения почвы, М. Romantschuk с соавторами [52] относит недостаточную биодоступность нефтяного загрязнителя, которая может быть связана с его пространственным распределением относительно организмов-деструкторов или обусловлена его низкой растворимостью. Также авторы отмечают, что почва может не обладать биодegradационным потенциалом, если в ней отсутствуют биологические пути деградации ксенобиотиков или необходимые катаболические гены не индуцируются загрязнителями. Для решения этих проблем учёные обсуждают применение различных подходов, в том числе биоаугментацию.

Тем не менее при использовании технологии биоаугментации существует много противоречивых моментов. Ряд учёных оценивает возможность использования микроорганизмов в технологии биоаугментации только в лабораторных условиях, высказывая на основании проведённых исследований идеи о перспективности применения бактерий на реальных природных объектах. Тогда как бактерии, проявившие себя в лаборатории, не всегда эффективны в полевых условиях. Так, учёные

[53] показали, что из четырёх селекционированных ими природных нефтеокисляющих штаммов (*Nocardia nova* М4, *Nocardia nova* М29, *Pandoraea* sp. М31 и *Rhodotorula glutinis* М36) внесение только двух штаммов М29 и М36 стимулировало процессы биодegradации углеводов нефти в загрязнённой почве, добавление же двух других штаммов М4 и М31 ингибировало биодegradацию. В то же время отмечалось сходство между результатами, особенно в отношении микробного разнообразия и активности микроорганизмов, полученными в лабораторных и полевых условиях при биоремедиации почв, загрязнённых дизельным топливом [54]. Высказывается мнение, что приёмы ремедиации, апробированные в лабораторных исследованиях, могут использоваться на загрязнённых природных объектах для улучшения биоремедиации.

Эффективность от внесения биопрепаратов, по данным литературы, нередко очень высока, что вызывает некоторые сомнения, особенно показатели деструкции углеводов в почве, приближающиеся к 90 и 100%. К тому же, в большинстве случаев отсутствуют сравнительные данные с эффективностью способа стимуляции естественного микробного сообщества почвы. Тогда как эффект от внесения биопрепаратов, как утверждает [55], может оказаться незначительным в сравнении с добавлением в загрязнённую почву структуратора или питательных веществ. Ряд исследователей указывает на высокую эффективность биодegradации нефтепродуктов при стимуляции аборигенной микробной популяции, отмечая при этом низкие затраты и экологичность данного способа очистки по сравнению с биоаугментацией.

Есть мнение, что при 5%-ном уровне загрязнения почвы нефтью стимулирующие приёмы (введение минерального питания и т.д.) активизируют рост аборигенной микрофлоры и приводят к глубоким окислительным процессам, затрагивая весь спектр насыщенных углеводов нефти [56]. При увеличении концентрации загрязняющей нефти в почве до 10% рост микрофлоры угнетается, и технология биоремедиации почвы должна включать введение биопрепаратов, содержащих активную биомассу и питательный субстрат. Так, препарат МУС-1 на основе 5-ти видов аборигенных алканотрофов, позволил осуществить процесс очищения почвы до значений, пригодных для развития трав, за 2–3 года.

Учитывая, что деструкция нефти в окружающей среде – многофакторный процесс, следует принимать во внимание, что на этот процесс при интродукции штаммов-деструкторов в загрязнённые объекты оказывают влияние многочисленные



факторы. Штаммы УОМ, входящие в состав препаратов, при внесении на нефтезагрязнённые участки не всегда выдерживают конкуренцию с естественной микрофлорой, которая может быстро подавлять искусственно интродуцируемые штаммы, и интенсивность биодеструкции оказывается ниже ожидаемой. К возможным причинам быстрого снижения популяционного уровня интродуцентов относятся как биотические (хищничество со стороны *protozoa*, конкуренция с другими почвенными микроорганизмами), так и абиотические факторы (наличие минеральных веществ, органического углерода, влажность, рН, температура, токсичные вещества). Veep с соавторами [57] предположил также, что содержание субстратов настолько снижается с течением времени, что микроорганизмы оказываются в состоянии только поддерживать свой метаболизм, но не способны расти и размножаться. Конкуренциоспособность интродуцируемых бактерий в условиях естественного почвенного микробсообщества требует изучения, а сведений по этому вопросу недостаточно.

Правильный подбор инокуляционной дозы штамма-интродуцента – необходимое условие, которое может повлиять на развитие взаимоотношений между интродуцентом и аборигенным сообществом. Так, при интродукции в нефтезагрязнённую (1 и 3%) почву штаммов *Mycobacterium flavescens* EX-91 и *Pseudomonas aeruginosa* Вп уровень внесения бактерий был 10^5 – 10^9 кл/г почвы [58]. При дозе инокулята 10^9 кл/г титр культуры *M. flavescens* к 20-м сут падал до уровня 10^7 кл/г и сохранялся на этом уровне до конца эксперимента. При дозе инокулята 10^7 кл/г численность штамма в течение 3 недель увеличивалась на порядок, а затем в течение месяца снижалась до внесённого уровня. При уровне внесения бактерий 10^5 кл/г численность клеток штамма не увеличивалась. При внесении *P. aeruginosa* в концентрации 10^9 кл/г наблюдалось быстрое падение численности популяции на два порядка и стабилизация численности на этом уровне. При внесении инокулята 10^7 кл/г почвы наблюдали результаты, аналогичные для штамма *M. flavescens*. Если вносили штамм *P. aeruginosa* в концентрации 10^5 кл/г, то сначала отмечался резкий подъём его численности на два порядка к 5-му дню, и далее – сохранение такого уровня до конца эксперимента. На основании полученных данных был сделан вывод об оптимальной концентрации инокулята для интродукции данных нефтеокисляющих штаммов 10^7 кл/г. Различный характер колебаний численности двух штаммов объяснялся тем, что эти штаммы относятся к *k*- (медленнорастущий *M. flavescens*) и *r*-стратегам (быстрорастущий

P. aeruginosa) [58]. При подборе оптимальной инокуляционной дозы микроорганизмов-деструкторов углеводов: *Candida lipolytica* и *Cladosporium resinae* в почве было показано, что конкурентоспособность дрожжеподобного гриба *C. lipolytica* по отношению к аборигенным микроорганизмам оказалась довольно низкой (доминирование в сообществе лишь при дозе внесения 10^8 кл/г почвы), тогда как мицелиальные грибы *C. resinae* замещали аборигенные формы уже при дозе 10^5 кл/г [59]. Авторы делают вывод, что для обработки одной и той же площади загрязнённой поверхности потребуется на несколько порядков больше биомассы *C. lipolytica*, чем *C. resinae*. В то же время при массовых разливах применение дрожжей позволит сократить время рекультивации. В связи с тем, что главный эффект применения микроорганизмов-деструкторов, по мнению А.М. Семенова с соавторами, сводится к сокращению лаг-периода, в каждом конкретном случае следует принимать своё решение – какой культурой и какой инокуляционной дозой следует воспользоваться для достижения планируемого эффекта ликвидации загрязнения.

При подборе дозы внесения микроорганизмов установлено, что оптимальной инокуляционной дозой для микроорганизмов *Nocardia nova* M29 и *Rhodotorula glutinis* var. *dairenesis* M36 явилась доза 10^8 кл/г почвы [53]. Наилучший эффект на микробную деградацию оказывает и соотношение С : N : P в почве, равное 100 : 1.25 : 1, тогда как С : N = 100 : 10 и 100 : 5 и С : P = 100 : 5 ингибирует биодegradацию. При введении азотистого минерального питания (1%-ный раствор композиции, содержащий карбамид и аммиачную селитру) в образцы почвы с 5%-ным уровнем загрязнения увеличивается численность микробных клеток на 3 порядка, снижается концентрация углеводов нефти на 80–90% [60]. Степень деструкции углеводов остаточной нефти составляет 0.08%, что указывает на глубину окислительных процессов.

Большое значение для жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов имеют и качественный состав нефтяного сырья, попавшего в почву, и время, прошедшее с момента загрязнения. Различные фракции нефтепродуктов, их сочетания по-разному влияют на микроорганизмы, в том числе и на внесённые с биопрепаратами. Это вызвано возможностью использования различных углеводов как источника энергии у данных микроорганизмов и определяется их физиолого-биохимическими особенностями, способностью разрушать тяжёлые или лёгкие фракции углеводородного сырья. Отсюда следует, что применение каждого биопрепарата, имеющего



в своем составе активные формы микроорганизмов, требует создания оригинальной технологии и строгого её выполнения в процессе использования препарата. Для каждой почвенно-климатической зоны технология должна корректироваться [20].

Один из способов биоаугментации – внесение бактерий со специфическими свойствами [12]. Другой подход к биоаугментации – инокуляция загрязнённого местообитания микроорганизмами, несущими трансмиссивные плазмиды биодеградации [61]. Эти плазмиды могут быть переданы аборигенным микроорганизмам, которые обладают характеристиками, необходимыми для роста и выживания в данной почве. Необходимый штамм или группы генов могут быть сконструированы с использованием методов генной инженерии [52].

Бактериальные штаммы, рекомендуемые для биоремедиации объектов окружающей среды, должны быть исследованы на степень их опасности для животных и человека. Несмотря на то что применяемые биопрепараты имеют различного рода разрешительные документы, многие из микроорганизмов, входящих в основу различных биопрепаратов, являются патогенами различных уровней приоритетности и могут быть отнесены к условно-патогенным микроорганизмам [62]. При применении биодеструкторов начальная концентрация микроорганизмов в воде или почве достигает 10^5 – 10^8 кл/мл(г). Дальнейший микробиологический контроль после применения деструкторов не всегда производится. В то же время известно об интенсивном развитии некоторых групп микроорганизмов: микобактерий, коринебактерий, псевдомонад, дрожжеподобных грибов рода *Candida*, при загрязнении углеводородами нефти природных объектов. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (входят в состав препаратов «Деворойл», «Simbinal» и некоторых других) являются этиологическим фактором в развитии синуситов, отитов, заболеваний кожи, уроинфекций, они могут вызывать тяжело протекающие септические процессы, фолликулиты, эндокардиты и др. Кроме того, этим бактериям свойственна высокая антибиотикорезистентность и стойкость к дезинфектантам. Относительно бактерий *Pseudomonas putida* (входят в состав биопрепаратов «Путидойл», «Псевдомин» и «Simbinal») показано, что, попав в стерильные полости и ликворное пространство, они также могут вызывать заболевания. Таким образом, очевидно, что при создании новых препаратов отбор микроорганизмов должен осуществляться по принципу отсутствия у них токсичности, патогенности (инвазивности, вирулентности и токсигенности), фитопатогенности, потенциальной генотоксичности. При применении нескольких

микроорганизмов эти показатели должны определяться не только для отдельных штаммов, но и в целом для ассоциации.

Наконец, эффективность биотехнологии интродукции напрямую зависит от способности интродуцентов к длительному выживанию в изменяющихся условиях окружающей среды. Изучение жизнеспособности внесённых штаммов сопряжено с методическими трудностями, с чем связан недостаток знаний в этой области. Для слежения за интродуцированными бактериями в процессе биоремедиации загрязнённых почв требуются высокоспецифичные и чувствительные мониторинговые методы. Традиционными методами культивирования трудно отличить интродуцент от местной микрофлоры. Кроме того, известно, что штаммы, выращенные в лабораторных условиях, при введении в окружающую среду часто испытывают стресс и больше не культивируются на агаровой среде. Последние достижения в молекулярных методах слежения за бактериями в окружающей среде, например, методы, основанные на анализе специфических последовательностей ДНК или ПЦР-амплификация [63, 64], могут использоваться для мониторинга бактерий при биоремедиации. Поведение интродуцированных штаммов *Pseudomonas putida* GJ31, *Pseudomonas aeruginosa* RHO1 и *Pseudomonas putida* F1DCC, являющихся деструкторами хлорбензолов, в составе микрочесов с грунтовой водой D. F. Wenderoth с соавторами [65] оценивал флуоресцентной гибридизацией с видоспецифичными олигонуклеотидами. Мониторинг штаммов родококков, интродуцированных в почву, осуществляли методом геномных фингерпринтов на основе RAPD-анализа с высокоспецифичными праймерами [66].

Альтернативным молекулярным инструментом является использование биомаркеров в качестве специфических меток для идентификации бактерий в природе. Гены *luc* и *gfp* применялись для мечения различных бактерий, используемых для биоремедиации газаolina или хлорфенолов в почве. По мнению С. J. Cunningham и J. C. Philp [68], строгие законы, регулирующие использование генетически модифицированных организмов, будут ограничивать применение биомаркерных генов в обозримом будущем. В связи с этим в настоящее время продолжается разработка новых, более эффективных, простых мониторинговых технологий [69].

Представленные данные свидетельствуют о несомненной актуальности исследований, связанных с загрязнением почвы нефтяными углеводородами и разработкой технологий очистки загрязнённых почв.



Деструкция нефти в окружающей среде – сложный многофакторный процесс, на который оказывают влияние состав, концентрация и срок действия загрязнителя, тип почвы, многообразие и изменчивость внешних факторов, под воздействием которых находится экосистема. Это объясняет появление большого количества разнообразных (иногда противоречивых) результатов при ремедиации почвы биологическими методами.

В данной области остаётся много спорных вопросов. Например, вопросы целесообразности использования и преимуществ технологий биостимуляции и биоаугментации. По проблемам биоаугментации у исследователей существуют разногласия: использование монокультур или ассоциаций бактерий; выбор биопрепарата для очистки; добавление в почву лиофилизированных штаммов или жидких культур, аборигенных или экзогенных микроорганизмов; правильный подбор инокуляционной дозы штамма-интродукта и т.п.

Изучение жизнеспособности внесённых в загрязнённую почву бактерий-деструкторов сопряжено с методическими трудностями, с чем связан недостаток знаний в этой области. Для слежения за интродуцированными микроорганизмами в процессе биоремедиации загрязнённых почв необходимы высокоспецифичные и чувствительные мониторинговые методы.

Требуется дальнейшее изучение экологии микроорганизмов-деструкторов, механизмов функционирования микробных сообществ нефтезагрязнённых почв и выявление ключевых биологических факторов, определяющих эффективность биоремедиации. Эти знания создадут основу для разработки и улучшения способов микробиологической очистки.

Список литературы

1. Почвы мегаполисов, их экологическая оценка, использование и создание (на примере г. Москвы) / В. И. Савич, Ю. В. Федорин, Е. Г. Химица и др. М., 2007. 660 с.
2. Eurosoil 2008: soil – society – environment / Eds. W. H. Blum, M. H. Gerzabek, M. Vodrazka. Vienna, 2008. 400 p.
3. Садовникова Л. К., Орлов Д. С., Лозановская И. Н. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении. М., 2006. 335 с.
4. Арзамасцев А. П. Основы экологии и охрана природы. М., 2008. 416 с.
5. 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.
6. Габбасова И. М., Хазиев Ф. Х., Сулейманов Р. Р. Оценка состояния почв с давними сроками загрязнения сырой нефтью после биологической рекультивации // Почвоведение. 2002. № 10. С. 1259–1273.
7. Radwan S. Microbiology of oil-contaminated desert soils and coastal areas in the Arabian Gulf Region // Soil biology. Microbiology of extreme soils / Eds. P. Dion, C. S. Nautiyal. Berlin, 2008. P. 275–298.
8. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32, № 6. С. 579–586.
9. Röling W. F. M., Milner M. G., Jones D. M., Fratepietro F., Swannell R. P. J., Daniel F., Head I. M. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil // Appl. and Environ. Microbiol. 2004. Vol. 70, №5. P. 2603–2613.
10. Aldrett S., Bonner J. S., McDonald T. J., Mills M. A., Autenrieth R. L. Degradation of crude oil enhanced by commercial microbial cultures // Proc. Intern. oil spill conf. Amer. Petrol. Inst. 1997. P. 995–996.
11. Янкевич М. И. Формирование ремедиационных биоценозов для снижения антропогенной нагрузки на водные и почвенные экосистемы : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2002. 50 с.
12. Wilkinson S., Nicklin S., Faul J. L. Biodegradation of fuel oils and lubricants: soil and water bioremediation options // Biontransformations: Bioremediation technology for health and environmental protection / Eds. V. P. Singh, R. D. Stapleton. Elsevier Science, 2002. P. 69–100.
13. Vinas M., Grifoll M., Sabate J., Solanas A. M. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities // J. Industrial Microbiol. and Biotechnol. 2002. Vol. 28. P. 252–260.
14. Leahy J. G., Colwell R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol. Rev. 1990. Vol. 54. P. 305–315.
15. 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.
16. Allard A.-S., Neilson A. H. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects // Intern. Biodeteriorat. and Biodegradation. 1997. Vol. 39, № 4. P. 253–285.
17. Sabate J., Grifoll M., Vinas M., Solanas A. M. Isolation and characterization of a 2-methylphenantrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. P. 704–712.
18. Casellas M., Grifoll M., Sabate J., Solanas A. M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorine by a consortium // Can. J. Microbiol. 1998. Vol. 44. P. 734–742.
19. Ягафарова Г. Г., Скворцова И. Н. Новый нефтеокисляющий штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32, № 2. С. 224–227.
20. Алехин В. Г., Фахрутдинов А. И., Малышкина Л. А., Ситников А. В., Емцев В. Т., Хотянович А. В. Сравни-



- тельная эффективность деструкции нефтепродуктов различными биопрепаратами при разных уровнях загрязнения торфогрунтов // Биологические ресурсы и природопользование : сб. науч. тр. Нижневартовск, 1999. Вып. 3. С. 96–106.
21. Щеблыкин И. Н., Бирюков В. В., Стехновская Л. Д., Барбот В. С., Биттеева М. Б., Боев Ю. В., Лобов Ю. А., Разживин А. В. Технология олеоворин – биологический способ обезвреживания нефтезагрязненных осадков поверхностных сточных вод // Новые технологии для очистки нефтезагрязненных вод, почв, переработки и утилизации нефтешламов : тез. докл. Междунар. конф. М., 2001. С. 166–167.
 22. Мурыгина В. П., Калужный С. В. Применение биопрепарата-нефтедеструктора «Родер» в северных регионах России // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды : материалы междунар. конф. Саратов, 2005. С. 82–83.
 23. Пономарева Л. В., Крунчак В. Г., Торгованова В. А., Цветкова Н. П., Осипов А. И. Биоремедиация нефтезагрязненной почвы с использованием биопрепарата «БИОСЭТ» и пероксида кальция // Биотехнология. 1998. № 1. С. 79–84.
 24. Сидоров Д. Г., Борзенков И. А., Ибатуллин Р. Р., Милехина Е. И., Храмов И. Т., Беляев С. С., Иванов М. В. Полевой эксперимент по очистке почвы от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикл. биохим. и микробиол. 1997. Т. 33, № 5. С. 497–502.
 25. Ильина А., Кастилю Санчес М. И., Винареаль Санчес Х. А., Рамирес Эскивель Г., Кандэлас Рамирес Х. Получение препарата на основе бактерий, выделенных из почвы, для биоремедиации нефтяных загрязнений // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2003. Т. 44, № 1. С. 88–91.
 26. Логинов О. Н., Нуртдинова Л. А., Бойко Т. Ф., Четвериков С. П., Силищев Н. Н. Оценка эффективности нового биопрепарата «Ленойл» для ремедиации нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2004. № 1. С. 77–82.
 27. Okerentugba P. O., Ezeronye O. U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria // Afric. J. Biotechnol. 2003. Vol. 2, № 9. P. 288–292.
 28. Vogel T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach // Curr. Opinion in Biotechnol. 1996. Vol. 7. P. 311–316.
 29. Pritchard P. H. Use of inoculation in bioremediation // Curr. Opinion in Biotechnol. 1992. Vol. 3. P. 232–243.
 30. Никитина Е. В., Якушева О. И., Гарусов А. В., Наумова Р. П. Биоремедиация отходов нефтехимического производства с использованием компостирования // Биотехнология. 2006. № 1. С. 53–61.
 31. Фахрутдинов А. И., Алехин В. Г., Малышкина Л. А. Результаты рекультивации нефтезагрязненных территорий с применением бактериального препарата // Наука и образование XXI века : тез. докл. Второй окружной конф. молодых ученых ХМАО. Ч. 1. Сургут, 2001. С. 55–56.
 32. 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.
 33. Ouyang 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.
 34. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina L. B., Dunbar S. A., Christofi N., Lang S., Wray V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 59. P. 318–324.
 35. Banat I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review // Bioresource Technol. 1995. Vol. 51. P. 1–12.
 36. Кузьмина Л. Ю., Актуганов Г. Э. Аэробные спорообразующие бактерии – продуценты биоэмульгаторов для процессов биоремедиации // Вестн. ОГУ. Проблемы экологии Южного Урала : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. Ч. III. 2009. С. 456–458.
 37. Gemmell R. T., Knowles C. J. Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals // FEMS Microbiol. Lett. 2000. Vol. 192. P. 185–190.
 38. Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inness W. E., Greer C. W. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. // Appl. and Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64, № 7. P. 2578–2584.
 39. Ковальчук Л. В., Алехин В. Г., Фахрутдинов А. И. Стимуляция микрофлоры углеводородозагрязненных почв консорциумом нефтеокисляющих микроорганизмов // Биология: Теория, практика, эксперимент : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения д-ра биол. наук, проф. Е. В. Сапожниковой. Саранск, 2008. Кн. 2. С. 213–216.
 40. Хомякова Д. В., Ботвинко И. В., Нетрусов А. И. Выделение психроактивных углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39, № 6. С. 661–664.
 41. Андреева И. С., Емельянова Е. К., Загребельный С. Н., Олькин С. Е., Резникова И. К., Репин В. Е. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. № 1. С. 43–52.
 42. Bento F. M., Camargo F., Okeke B., Frankenberger-Junior W. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil // Brazil. J. Microbiol. 2003. Vol. 34. P. 17–20.
 43. Тен Хак Мун, Кириенко О. А., Имранова Е. Л. Влияние фотосинтезирующих бактерий и компоста на деградацию нефтепродуктов в почве // Прикл. биохим. и микробиол. 2004. Т. 40, № 2. С. 214–219.
 44. Рахимова Э. Р., Оситова А. Л., Зарипова С. К. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием денитрифицирующих углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикл. биохим. и микробиол. 2004. Т. 40, № 6. С. 649–653.



45. Градова Н. Б., Горнова И. Б., Эддауди Р., Салина Р. Н. Использование бактерий *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязнённых почв // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39, № 3. С. 318–321.
46. Стом Д. И., Потанов Д. С., Балаян А. Я., Матвеева О. Н. Трансформация нефти в почве микробиологическим препаратом и дождевыми червями // Почвоведение. 2003. № 3. С. 359–361.
47. Драчук С. В. Фотогетеротрофные пурпурные бактерии в почвах, загрязнённых углеводородами : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Тюмень, 2004. 17 с.
48. Алексеева Т. П., Бурмистрова Т. И., Терещенко Н. Н., Стахина Л. Д., Панова Н. Н. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязнённых почв // Биотехнология. 2000. № 1. С. 58–64.
49. Obuekwe C. O., Al-Muttawa E. M. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation // Biotechnol. Lett. 2001. № 23. P. 1025–1032.
50. Коваленко Г. А., Перминова Л. В., Чуенко Т. В., Ившина И. Б., Кулюкина М. С., Рычкова М. И., Филт Дж. К. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. Иммобилизация нерастущих клеток дрожжей и растущих клеток алканотрофных родококков // Биотехнология. 2006. № 1. С. 76–83.
51. Назарько М. Д., Романова К. Н. Трансферные технологии в биоремедиации нефтезагрязнённых почв // Вестн. ОГУ. Проблемы экологии Южного Урала : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. Ч. III. 2009. С. 469–470.
52. Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahela K. Means to improve the effect of *in situ* bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches // Environ. Pollut. 2000. Vol. 107. P. 179–185.
53. Trindade P. V. O., Sobral L. G., Rizzo A. C. L., Leite S. G. F., Lemos J. L. S., Millioli V. S., Soriano A. U. Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. URL: <http://pec.utulsa.edu/lpec/Conf2002>.
54. Gallego J. L. R., Loredó J., Llamas J. F., Vazquez F., Sanchez J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation // Biodegradation. 2001. Vol. 12. P. 325–335.
55. Jorgensen K. S., Puustinen J., Suortti A.-M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles // Environ. Pollut. 2000. Vol. 107. P. 245–254.
56. Маркарова М. Ю. Использование углеводородокисляющих бактерий для восстановления нефтезагрязнённых земель в условиях Крайнего Севера : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 1999. 26 с.
57. Veen J. A. van, Overbeek L. S. van, Elsas J. D. van. Fate and activity of microorganisms introduced into soil // Microbiol. Molecular Biol. Rev. 1997. Vol. 61. P. 121–135.
58. Ермоленко З. М., Холоденко В. П., Чугунов В. А., Жиркова Н. А., Расулова Г. Е. Биологическая характеристика штамма микобактерий, выделенного из нефти Ухтинского месторождения // Микробиология. 1997. Т. 66, № 5. С. 650–654.
59. Семенов А. М., Куличевская И. С., Халимов Э. М., Гузев В. С., Паников Н. С. Лабораторные тесты для оптимизации интродукции в почву микроорганизмов-деструкторов нефти // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34, № 5. С. 576–582.
60. Сваровская Л. И., Алтунина Л. К. Активность почвенной микрофлоры в условиях нефтяных загрязнений // Биотехнология. 2004. № 3. С. 63–69.
61. Newby D. T., Gentry T. J., Pepper I. L. Soil microbial population dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate-degrading bacterial culture. Bioaugmentation effects on soil microorganisms // Appl. and Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66, № 8. P. 3399–3407.
62. Соловьев В. И., Пушкина В. А., Кожанова Г. А., Гудзенко Т. В. Медицинские аспекты и санитарно-гигиеническая оценка бактериальных препаратов, применяемых для борьбы с нефтяным загрязнением водоемов // Вода и здоровье : сб. науч. ст. Одесса, 2001. С. 195–200.
63. Hamamura N., Olson S. H., Ward D. M., Inskip W. P. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils // Appl. and Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, № 9. P. 6316–6324.
64. Theim S. M., Krumme M. L., Smith R. L., Teidje J. M. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer // Appl. Environ. Microbiol. 1994. Vol. 60. P. 1059–1067.
65. Wenderoth D. F., Rosenbrock P., Abraham W. R., Pieper D. H., Hofle M. G. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater // Microb. Ecol. 2003. № 6. P. 137–148.
66. 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.
67. Jansson J. K., Björklöf K., Elvang A. M., Jørgensen K. S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants // Environ. Pollut. 2000. Vol. 107. P. 217–223.
68. Cunningham C. J., Philp J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil // Contamination & Reclamation. 2000. Vol. 8, № 4. P. 261–269.
69. Иванова Е. С., Есикова Т. З., Гафаров А. Б., Шкидченко А. Н. Мониторинг интродуцированных микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытых системах // Биотехнология. 2006. № 3. С. 74–78.