

6-бөлім  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

---

Раздел 6  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

---

Section 6  
**MICROBIOLOGY**

**Гончарова А.В.<sup>1</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>2</sup>, Туфуминова Я.С.<sup>3</sup>,  
Карелова Д.С.<sup>4</sup>, Калбаева А.М.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>2</sup>доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>3</sup>PhD, научный сотрудник, e-mail: yanatufuminova@gmail.com

<sup>4</sup>стажер-исследователь, e-mail: dasha.karelova310197@gmail.com

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>5</sup>магистр техники и технологии, преподаватель Костанайского государственного университета имени А. Байтурсынова, Казахстан, г. Костанай, e-mail: akalbyeva@list.ru

**ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА  
АССОЦИАЦИЙ БАКТЕРИЙ КАСПИЙСКОГО РЕГИОНА  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ**

На современном этапе развития нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности Казахстана не представляется возможным полностью исключить загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами, что делает актуальным проведение работ, направленных на решение данной экологической проблемы. В качестве эффективного средства охраны окружающей среды хорошо зарекомендовал себя биологический способ очистки. Все чаще для биоремедиации используют аборигенные микроорганизмы конкретных мест загрязнения, поскольку эти культуры адаптированы к сложившимся климатическим и экологическим условиям, что дает ряд преимуществ составленным на их основе консорциумам.

В данной работе изучен углеводородокисляющий потенциал аборигенных бактерий Каспийского региона Казахстана и их ассоциаций, и отобраны наиболее эффективные консорциумы для создания препаратов для биоремедиации.

У 12 штаммов бактерий, выделенных из проб воды и почв, отобранных в районе месторождений Каражанбас и Каламкас, продемонстрировавших стабильный и интенсивный рост на среде с нефтью были изучены характеристики: процент деградации нефти, индекс эмульгирования, гидрофобность клеточной поверхности, антагонистическая активность. На основе данных штаммов составлены ассоциации бактерий, у которых исследован ростовой потенциал и углеводородокисляющая активность в условиях лабораторных модельных экспериментов. Отобраны консорциумы с наибольшей деградирующей способностью: *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar21, *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 и *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54. Ассоциация *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar21 деградировала 73,1±6,9% нефтяных углеводородов, 94,6±8,6% углеводородов дизельного топлива, 79,7±6,2% бензиновых углеводородов. Комплекс *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 разрушал 96,8±5,7% фракций нефти, 97,8±7,9% фракций дизеля и 86,2±7,3% фракций бензина. Консорциум *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54 приводил к уменьшению содержания нефтяных углеводородов на 83,5±7,2%, дизельных на 88,7±8 и бензиновых на 74,3±6,9%.

Данные бактериальные ассоциации перспективны в качестве биодеструкторов углеводородов и могут использоваться в биоремедиации загрязнений окружающей среды.

**Ключевые слова:** биоремедиация, ассоциации бактерий, углеводородокисляющий потенциал, индекс эмульгирования, гидрофобность клеточной поверхности.

Goncharova A.V.<sup>1</sup>, Karpenyuk T.A.<sup>2</sup>, Tufuminova Ja.S.<sup>3</sup>, Karelova D.S.<sup>4</sup>, Kalbaeva A.M.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD of biological sciences, associated professor of Biotechnology Department, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>2</sup>doctor of biological sciences, professor of Biotechnology Department, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>3</sup>PhD, researcher, e-mail: yanatufuminova@gmail.com

<sup>4</sup>trainee researcher, e-mail: dasha.karelova310197@gmail.com

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>5</sup>teacher of A. Baitursynov Kostanay State University, Kazakhstan, Kostanay, e-mail: akalbyevea@list.ru

### **Studying of the hydrocarbon-oxidizing potential of Caspian region bacteria associations for creation of preparations for bioremediation**

At the present stage of development of the oil-producing and oil-refining industries in Kazakhstan, it is not possible to completely exclude environmental pollution by oil and oil products, which makes it urgent to carry out works aimed to solving this environmental problem. As an effective means of the environment protecting, the biological method of purification has proved itself. Increasingly bioremediation uses aboriginal microorganisms from specific pollution sites, as these cultures are adapted to the prevailing climatic and ecological conditions, which gives a number of advantages to the consortia formed on their basis.

In this work the hydrocarbon-oxidizing potential of native bacteria from Caspian region in Kazakhstan and its associations was studied and the most effective consortia were selected to create preparations for bioremediation.

12 strains of bacteria isolated from water and soil samples collected in the Karazhanbas and Kalamkas fields were demonstrated stable and intensive growth on the medium with oil. In these cultures several characteristics such as oil degradation percentage, emulsification index, cell surface hydrophobicity and antagonistic activity were studied. On the basis of these strains bacterial associations were compiled. The growth potential and hydrocarbon-oxidizing activity under laboratory model experiments were investigated in these associations. The consortia with the greatest degradation capacity were selected: *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar21, *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 and *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54. The association of *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar21 degraded 73.1 ± 6.9% of oil hydrocarbons, 94.6 ± 8.6% of diesel fuel hydrocarbons, 79.7 ± 6.2% of gasoline hydrocarbons. Complex of *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 destroyed 96.8 ± 5.7% of oil fractions, 97.8 ± 7.9% of diesel fractions and 86.2 ± 7.3% of gasoline fractions. The consortium of *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54 reduced the content of petroleum hydrocarbons on 83.5 ± 7.2%, diesel on 88.7 ± 8 and gasoline on 74.3 ± 6.9%.

These bacterial associations are promising as bio destructors of hydrocarbons and can be used in bioremediation of environmental pollution.

**Key words:** bioremediation, bacterial associations, hydrocarbon-oxidizing potential, emulsification index, cell surface hydrophobicity.

Гончарова А.В.<sup>1</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>2</sup>, Туфуминова Я.С.<sup>3</sup>, Карелова Д.С.<sup>4</sup>, Калбаева А.М.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология кафедрасының доценті, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>2</sup>биология ғылымдарының докторы, биотехнология кафедрасының профессоры,  
e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>3</sup>PhD, ғылыми қызметкер, e-mail: yanatufuminova@gmail.com

<sup>4</sup>зерттеуші-тәжірибе жинақтаушы, e-mail: dasha.karelova310197@gmail.com  
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>5</sup>А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университетінің оқытушысы,  
Қазақстан, Қостанай қ., e-mail: akalbyevea@list.ru

### **Биоремедиацияға арналған препараттарды жасау үшін Каспий аймағындағы бактериялар қауымдастықтарының көмірсутегін тотықтыру потенциалын зерттеу**

Қазіргі кезеңде Қазақстандағы мұнай өндіру және мұнай өңдеу салаларының дамуына байланысты мұнай мен мұнай өнімдерімен қоршаған ортаның ластануын толығымен алып тастау мүмкін емес. Сол себептен аталған экологиялық проблеманы шешуге бағытталған жұмыстар өзекті болып табылады. Қоршаған ортаны қорғаудың тиімді құралы ретінде тазартудың биологиялық әдісі өзін жақсы жағынан көрсете білді. Жергілікті биоремедиация үшін нақты ластану учаскелерінен алынған микроорганизмдер көбіне пайдаланады, өйткені бұл дақылдар сол аймақтың климаттық және экологиялық жағдайларына бейімделген. Сондықтан микроорганизмдердің бұрынғы штамдарына негізделген консорциумдар бірқатар артықшылықтарға ие.

Берілген жұмыста Қазақстанның Каспий аймағындағы аборигенді бактериялар қауымдастықтарының көмірсутекті тотықтыру потенциалы зерттелді және биоремедиацияға арналған

препараттарды жасауға ең тиімді консорциумдар іріктеліп алынды. Қаражанбас және Қаламқас кен орындарында жиналған су және топырақ үлгілерінен алынған және мұнай ортасында тұрақты мен қарқынды өсімді көрсеткен 12 бактериялардың штамдарының келесі сипаттамалары зерттелді: мұнай деградациясының жылдамдығы, эмульсиялану индексі, жасуша беткейінің гидрофобтығы және антагонистік белсенділігі. Осы штамдардың негізінде бактериялық қауымдастықтар құрылды, онда өсу потенциалы және көмірсутегі тотықтыру белсенділігі зертханалық модельдік эксперимент жағдайында зерттелді. Ең үлкен деградация сыйымдылығы бар консорциум іріктеліп алынды: *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar21, *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 және *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54. *Achromobacter denitrificans* skar13 + *Rhodococcus fascians* skar 21 бірлестігі мұнай көмірсутектерінің 73,1 ± 6,9%, дизель отыны көмірсутектерінің 94,6 ± 8,6%, бензин көмірсутектерінің 79,7 ± 6,2%-ын ыдыратты. *Roseomonas mucosa* wkal24 + *Stenotrophomonas chelatiphaga* wkal49 бірлестігі май фракцияларының 96,8 ± 5,7%, дизель фракцияларының 97,8 ± 7,9% және бензин фракцияларының 86,2 ± 7,3%-ын жойды. *Ochrobactrum* sp.wkal48 + *Sphingobacterium kitahiroshimense* wkar54 бірлестігі мұнай көмірсутектерінің құрамының 83,5 ± 7,2%-на, дизельді 88,7 ± 8%-на және бензиннің 74,3 ± 6,9%-на төмендеуіне әкелді. Аталған бактерияларды қауымдастықтарды көмірсутектердің биодеструкторлары ретінде қолданудың келешегі зор болып табылады және қоршаған ортаның ластануын биоремедиациялау үшін пайдалануға ұсынылады.

**Түйін сөздер:** биоремедиация, бактерия қауымдастықтары, көмірсутек тотықтыру потенциалы, эмульсиялану индексі, жасуша беткейінің гидрофобтылығы.

## Введение

Благосостояние всех прикаспийских государств напрямую связано с освоением углеводородных богатств, добыча которых с каждым годом растет, поэтому проблема создания эффективных и доступных средств для устранения опасных нефтяных загрязнений весьма актуальна для Казахстана (Гаджиев, 2003: 245). Биодegradация углеводородов путем целенаправленного применения селективных нефтеокисляющих микроорганизмов – перспективное направление очистки вод и почв от примесей нефти и нефтепродуктов (Бутаев, 2002: 16).

Чаще всего в производстве биопрепаратов нефтеокисляющего действия используют штаммы бактерий, относящиеся к родам *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* (Федоренко, 2016: 6). Основными недостатками существующих биопрепаратов являются: узкий диапазон температур / pH; неустойчивость к росту в соленой среде; неспособность деструктировать нефтепродукты в условиях аридного климата; неспособность микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов, продуцировать биосурфактанты; медленная деградация высоких концентраций нефти и нефтепродуктов; относительно неполная очистка загрязненных

участков и т.д. Поэтому, несмотря на наличие коммерческих бактериальных препаратов, существует необходимость по созданию новых консорциумов и способов их использования в качестве деструкторов углеводородов для очистки объектов окружающей среды от нефтяных загрязнений, как в местах добычи нефти, так и в местах переработки, транспортировки и непосредственного потребления (Айткельдиева, 2007: 252), (Ибатуллина, 2012: 377).

В последнее время активно ведутся работы не только по составлению «искусственных» ассоциаций микроорганизмов – нефтедеструкторов, но по выделению и использованию различных природных нефтедеструкторов, ориентированных на применение в тех или иных климатических условиях. Преимущества применения природных аборигенных микроорганизмов и их сообществ связаны с их устойчивостью к действию биотических факторов, адаптированностью к условиям среды. Именно поэтому для каждого региона перспективно разрабатывать собственный биопрепарат на основе аборигенных штаммов микроорганизмов (Мухаматдырова, 2016: 3).

Целью настоящего исследования являлось изучение углеводородокисляющего потенциала бактерий, выделенных на территории прибрежной части Казахстанской акватории Каспийского моря и их ассоциаций для отбора наиболее эффективных консорциумов для создания препаратов для биоремедиации.

## Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили пробы воды и почв, отобранные в районе нефтяных месторождений Каражанбас и Каламкас. Объектами исследования – бактерии разных таксономических групп, выделенные из данных проб: *Ochrobactrum sp. skar4*, *Agrobacterium radioibacter skar7*, *Achromobacter sp. skar8*, *Achromobacter denitrificans skar13*, *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24*, *Ochrobactrum sp. wkal48*, *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49*, *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal51*, *Stenotrophomonas sp. wkal52*, *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*, *Achromobacter spanius wkar55*. Бактерии были идентифицированы по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим признакам. Видовая принадлежность микроорганизмов была уточнена с помощью генетической идентификации на основании анализа прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank.

Микроорганизмы культивировали на питательной и минеральной средах: мясопептонный агар (МПА), среда Ворошиловой – Диановой (Егоров, 1976: 89), (Поляк, 2008: 153).

Для получения накопительной культуры бактерий и их ассоциаций штамм/-ы высаживали на минеральную среду Ворошиловой – Диановой (ВД) следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4$  – 1;  $KH_2PO_4$  – 1;  $NH_4NO_3$  – 1;  $MgSO_4$  – 0,2;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,01;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 3 капли (Файзуллина, 2014: 26). Дополнительно в среду вносили NaCl в концентрации 7%. В качестве единственного источника углерода добавляли 1% стерильную нефть месторождений Каражанбас и Каламкас (в зависимости от источника отбора проб) или 1% толуол/дизельное топливо/бензин (в зависимости от эксперимента). Для этого посевной материал вносили в колбы объемом 250 мл, добавляли 99 мл среды ВД и затем 1 мл углеводорода. Культивировали на качалке в течение 10 суток (Нетрусов, 2005: 303).

Массовую концентрацию нефтепродуктов определяли флуориметрически на приборе «Флюорат – 02-2М», согласно (ПНД Ф 14.1:2.4.128-98, 2007: 10), (Law, 2014: 2). Суспензию микроорганизмов инкубировали на среде ВД с углеводородом (1% нефть/толуол/дизельное топливо/бензин) в течение 10 суток, затем 100 мл исследуемой пробы переносили в

делительную воронку. Колбу, в которой находилась проба, ополаскивали 10 мл гексана и его также сливали в делительную воронку. Смесь экстрагировали встряхиванием в течение 1 минуты. Затем, отстаивали до полного разделения фаз, верхнюю гексановую фракцию отбирали, переносили в кювету и проводили измерение.

Массовую концентрацию нефтепродуктов в пробе вычисляли по формуле:

$$X = (X_{\text{изм}} * V_{\Gamma} * K) / V_{\text{пр}},$$

где X – массовая концентрация нефтепродуктов в пробе, мг/л;

X<sub>изм</sub> – массовая концентрация нефтепродуктов в гексановом экстракте пробы, мг/л;

V<sub>Г</sub> – объем гексана, взятый для экстракции, мл (10);

K – коэффициент разбавления экстракта (при необходимости). Если экстракт не разбавляли, то K = 1;

V<sub>пр</sub> – объем пробы, мл (100).

Концентрацию остаточных нефтепродуктов в исследуемой пробе пересчитывали в проценты, принимая контрольную пробу за 100%. Затем, высчитывали концентрацию деструктированных микроорганизмами нефтепродуктов, вычитая концентрацию остаточных нефтепродуктов из 100.

Индекс эмульгирования определяли, как описано в работе (Gupte, 2015: 346). Значение индекса эмульгирования выражали в процентах как отношение высоты эмульсионного слоя (мм) к общей высоте жидкости в пробирке (мм).

Гидрофобную активность измеряли по методу, описанному Rosenberg M. и соавторами в модификации Никовской (Rosenberg, 1980: 31). Процент гидрофобности рассчитывали как отношение разницы между начальным и конечным значением оптической плотности к начальному значению.

Для определения антагонистической активности отобранных штаммов бактерий применяли метод перпендикулярных штрихов (Ирkitова, 2012: 42), при котором заведомо известный или предполагаемый антагонист засеивается полосой по диаметру чашки с питательным агаром. Микроорганизмы, проверяемые по чувствительности к антагонистическому действию, засеиваются перпендикулярными штрихами. Степень чувствительности определяется по величине расстояния от центральной полосы культуры антагониста до начала выраженного роста бактерий, засеянных перпендикулярными штрихами.

Оптическую плотность суспензии бактерий определяли нефелометрически на приборе КФК-3-«ЗОМЗ» (фотоколориметрирование при длине волны 590 нм) при культивировании суспензии на жидкой среде при постоянном перемешивании на качалке при 220 об/мин.

Для определения сухой биомассы микроорганизмов культивирование бактерий проводили в чашках Петри, а затем инокулировали их в качестве посевного материала в колбу, содержащую 50 мл минеральной среды ВД с добавлением 0,5 мл углеводорода. На 0-е, 6-е и 10-е сутки культивирования, образцы фильтровали через мембранные фильтры (NC 45, Whatmann®, Germany, 0,45 мкм, диаметр 24 мм). Фильтры с культурой высушивали при температуре 100°C до постоянного веса, охлаждали в эксикаторе с силикагелем при комнатной температуре и взвешивали. В контрольных вариантах фильтры высушивали, охлаждали и взвешивали перед использованием для фильтрации. Разница в весе между первым и вторым взвешиванием фильтров была использована для расчета сухой биомассы микроорганизмов.

Экспериментальный материал был обработан статистически с вычислением среднего арифметического значения и стандартного отклонения.

### Результаты исследования и их обсуждение

Перспективность микроорганизма – нефтедеструктора определяется набором его физиолого – биохимических свойств. Прежде всего, это способность интенсивно утилизировать углеводороды нефти, широта спектра их потребления, возможность экономически оправданного масштабирования наработки биомассы, синтез биоПАВ, гидрофобность клеточной стенки и другие свойства.

Бактериальные культуры для составления консорциумов были отобраны по нескольким параметрам: 1) способность к эффективной деградации нефтепродуктов; 2) продуцирование биологических поверхностно-активных веществ при культивировании в нефтезагрязненных средах; 3) показатель гидрофобности клеточной поверхности; 4) отсутствие антагонистической активности при составлении ассоциаций из монокультур.

Изучение данных показателей показало следующие результаты.

Одним из методов количественного химического анализа, применяемым в настоящее время для определения нефтепродуктов, является флуориметрический метод. Он основан на экстракции нефтепродуктов гексаном с последующим измерением интенсивности флуоресценции экстракта, возникающей в результате оптического возбуждения. В формировании аналитического сигнала участвуют ароматические углеводороды. Поскольку они обладают различными условиями возбуждения и регистрации флуоресценции, наблюдается изменение спектра флуоресценции экстракта в зависимости от длины волны возбуждающего света.

В таблице 1 представлены данные по концентрации деструктированных нефтепродуктов в среде культивирования микроорганизмов.

Исследование степени деструкции нефтепродуктов в жидкой минеральной среде показало, что исследуемые штаммы способны разлагать от 13,4±0,4% до 91,1±4,5% ароматических углеводородов нефти. Так, наименьшую способность к деструкции продемонстрировали культуры *Achromobacter spanius wkar55*, *Achromobacter sp. skar8* и *Rhodococcus fascians skar21*, процент деградации которых варьировал в интервале от 13,4±0,4 до 26,6±3,6 %. В то время как остальные культуры были способны разлагать достаточно высокое количество углеводородов нефти месторождений после 7-10 суток культивирования – более 45,2±3,3%. Наибольшие значения наблюдались у культур *Roseomonas mucosa wkal24*, *Ochrobactrum sp. wkal48* и *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54* (67,7±5,8 – 91,1±4,5%).

Способность микроорганизмов расти на углеводородном субстрате, как правило, связана с синтезом ими биоПАВ, облегчающих поглощение углеводородов клетками бактерий за счет диспергирования нефтепродуктов и увеличения биодоступности углеводородов (Кайырманова, 2016: 145). Первичная оценка способности микроорганизмов образовывать поверхностно-активные вещества оценивается по эмульгирующей активности (индекс эмульгирования), который основывается на свойстве ПАВ образовывать эмульсию при встряхивании культуральной жидкости микроорганизмов с углеводородом (Бектурова, 2013: 56). Согласно данным литературы микроорганизмы, имеющие индекс эмульгирования больше 50%, считаются перспективными продуцентами поверхностно-активных веществ (Desai, 1997: 49).

Таблица 1 – Характеристики отобранных штаммов микроорганизмов

Штамм	% деградации нефтепродуктов	Индекс эмульгирования, %	Прирост гидрофобности, %
<i>Ochrobactrum sp. skar4</i>	45,2±3,3	50,0±1,7	52,3
<i>Agrobacterium radoibacter skar7</i>	49,7±3,5	52,7±0,9	10,7
<i>Achromobacter sp. skar8</i>	21,5±1,4	50,0±1,9	56,3
<i>Achromobacter denitrificans skar13</i>	47,1±3,7	46,9±2,2	44,3
<i>Rhodococcus fascians skar21</i>	26,6±3,6	50,0±4	35,6
<i>Roseomonas mucosa wka124</i>	91,1±4,5	50,8±2,3	46,1
<i>Ochrobactrum sp. wka148</i>	67,7±5,8	49,1±0,9	7,0
<i>Stenotrophomonas chelatiphaga wka149</i>	48,3±3,6	53,6±5,4	49,5
<i>Stenotrophomonas chelatiphaga wka151</i>	47,5±3,7	43,1±5,3	29,4
<i>Stenotrophomonas sp. wka152</i>	57,6±5,6	47,7±1	6,7
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense wka54</i>	74,1±6,1	43,9±1,5	21,4
<i>Achromobacter spanius wka55</i>	13,4±0,4	49,8±3,8	51,9

Результаты измерения индекса эмульгирования показали хороший потенциал большинства культур к образованию эмульсии нефти, что отражено в таблице 1.

Для всех бактерий значение индекса эмульгирования превышало 40%. Максимальными показателями обладали штаммы *Agrobacterium radoibacter skar7* – 52,7±0,9 и *Stenotrophomonas chelatiphaga wka149* – 53,6±5,4%. Минимальное значение данного показателя было у культур *Stenotrophomonas chelatiphaga wka151* – 43,1±5,3 и *Sphingobacterium kitahiroshimense wka54* – 43,9±1,5%. У оставшихся штаммов индекс эмульгирования был в пределах 46,9±2,2 – 50,8±2,3%.

Способность микроорганизмов деградировать углеводороды в значительной степени определена особенностями строения клеточной оболочки (Tsitko, 2003: 853). Известно, что нефтеокисляющие бактерии способны к непосредственному контакту с углеводородом за счет гидрофобной клеточной поверхности, обусловленной наличием в ней липидных компонентов (Karaseva, 2012: 3). При культивировании на углеводородных субстратах нередко происходят изменения в составе липидных комплексов клеточной оболочки нефтеокисляющих бактерий, вследствие чего меняется гидрофобность клеточной поверхности. Для прямого контакта клеток и углеводородов необходима повышенная гидрофобность поверхности клеток, способствующая проникновению в клетку углеводородов в виде субмикроскопических капель. А

увеличение гидрофобности клеток приводит к снижению уровня поверхностного натяжения и росту эмульгирующей активности жидких культур (Волченко, 2006: 7).

Результаты определения показателя гидрофобности клеточной стенки изучаемых культур микроорганизмов представлены в таблице 1.

При росте в присутствии нефти гидрофобность клеточной стенки увеличивалась к концу культивирования у всех культур, однако прирост гидрофобности изменялся в широких пределах – от 6,7 % у штамма *Stenotrophomonas sp. wka152* до 56,3 % у штамма *Achromobacter sp. skar8*. Незначительное увеличение индекса гидрофобности – до 10,7 % наблюдалось у культур *Agrobacterium radoibacter skar7*, *Ochrobactrum sp. wka148*, *Stenotrophomonas sp. wka152*. В то время, у культур *Ochrobactrum sp. skar4*, *Achromobacter sp. skar8* и *Achromobacter spanius wka55* наблюдалось максимальное увеличение показателя гидрофобности – более 50 %. Остальные культуры имели промежуточные значения. Активный прирост данного показателя говорит о том, что изначально, вне контакта с гидрофобным субстратом, клеточная поверхность была гидрофильна, что удобно с точки зрения манипуляций с биомассой, а повышение ее гидрофобности в процессе культивирования на среде с нефтью обеспечило создание условий для эффективной ассимиляции и поглощения углеводородов как единственного источника углерода и энергии (Karaseva, 2012: 3).

Далее была изучена антагонистическая активность отобранных перспективных штаммов бактерий.

Микроорганизмы в естественных биоценозах находятся в определенных взаимоотношениях друг с другом. Явление антагонизма широко распространено в природных сообществах микроорганизмов. Среди бактерий антагонизм был выявлен у *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Serratia marcescens*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus brevis* и других. Также антагонисты встречаются среди группы неспоровых грамотрицательных бактерий и у таких специфических групп, как молочнокислые бактерии, уробактерии и некоторые другие виды. Наибольшее число антагонистов с широким спектром действия обнаружено среди актиномицетов. Антагонизм может проявляться по разным причинам: истощение питательных веществ, физико-химические изменения среды – подкисление или подщелачивание, потребление кислорода, выделение в среду протеолитических ферментов, токсических веществ, антибиотиков (Гоготов, 2006: 108).

Для разработки высокоэффективного консорциума на основе активных углеводородокисляющих микроорганизмов обязательным условием является исключение возможности антагонистических взаимоотношений между микробными культурами.

В ходе изучения конкурирующих взаимодействий штаммов-нефтедеструкторов с использованием метода штрихового посева было обнаружено, что все отобранные культуры не оказывают антагонистического влияния на рост друг друга (данные не приведены) и могут быть использованы для создания на их основе ассоциаций. Типичная картина эксперимента представлена на рисунке 1.

Между гетеротрофными микроорганизмами, способными окислять нефтепродукты, существует кооперативная связь, которая определяет интенсивность и степень бактериальной деградации нефтяных загрязнений до конечных продуктов окисления – углекислого газа и воды (Волченко, 2007: 126), что подтверждается результатами данного исследования.

После проведенного теста на антагонистическую активность нами были составлены ассоциации бактерий.

При создании консорциумов могут использоваться как клетки отдельных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов (например

«Путидойл», «Олеворин»), так и бактериальные ассоциации («Деворойл»). Недостатком использования монокультур является менее эффективная деструкция нефтепродуктов, а использование большого количества микроорганизмов в одном комплексе затрудняет процесс наработки биомассы биопрепарата (Olivera, 2003: 71), (Киреева, 2007: 58), (Андреева, 2006: 46). В большинстве случаев, для повышения эффективности биодegradации нефти и нефтепродуктов, используются смешанные культуры, состоящие из двух и более штаммов микроорганизмов.

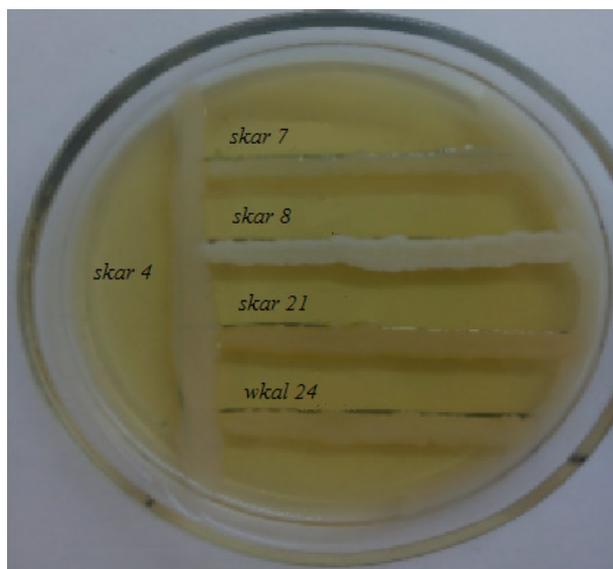


Рисунок 1 – Тест на антагонистическую активность отобранных штаммов бактерий

На этой основе, нами были созданы 6 консорциумов из 12 активных углеводородокисляющих непатогенных штаммов микроорганизмов, по 2 штамма в каждом консорциуме, взятых в соотношении 1:1 по сухой биомассе:

- *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp. skar8*,
- *Agrobacterium radoibacter skar7* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal51*,
- *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*,
- *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49*,
- *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*,
- *Stenotrophomonas sp. wkal52* + *Achromobacter spanius wkar55*.

У созданных консорциумов была изучена динамика роста (рисунок 2), оцененная по пока-

зателю прироста оптической плотности в среде культивирования микроорганизмов.

Все сформированные консорциумы имели положительную динамику роста в течение 7 суток выращивания на среде ВД с добавлением 1% нефти в качестве единственного источника углерода. Наибольший прирост оптической плотности в среде культивирования наблюдался у консорциумов *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* и *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp. skar8*. Оптическая плотность ассоциации *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* выросла в 7,7 раз по сравнению с начальным значением и достигла 767% к концу

культивирования. Оптическая плотность в среде культивирования биокомплекса *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* достигла 634% к концу культивирования, что в 6,3 раза больше по сравнению с начальным значением. Консорциум *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp. skar8* к 7 суткам культивирования имел оптическую плотность, составившую 434% от начального показателя. Оптическая плотность оставшихся комплексов к концу культивирования возрастала незначительно – в 1,5-2,5 раза. Наименьшими значениями характеризовались консорциумы *Agrobacterium radioibacter skar7* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal51* и *Stenotrophomonas sp. wkal52* + *Achromobacter spanius wkar55*.

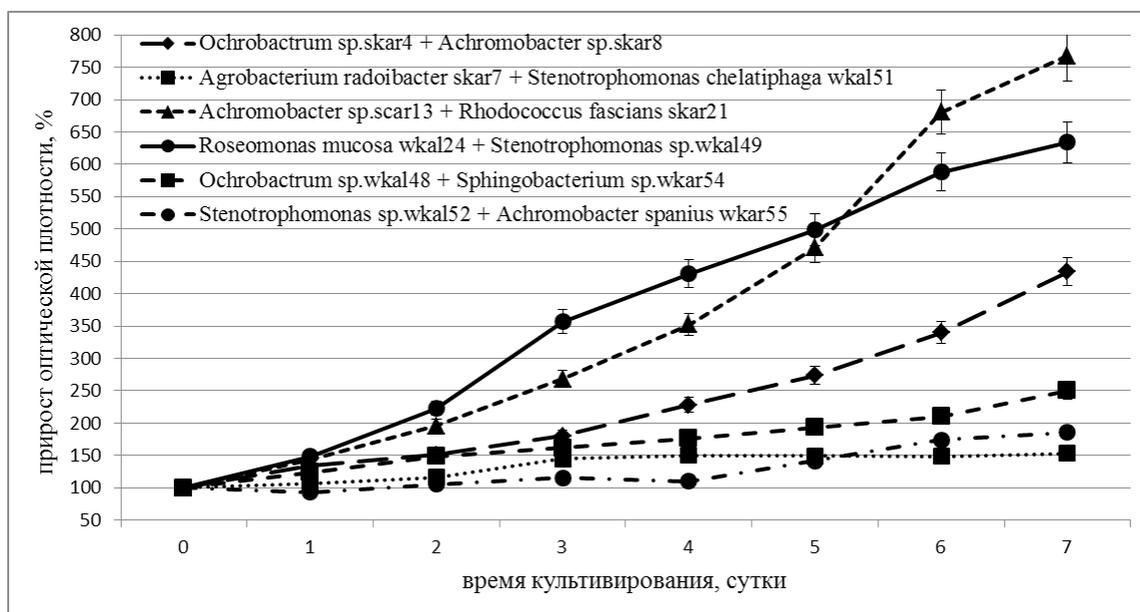


Рисунок 2 – Динамика роста консорциумов микроорганизмов на среде ВД с 1% нефтью

Исходя из данных по оптической плотности, у ассоциаций, имевших преимущества в росте на среде с нефтью (*Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp. skar8*, *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49*, *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*), был изучен углеводородокисляющий потенциал по двум параметрам – динамике накопления биомассы и количеству остаточной нефти и нефтепродуктов (бензина, дизельного топлива, толуола). На-

чальная биомасса, соответствующая оптической плотности 0,2, была принята за 100%.

При выращивании на среде ВД с добавлением в качестве единственного источника углерода 1% нефти все консорциумы бактерий имели положительную динамику накопления биомассы (рисунок 3). Наибольший прирост биомассы наблюдался у *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* на 10 сутки, биомасса увеличилась в 3,7 раза по сравнению с начальным значением. У остальных ассоциаций биомасса увеличилась в 1,8- 2,3 раза (рисунок 3).

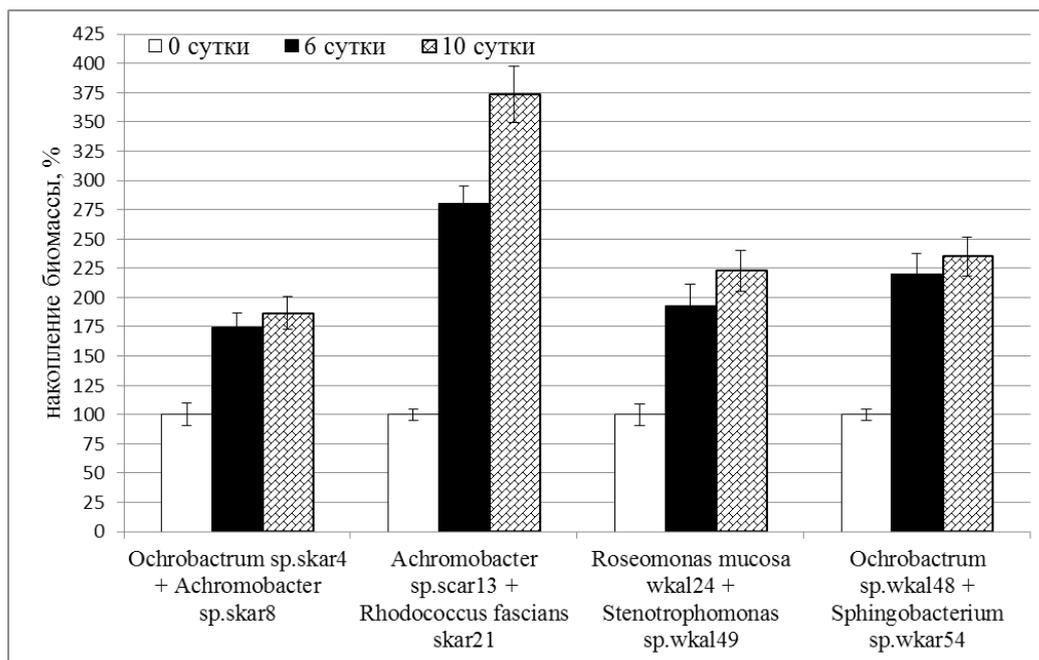


Рисунок 3 – Динамика накопления биомассы бактериями при выращивании на среде ВД с добавлением 1% нефти

На рисунке 4 показана динамика накопления биомассы консорциумами при выращивании на среде ВД с добавлением 1% дизельного топлива.

При культивировании на среде с дизельным топливом для ассоциаций *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* и *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54* наблюдался прирост биомассы, которая к 10 суткам культивирования микроорганизмов превысила начальные значения в 2,3; 1,8 и 1,7 раз, соответственно (рисунок 4). Для консорциума *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* максимум прироста биомассы наблюдался на 6 сутки культивирования, значение возросло в 1,5 раза по сравнению с начальным. Это может быть связано с тем, что дизельное топливо является менее токсичным и более легкоусваиваемым субстратом по сравнению с нефтью, также штаммы данной ассоциации могут разрушать преимущественно фракции, содержащиеся в дизеле, тем самым утилизируя его за более короткий промежуток времени. Наибольшую биомассу к концу культивирования накопил консорциум *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* –  $1,94 \pm 0,18$  г/л, а наименьшую – *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* –  $1,32 \pm 0,18$  г/л.

При культивировании на среде с бензином у трех консорциумов (кроме *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8*) наблюдался прирост биомассы в течение всего периода культивирования (рисунок 5). Так, у *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* биомасса увеличилась в 1,3 раза, у *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* и у *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54* в 1,5 раза по сравнению с начальным значением. Для ассоциации *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* достоверных изменений в количестве биомассы за весь период культивирования выявлено не было.

На рисунке 6 представлены данные по динамике накопления биомассы ассоциациями при выращивании на среде ВД с добавлением 1% толуола.

В присутствии в среде культивирования толуола, как единственного источника углерода и энергии, рост всех отобранных консорциумов микроорганизмов был незначительным по сравнению с ростом на нефти (рисунок 6), а в консорциуме *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* толуол полностью подавлял ростовые процессы. Это может быть связано с тем, что циклические углеводороды, к которым относится толуол, являются одними из наиболее

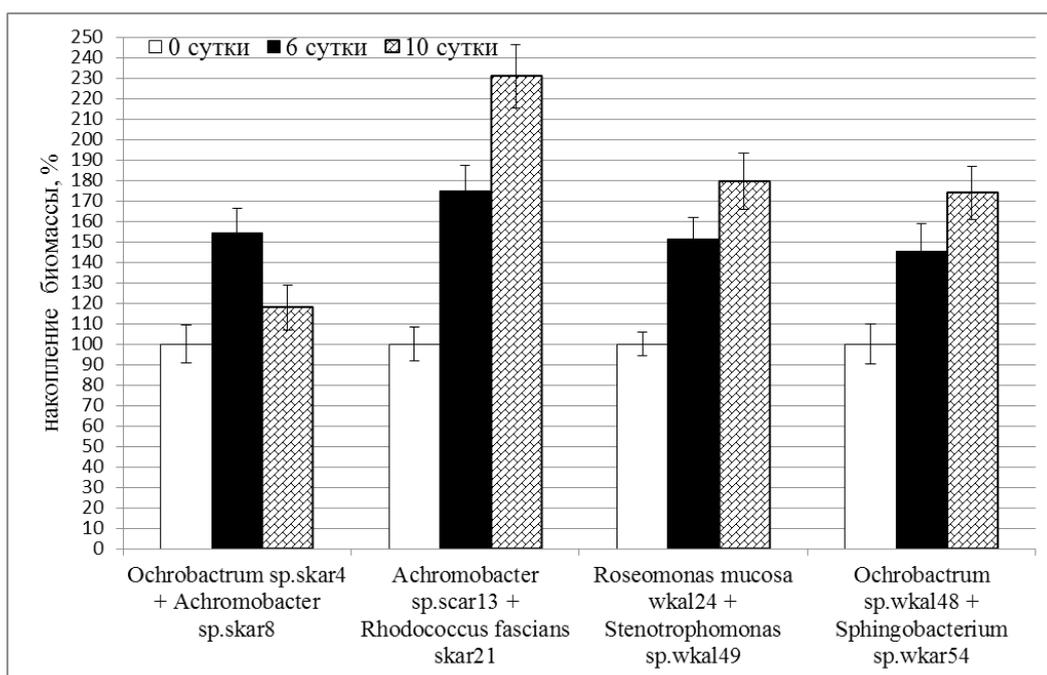


Рисунок 4 – Динамика накопления биомассы бактериями при выращивании на среде ВД с добавлением 1% дизельного топлива

быстродействующих токсичных нефтепродуктов, а также в связи с отсутствием в бактериальной плазмиде гена, отвечающего за разложение толуола (Логинова, 2010: 131), (Ветрова, 2008: 188).

Для консорциума *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* в течение всего периода культивирования большого прироста биомассы не наблюдалось (увеличилась на 26% по сравнению с начальным значением), к концу культивирования биомасса ассоциации составила  $1,3 \pm 0,2$  г/л. В биокомплексе *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* биомасса увеличилась на 56% по сравнению с начальной и достигла значения  $1,06 \pm 0,07$  г/л. У консорциума *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54* биомасса достигла максимального значения к 6 суткам культивирования – увеличилась на 54%, тогда как к концу культивирования ее прирост составил 42% от исходного значения ( $0,77 \pm 0,1$  г/л).

На рисунке 7 представлены данные флуориметрического измерения остаточного содержания нефтепродуктов в среде ВД с 1% углеводородом после роста на ней консорциумов микроорганизмов.

Количество углеводов, разрушенных консорциумами микроорганизмов при росте

на среде с нефтью, варьировало от  $59,3 \pm 5,2$  % у *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* до  $96,8 \pm 5,7$  % у *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* (рисунок 7).

Определение остаточного содержания компонентов дизельного топлива в среде после 10 суток культивирования в ней, показало что, у ассоциации *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* процент разрушения дизельного топлива был наименьшим и равнялся  $76,5 \pm 5,5$ . У консорциумов *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* и *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* показатель деструкции дизельного топлива был самым высоким и составил в среднем  $96,2 \pm 8,6$  %. Процент разрушения дизеля консорциумом *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54* составил  $88,7 \pm 8$ .

Наибольший показатель деградации бензина наблюдался у консорциумов *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21* –  $79,7 \pm 6,2$  % и у *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* –  $86,2 \pm 7,3$  %, а наименьший –  $44,6 \pm 3,1$  % у *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp.skar8* (рисунок 7).  $74,3 \pm 6,9$  % – составил данный показатель у биокомплекса *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*.

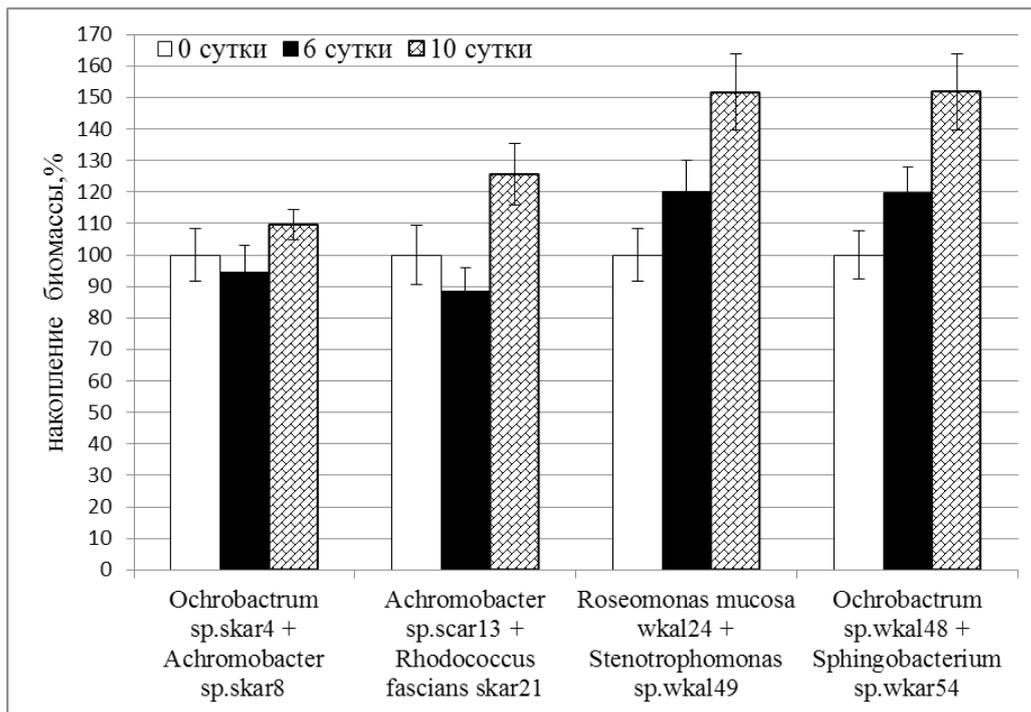


Рисунок 5 – Динамика накопления биомассы бактериями при выращивании на среде ВД с добавлением 1% бензина

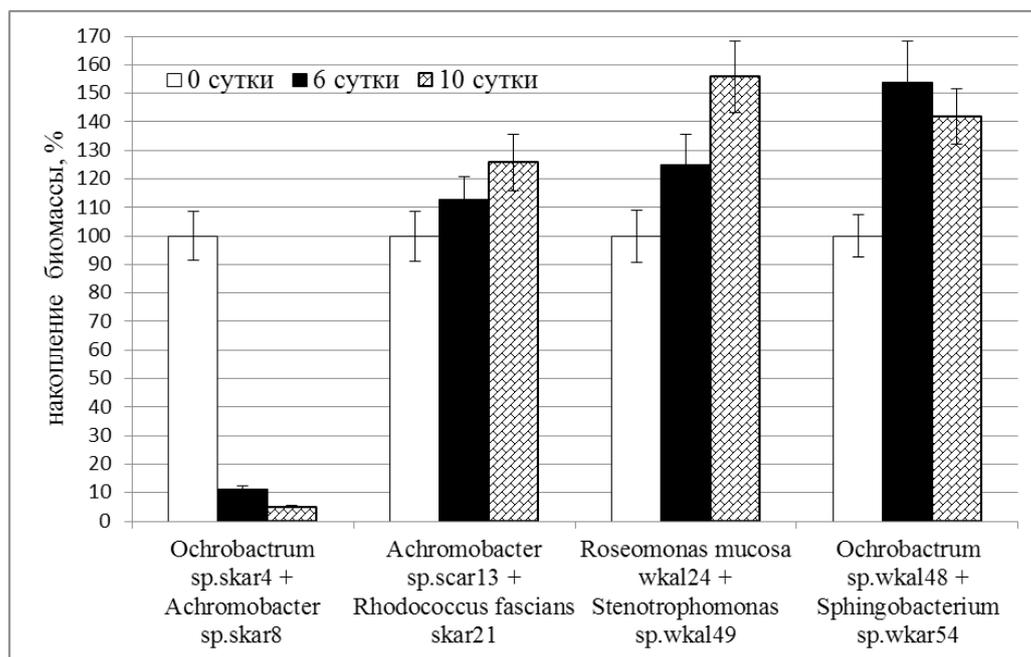


Рисунок 6 – Динамика накопления биомассы бактериями при выращивании на среде ВД с добавлением 1% толуола

Процент разрушения толуола в консорциумах был наименьшим по сравнению с другими углеводородами и не превышал 26, что, вероятно, связано с его высокой токсичностью для живых

клеток. Наибольшую деструкцию толуола вызывал консорциум *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* – 25,1±2,2 %, а наименьшим показателем характеризовался кон-

сорциум *Ochrobactrum sp. skar4* + *Achromobacter sp. skar8* –  $6,4 \pm 1,1$  %. У остальных ассоциаций % деструкции толуола варьировал от  $12,7 \pm 1,1$  до  $17,5 \pm 1,3$  % к 10 суткам культивирования.

Таким образом, показано, что наибольшими показателями прироста биомассы и процента

деструкции нефтепродуктов обладали 3 консорциума: *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* и *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*.

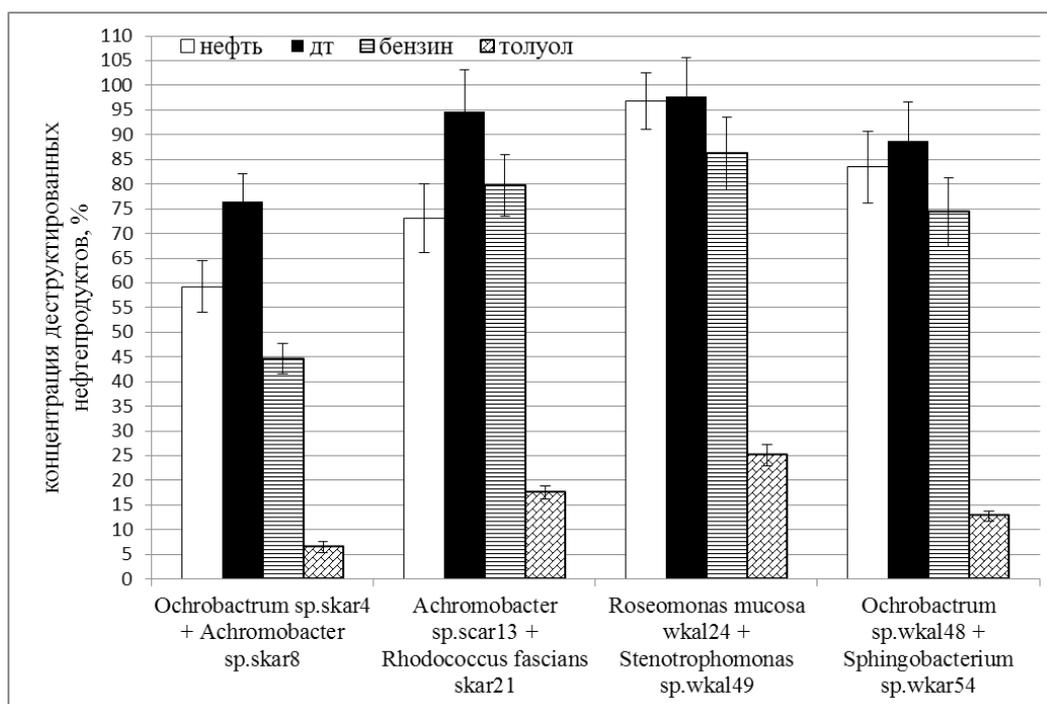


Рисунок 7 – Концентрация деструктурированных микроорганизмами нефтепродуктов при культивирования в течение 10 суток на среде ВД с 1% углеводородом

## Заключение

Бактерии созданных консорциумов являются постоянными и доминирующими компонентами естественных биоценозов нефтяных загрязнений Казахстанской территории Каспийского моря, что позволяет избежать необходимости учета климатических условий данного региона, свойств добываемой Казахстанской нефти, проблем взаимодействий и уживаемости применяемых микроорганизмов.

Высокая эмульгирующая активность отобранных бактерий говорит о доступности нефтепродуктов как источника питательных веществ для клеток микроорганизмов, а высокая гидрофобная активность говорит о значительной аффинности клеточной стенки бактерий и субстрата, то есть нефтепродуктов, что облегчает

процесс взаимодействия клеток с молекулами нефтепродуктов и, соответственно, способствует биодegradации углеводородов отобранными микроорганизмами.

Высокий процент разрушения различных классов углеводородов, а также значительный прирост биомассы в течение 10 суток культивирования говорит о высокой деградирующей способности консорциумов бактерий *Achromobacter denitrificans skar13* + *Rhodococcus fascians skar21*, *Roseomonas mucosa wkal24* + *Stenotrophomonas chelatiphaga wkal49* и *Ochrobactrum sp. wkal48* + *Sphingobacterium kitahiroshimense wkar54*.

Таким образом, высокий углеводородокисляющий потенциал позволяет использовать данные бактериальные ассоциации в качестве основы для создания препаратов для биоремедиации нефтезагрязнений Каспийского региона.

### Литература

- 1 Гаджиев А.А., Шихшабеков М.М., Абдурахманов Г.М., Мунгиев А.А. Анализ экологического состояния Каспия и проблем воспроизводства рыб. - М.: Наука, 2003. - 424 с.
- 2 Бутаев А.М., Кабыш Н.Ф. О роли углеводородокисляющих микроорганизмов в процессах самоочищения прибрежных вод дагестанского побережья Каспийского моря от нефтяного загрязнения // Вестник Дагестанского научного центра РАН. - 2002. - №11. - С. 15- 19.
- 3 Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений Северных морей: автореф. дисс. ... к. б. н.: 03.02.03, 03.01.06. – Москва: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2016. – 27 с.
- 4 Айткельдиева С.А., Файзуллина Э.Р. Изучение углеводородокисляющей активности микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Атырауской области (Казахстан) // Материалы II международной научной конференции «Современные проблемы загрязнения почв». - Москва: Изд-во МГУ, 2007. - Т. 2. - С. 252-256.
- 5 Ибатуллина И.З., Семенова Т.А., Яковлев А.С. Особенности биодеградации нефти в лугово- каштановых почвах Ставропольского края // Почвоведение. - 2012. - №3. - С. 376-384.
- 6 Мухаматдырова С.Р. Консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов как основа биопрепарата для очистки отходов нефтеперерабатывающей промышленности: автореф. ... к. б. н.: 03.02.03. - Уфа: Уфимский государственный нефтяной технический университет, 2016. - 28 с.
- 7 Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во МГУ, 1976. - С. 56 – 124.
- 8 Поляк М., Сухаревич В., Сухаревич М. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2008. – 352 с.
- 9 ПНД Ф 14.1:2:4.128-98. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных, питьевых, сточных вод флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02». – Москва, 2007. - 23 с.
- 10 Law R. The use of fluorimetric and other techniques for the in-situ determination of hydrocarbons in the water column // Technical Guideline. - 2014. – No. 5. - P. 1-4.
- 11 Gupte A., Sonawdecar S. Study of oil degrading bacteria isolated from oil contaminated sites // International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology. - 2015. - Vol. 3, No. 2. - P. 345-349.
- 12 Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // FEMS Microbiology Letters. - 1980. - Vol. 9, No. 1. - P.29-33.
- 13 Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского Государственного университета. – 2012. - № 3-1. – С. 41-44.
- 14 Кайырманова Г.К., Мустапаева Ж.О., Ерназарова А.К., Амангаликызы А. Эколого-функциональные свойства аборигенных микроорганизмов нефтепластов // East European Scientific journal. - 2016. - №7. - С. 145-149.
- 15 Бектурова А.Ж., Масалимов Ж.К., Мархаметова Ж.Ж., Еркасов Р.Ш., Оразбаева Р.С., Дарибай А.О. Эмульгирующая активность некоторых углеводородокисляющих микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. - 2013. - №3/1 (59). - С.56-58.
- 16 Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol and Molecular Biology Reviews. - 1997 - Vol. 61. - No. 1. - P. 47-64.
- 17 Tsitko I.V., Zaitsev G.M., Lobanok A.G., Salkinoja-Salonen M.S. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus* // Applied and Environmental Microbiology. - 2003. - Vol.65.- No. 2. - P. 853-855.
- 18 Karaseva E.V., Volchenko N.N., Khudokormov A.A., Samkov A.A., Karasev S.G., Batina E.V., Samkova S.M. Oil-degrading strain *Rhodococcus erythropolis* B2 as a base of biopreparation used for elimination of hydrocarbon contaminants and soil recultivation // KubNAU research journal. - 2012. - Vol. 83(09).- P. 1-14.
- 19 Волченко Н.Н., Карасев С.Г., Нимченко Д.В., Карасева Э.В. Гидрофобность клеток как критерий отбора бактерий-продуцентов биосурфактантов // Микробиология. - 2007. - Т. 76. - № 1. - С. 126-128.
- 20 Гоготов И.Н., Белоножкин С.В., Ходаков Р.С., Шкидченко А.Н. Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование // Материалы 3-й Международной конференции «Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность». – Пушкино: Биоресурсы и экология, 2006. – С. 104–111.
- 21 Волченко Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: автореф. ... к. б. н.: 03.00.23. - Ставрополь: Кубанский государственный университет, 2006. – 21 с.
- 22 Olivera N.L., Commendatore M.G., Moran A.C., Esteves J.L. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. - 2003. - No. 25. - P. 70-73.
- 23 Киреева Н.А., Рафикова Г.Ф. Разнообразие спорообразующих микроорганизмов в условиях нефтяного загрязнения почвы // Тезисы международной конференции «Микроорганизмы и биосфера». – Москва, 2007. – С. 58-59.
- 24 Логинова О.О., Данг Т.Т., Белоусова Е.В., Шалимова С.С., Шевченко М.Ю., Грабович М.Ю. Биодеградация нефтепродуктов в почве штаммами микроорганизмов рода *Acinetobacter* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. - 2010. - Вып. 12. – С. 129–136.
- 25 Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е., Пунтус И. Ф., Боронин А. М. Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодеградации // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. - 2008. - Вып. 2. - С. 186–193.

26 Андреева И.С., Емельянова И.К., Загребельный С.Н. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. – 2006. – № 1. – Р. 46-48.

27 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. - М.: Академия, 2005. - 608 с.

28 Файзуллина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Свирко Е.А., Даулетова А.А., Айткельдиева С.А. Нефтеокисляющая активность и идентификация микроорганизмов, выделенных из Каспийского моря // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2014. - №3. - С. 25-29.

## References

1 Aitkeldieva S.A., Faizullina E.R. (2007) Izuchenie uglevodorodokislyayushei aktivnosti mikroorganizmov, videlennykh iz neftezagryaznennykh pochv Atiraukskoi oblasti (Kazakhstan) [Study of the hydrocarbon-oxidizing activity of microorganisms isolated from oil-contaminated soils of the Atyrau region (Kazakhstan)]. Proceedings of the II International Scientific Conference "Sovremennye problemi zagryazneniya pochv". Moskva: Izd-vo MGU, is. 2, p. 252-256.

2 Andreeva I.S., Emelyanova I.K., Zagrebely S.N. (2006) Psikhrotolerantnye shtammy-neftedestruktoory dlya bioremediatsii pochv i vodnoi sredy [Psychrotolerant strains-oil destructors for bioremediation of soils and aquatic environments]. Biotekhnologiya, no. 1, p. 46-48.

3 Bekturova A.Zh., Masalimov Zh.K., Markhametova Zh.Zh., Erkasov R.Sh., Orazbaeva R.S., Daribai A.O. (2013) Emulgiruyushaya aktivnost nekotorykh uglevodorodokislyayushikh mikroorganizmov [Emulsifying activity of some hydrocarbon-oxidizing microorganisms]. Vestnik KazNU. Biologicheskaya seriya, no. 3/1 (59), p.56-58.

4 Butaev A.M., Kabyshev N.F. (2002) O roli uglevodorodokislyayushikh mikroorganizmov v protsesakh samoochisheniya pribrezhnykh vod dagestanskogo poberezhya Kaspiiskogo morya ot neftyanogo zagryazneniya [About role of hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the self-purification processes of coastal waters of the Dagestan coast of the Caspian Sea from oil pollution]. Vestnik Dagestanskogo nauchnogo tsentra RAN, no. 11, p. 15-19.

5 Desai J., Banat I. (1997) [Microbial production of surfactants and their commercial potential]. Microbiol and Molecular Biology Reviews, vol. 61. no. 1, p. 47-64.

6 Egorov N.S. (1976) Praktikum po mikrobiologii [Workshop on microbiology]. Moskva: Izd-vo MGU, p. 56 - 124.

7 Environmental regulatory document of the federal level 14.1: 2. 4.128-98 (2007) Metodika vypolneniya izmerenii massovoi kontsentratsii nefteproduktov v probakh prirodnykh, pit'yevykh, stochnykh vod fluorimetricheskim metodom na analizatore zhidkosti Flyuorat-02 [Method for performing measurements of mass concentration of oil products in samples of natural, drinking, waste water by fluorimetric method on the Fluorat-02 liquid analyzer]. Moskva, 23 p.

8 Faizullina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Svirko E.A., Dauletova A.A., Aytkeldiyeva S.A. (2014) Nefteokislyayushaya aktivnost i identifikatsiya mikroorganizmov, vydelennykh iz Kaspiiskogo morya [Oil-oxidizing activity and identification of microorganisms isolated from the Caspian Sea]. Izvestiya NAN RK. Seriya biologicheskaya i meditsinskaya, no. 3, p. 25-29.

9 Fedorenko V.N. (2016) Videlenie i otsenka biotekhnologicheskogo potentsiala mikroorganizmov dlya utilizatsii neftyanikh zagryaznenii Severnykh morei [Isolation and assessment of the biotechnological potential of microorganisms for the utilization of oil pollution in the North Seas]. Abstract of the diss. ... c.b.s.: 03.02.03, 03.01.06, Moskva: Moskovskii gosudarstvennii universitet imeni M.V. Lomonosova, 27 p.

10 Gadzhiev A.A., Shikhshabekov M.M., Abdurakhmanov G.M., Mungiev A.A. (2003) Analiz ekologicheskogo sostoyaniya Kaspiya i problemi vosproizvodstva rib [Analysis of the Caspian Sea ecological state and problems of fish reproduction]. Moskva: Nauka, 424 p.

11 Gogotov I.N., Belonozhkin S.V., Khodakov R.S., Shkidchenko A.N. (2006) Biosurfaktanty: produkty, svoystva i prakticheskoe ispolzovanie [Biosurfactants: producers, properties and practical use]. Proceedings of the 3rd International Conference "Mezhdunarodnoe sotrudnichestvo v biotekhnologii: ozhidaniya i realnost", Pushino: Bioresursy i ekologiya, p. 104-111.

12 Gupte A., Sonawdekar S. (2015) [Study of oil degrading bacteria isolated from oil contaminated sites]. International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology, vol. 3, no. 2, p. 345-349.

13 Ibatullina I.Z., Semenova T.A., Yakovlev A.S. (2012) Osobennosti biodegradatsii nefi v lugovo-kashtanovykh pochvakh Stavropolskogo kraya [Features of oil biodegradation in meadow chestnut soils of the Stavropol Territory]. Pochvovedenie, no. 3, p. 376-384.

14 Irkitova A.N., Kagan Ya.R., Sokolova G.G. (2012) Sravnitelnyi analiz metodov opredeleniya antagonisticheskoi aktivnosti molochnokisl'ykh bakterii [Comparative analysis of methods for determining the antagonistic activity of lactic acid bacteria]. Izvestiya Altayskogo Gosudarstvennogo universiteta, no. 3-1, p. 41-44.

15 Kaiyrmanova G.K., Mustapaeva Zh.O., Ernazarova A.K., Amangalikyzy A. (2016) Ekologo-funktsionalnye svoystva aborigennykh mikroorganizmov nefteplastov [Ecological and functional properties of aboriginal microorganisms of oil-layers]. East European Scientific journal, no. 7, p. 145-149.

16 Karaseva E.V., Volchenko N.N., Khudokormov A.A., Samkov A.A., Karasev S.G., Batina E.V., Samkova S.M. (2012) [Oil-degrading strain Rhodococcus erythropolis B2 as a base of biopreparation used for elimination of hydrocarbon contaminants and soil recultivation]. KubNAU research journal, vol. 83 (09), p. 1-14.

17 Kireeva N.A., Rafikova G.F. (2007) Raznoobrazie sporoobrazuyushikh mikroorganizmov v usloviyakh neftyanogo zagryazneniya pochvy [Variety of spore-forming microorganisms in conditions of oil contamination of soil]. Abstracts of the international conference "Mikroorganizmy i biosfera", Moskva, p. 58-59.

18 Law R. (2014) [The use of fluorimetric and other techniques for the in-situ determination of hydrocarbons in the water column]. Technical Guideline, no. 5, p. 1-4.

19 Loginova O.O., Dang T.T., Belousova E.V., Shalimova S.S., Shevchenko M.Yu., Grabovich M.Yu. (2010) Biodegradatsiya nefteproduktov v pochve shtammami mikroorganizmov roda *Acinetobacter* [Biodegradation of oil products in soil with strains of microorganisms of the genus *Acinetobacter*]. Organizatsiya i regulatsiya fiziologo-biokhimiicheskikh protsessov: mezhregionalnyi sbornik nauchnikh rabot, is. 12, p. 129-136.

20 Mukhamatdyarova S.R. (2016) Konsortsium uglevodorodokislyayushikh mikroorganizmov kak osnova biopreparata dlya ochestki otkhodov neftepererabatyvayushei promyshlennosti [Consortium of hydrocarbon-oxidizing microorganisms as the basis of biological product for the purification of waste from the oil refining industry]. Abstract of the diss. ... c.b.s.: 03.02.03, Ufa: Ufimskii gosudarstvennii tekhnicheskii universitet, 28 p.

21 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M., Kolotilova N.N. and others. (2005) Praktikum po mikrobiologii: uchebnoe posobie dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedenii [Workshop on microbiology: a textbook for students of higher educational institutions]. Moskva: Akademiya, 608 p.

22 Olivera N.L., Commendatore M.G., Moran A.C., Esteves J.L. (2003) [Biosurfactant-enhanced degradation of the hydrocarbons from the ship bilge wastes]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, no. 25, p. 70-73.

23 Polyak M., Suharevich V., Suharevich M. (2008) Pitatelnye sredy dlya meditsinskoi i sanitarnoi mikrobiologii [Nutrient media for medical and sanitary microbiology]. - SPb.: ELBI-SPb, 352 p.

24 Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. (1980) [Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity]. FEMS Microbiology Letters, vol. 9, no. 1, p.29-33.

25 Tsitko I.V., Zaitsev G.M., Lobanok A.G., Salkinoja-Salonen M.S. (2003) [Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*]. Applied and Environmental Microbiology, vol.65, no. 2, p. 853-855.

26 Vetrova A.A., Ovchinnikova A.A., Filonov A.E., Puntus I.F., Boronin A.M. (2008) Destruktsiya nefi bakteriyami roda *Pseudomonas*, sodержashimi razlichnye plazmidy biodegradatsii [Oil destruction with bacteria of the genus *Pseudomonas* containing various biodegradation plasmids]. Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki, is. 2, p. 186-193.

27 Volchenko N.H., Karasev S.G., Nimchenko D.V., Karaseva E.V. (2007) Gidrofobnost kletok kak kriterii otbora bakterii-produktentov biosurfaktantov [Hydrophobicity of cells as a criterion for the selection of bacteria-producers of biosurfactants]. Mikrobiologiya, is. 76, no. 1, p. 126-128.

28 Volchenko N.N. (2006) Vliyaniye uslovii kultivirovaniya na poverkhnostno-aktivnyye svoystva uglevodorodokislyayushikh aktinobakterii [Influence of cultivation conditions on the surface-active properties of hydrocarbon-oxidizing actinobacteria]. Abstract of the diss. ... c.b.s.: 03.00.23, Stavropol: Kubanskii gosudarstvennyi universitet, 21 p.