

Способность некоторых бактерий-нефтедеструкторов продуцировать биосурфактанты

© 2020. С. М. Кузнецов¹, д. м. н., профессор,
А. А. Алалыкин¹, к. х. н., ведущий инженер, Е. О. Лобанова¹, инженер,
О. А. Новикова¹, техник, В. Г. Комоско¹, руководитель НОЦ,
С. Г. Литвинец¹, к. с.-х. н., доцент, проректор,
Е. А. Мартинсон¹, к. т. н., доцент, директор института,
А. В. Николаева², к. г. н., член-корр. РАЕН, начальник отдела,
М. А. Трошин², к. т. н., в. н. с.,
¹Вятский государственный университет,
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,
²Научно-исследовательский институт трубопроводного транспорта,
117186, Россия, г. Москва, Севастопольский проспект, д. 47а,
e-mail: litvinets@vyatsu.ru

Изучена способность штаммов бактерий-нефтедеструкторов *Pseudomonas fluorescens* 28/5, *Rhodococcus erythropolis* 36a-1, *Pseudonocardia autotrophica* DSM 43096, 43190, *Rhodococcus jialingiae* Б-М-1 продуцировать биосурфактанты. Установлено, что культивирование с использованием в качестве источника углерода додекана и гексадекана приводит к образованию конгломератов всеми исследуемыми культурами на 4–9 сут. При выращивании на синтетической питательной среде с добавлением этанола процесс образования конгломератов не наблюдался. Объем биосурфактантов, полученных путём экстракции смесью хлороформа и метанола и отгонкой растворителей на роторном испарителе, варьировал от 0,15 до 1,90 мл с 10 мл культуральной жидкости. Анализ химической структуры биосурфактантов методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии позволил установить идентичный качественный состав для всех образцов. Различия заключались в количественном соотношении отдельных компонентов. В составе образцов обнаружены химические соединения, относящиеся к неионогенным ПАВ и биосурфактантам. Выявлено присутствие во всех молекулах карбоксильных групп, на основании чего исследуемые биосурфактанты могут быть отнесены к классу поверхностных анионоактивных веществ. Максимальный выход биосурфактантов получен у штаммов *Pseudonocardia autotrophica* DSM 43096, 43190 (15,2 г/л) и *Rhodococcus erythropolis* 36a-1 (14,4 г/л), что можно считать основанием для рекомендаций по их включению в состав биопрепаратов для ликвидации нефтяных разливов.

Ключевые слова: микроорганизмы-нефтедеструкторы, биосурфактанты, глубинное культивирование, поверхностно-активные вещества, хроматомасс-спектрометрия, химическая структура биосурфактантов, трегалолипиды.

The ability of certain oil destructive bacteria to produce biosurfactants

© 2020. S. M. Kuznetsov¹ ORCID: 0000-0002-4444-5170^{*}
A. A. Alalykin¹ ORCID: 0000-0001-7453-3617^{*}, E. O. Lobanova¹ ORCID: 0000-0002-2509-8193^{*}
O. A. Novikova¹ ORCID: 0000-0003-0735-1607^{*}, V. G. Komosko¹ ORCID: 0000-0002-2083-6169^{*}
S. G. Litvinets¹ ORCID: 0000-0001-8583-5274^{*}, E. A. Martinson¹ ORCID: 0000-0002-0364-4106^{*}
A. V. Nikolaeva² ORCID: 0000-0001-7345-8416^{*}, M. A. Troshin² ORCID: 0000-0002-6749-7248^{*}
¹Vyatka State University,
36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
²Pipeline Transport Institute,
47A, Sevastopolskiy Prospekt, Moscow, Russia, 117186,
e-mail: litvinets@vyatsu.ru

The ability of bacterial strains of oil destructors of *Pseudomonas fluorescens* 28/5, *Rhodococcus erythropolis* 36a-1, *Pseudonocardia autotrophica* DSM 43096, 43190 and *Rhodococcus jialingiae* B-M-1 to produce biosurfactants was studied. The strains were cultured on liquid nutrient media containing dodecane, hexadecane and ethanol in a shaker incubator

at 160 rpm, temperature (28±1) °C for 168 hours. We found that cultivation using dodecane and hexadecane causes the formation of conglomerates by all cultures on days 4–9. When grown on a synthetic nutrient medium with the addition of ethanol, the formation of conglomerates was not observed. The extraction of biosurfactants from the culture fluid was carried out by extraction with a mixture of chloroform and methanol and distillation of the solvents on a rotary evaporator. The volume of obtained surfactants ranged 0.15 to 1.90 mL from 10 mL of culture fluid. To analyze the chemical structure of biosurfactants, the method of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry was used. Chromatograms obtained for all samples with positive polarity, as a result of comparison of chromatographic peaks, made it possible to establish an identical qualitative composition. The differences were only in the quantitative ratio of the individual components in different samples. Chemical compounds related to nonionic surfactants and biosurfactants were found in the composition of the samples. The presence of carboxyl groups in all molecules was revealed, which allows these substances to be classified as surface anionic substances. The maximum amount of biosurfactant was obtained from strains of *Pseudonocardia autotrophica* DSM 43096, 43190 (15.2 g/L) and *Rhodococcus erythropolis* 36a-1 (14.4 g/L). This fact is the basis for the inclusion of these strains in the composition of biological products for the elimination of oil spills.

Keywords: oil-destroying microorganisms, biosurfactants, cultivation in liquid nutrient media, chromatomass spectrometry, chemical structure of biosurfactants, trehalolipids.

В последние годы внимание исследователей привлекают биосурфактанты, которые являются биологическими поверхностно активными веществами (биоПАВ) и по своим эмульгирующим свойствам не уступают синтетическим аналогам. В тоже время низкая токсичность, биodeградability, устойчивая активность в экстремальных условиях, а также получение из возобновляемых источников [1–3] делают эти вещества перспективными для создания новых материалов и технологий. Биосурфактанты, являясь относительно новыми продуктами биотехнологии, используются в разных областях промышленности (химической, фармацевтической, пищевой), а также для решения экологических задач по очистке нефтезагрязнённых территорий [4, 5]. В настоящее время получено значительное количество различных разновидностей биосурфактантов, каждый из которых продуцируется специфической группой микроорганизмов. Среди них выделяют гликолипиды, рамнолипиды, софоролипиды, трегалолипиды, липопротеины, жирные кислоты и другие [6]. Анализ литературы свидетельствует о том, что биосурфактанты бактерий-нефтедеструкторов являются важным фактором, определяющим эффективность процесса утилизации нефтепродуктов [7, 8]. Общим свойством биосурфактантов является наличие в молекуле как гидрофильных, так и гидрофобных частей [9]. В результате они эффективно снижают поверхностное натяжение воды, водных растворов и имеют выраженную эмульгирующую активность, тем самым повышают биодоступность нефти и нефтепродуктов за счёт дисперсии углеводородсодержащих компонентов, что обеспечивает повышение эффективности окисляющей способности микроорганизмов-нефтедеструкторов [10]. Значительный интерес биосурфактан-

ты бактерий-нефтедеструкторов представляют для создания средств борьбы с аварийными разливами нефти нового поколения – биосорбентов [11].

На основании комплексных исследований, проведённых в Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук коллективом авторов под руководством И.Б. Ившиной для снижения уровня нефтезагрязнений был разработан олеофильный биопрепарат на основе *Rhodococcus*-биосурфактантов, который представляет собой органоминеральный биокомплекс, содержащий *Rhodococcus*-биосурфактант, активную ассоциацию бактериальных культур-нефтеразрушителей и сбалансированную минеральную добавку азота, калия, фосфора [12].

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение способности штаммов бактерий-нефтедеструкторов (*Pseudomonas fluorescens* 28/5, *Rhodococcus erythropolis* 36a-1, *Pseudonocardia autotrophica* DSM 43096, 43190 и *Rhodococcus jialingiae* Б-М-1) продуцировать биосурфактанты для их включения в состав биокомпонентов препаратов, разрабатываемых для ликвидации нефтяных разливов.

Объекты и методы исследования

Для исследования были выбраны эффективные штаммы бактерий-нефтедеструкторов, депонированные в коллекции Национального биоресурсного центра – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»»: *P. fluorescens* 28/5 (ВКПМ В-6735), *R. erythropolis* 36a-1

(ВКПМ АС-1226), *P. autotrophica* DSM 43096, 43190 (ВКПМ АС-917), *R. jialingiae* Б-М-1 (ВКПМ АС-1967).

Для получения биосурфактантов микроорганизмы культивировали на плотной питательной среде – FT-агаре (ФБУН «ГНЦ ПМБ») и рекомендованных для этих целей жидких минеральных питательных средах «К» [13] и «А» [14]. В качестве источника углерода и энергии использовали (по объёму): этанол в концентрации 2%; гексадекан – 1–2%; додекан – 1–2%.

Для получения стандартизованного исходного материала использовали лиофильно высушенные рабочие культуры штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов, находящиеся на хранении при температуре минус 10 °С. Посевной материал выращивали на скошенном агаре в матрацах при температуре (37±1) °С в течение 48–72 ч. Матрацевые культуры смывали 20,0–25,0 см³ стерильного физиологического раствора и в асептических условиях переносили в стерильные колбы, содержащие 500 см³ жидкой питательной среды «К» или «А». Колбы засеивали до плотности посева не менее 2 · 10⁶ КОЕ/см³ и выращивали в шейкер-инкубаторе при постоянном перемешивании (160 об./мин) и температуре (28±1 °С) в течение 7 сут. Ежедневно отбирали пробы для определения поверхностного натяжения стеклянным сталагмометром.

Для выделения биосурфактантов из культуральных жидкостей удаляли бактериальные клетки путём центрифугирования на лабораторной центрифуге В1-ОЦЖ-24 с использованием режима: скорость вращения ротора – 1370 об./мин, продолжительность – 30 мин. Бесклеточный супернатант экстрагировали смесью хлороформ : метанол (3 : 1, V/V), подкисляли соляной кислотой до pH = 2 и выдерживали в течение 12 ч при температуре 4 °С. Затем отбирали нижний органический слой и удаляли растворитель на ротационном испарителе RV-10 basic V при температуре 35 °С. В конце упаривания к смеси добавляли бензол и упаривали досуха.

Для изучения химической структуры использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии, который является гибридным методом и объединяет независимые друг от друга процессы жидкостного хроматографического разделения и масс-спектрометрического анализа.

Исходные образцы экстрактов, помещали в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл, гомогенизировали

на вортексе в течение 10 мин при комнатной температуре. Навески 10 мг гомогенизированных экстрактов каждого образца переносили в чистые пробирки и добавляли по 1 мл смеси очищенной воды с метанолом (1:1 по объёму). Содержимое пробирок перемешивали на вортексе в течение 10 мин, после чего полученные растворы фильтровали через шприцевые полиамидные фильтры «Chromafil Xtra PA-20/13» с диаметром пор 0,2 мкм и помещали в вials автосэмплера. Условия проведения анализа: дозируемый объём пробы – 5 мкл; температура термостата колонок – 35 °С; расход подвижной фазы – 0,25 мл/мин, режим элюирования – бинарный градиент: фаза А – вода очищенная I типа, фаза Б – ацетонитрил: начальное содержание 0% с 0 до 2 мин, увеличение до 70% с 2 до 13 мин, увеличение до 90% с 13 до 14 мин; выдержка при 90% в течение 2 мин; тип ионизации – электроспрей (положительная и отрицательная полярность); ионизирующее напряжение – 3,5 кВ; энергия коллизии (коллизионный газ – аргон) – 15–50 эВ; температура интерфейса – 300 °С; температура линии десольватации – 250 °С; расход газа-распылителя (азот) – 3 л/мин; расход газа – осушителя (азот) – 15 л/мин; режим сбора данных Q3 Scan, Product Ion Scan – в заданных диапазонах m/z.

Исследования проводили на tandemном жидкостном хроматомасс-спектрометре LCMS-8040 («Shimadzu», Япония) с системой трёх квадруполей. Прибор оснащён хроматографической колонкой «Dr. Maisch Reprosil-Pur Basic C18» 100 × 2 мм с размером зёрен неподвижной фазы 3 мкм.

Последующую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения LabSolutions LCMS 5.86.

Результаты и обсуждение

Основной целью работы было установить способность исследуемых штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов продуцировать биосурфактанты в процессе глубинного культивирования. Установлено, что культивирование в жидких питательных средах, содержащих додекан и гексадекан, приводило к образованию на 4–9 сут у всех штаммов конгломератов, которые имели различную структуру (рис. 1, см. цветную вкладку). Это требовало дополнительной дезинтеграции с целью выделения биосурфактанта. В тоже время выращивание на жидких питательных средах, содержащих этанол, не сопровож-

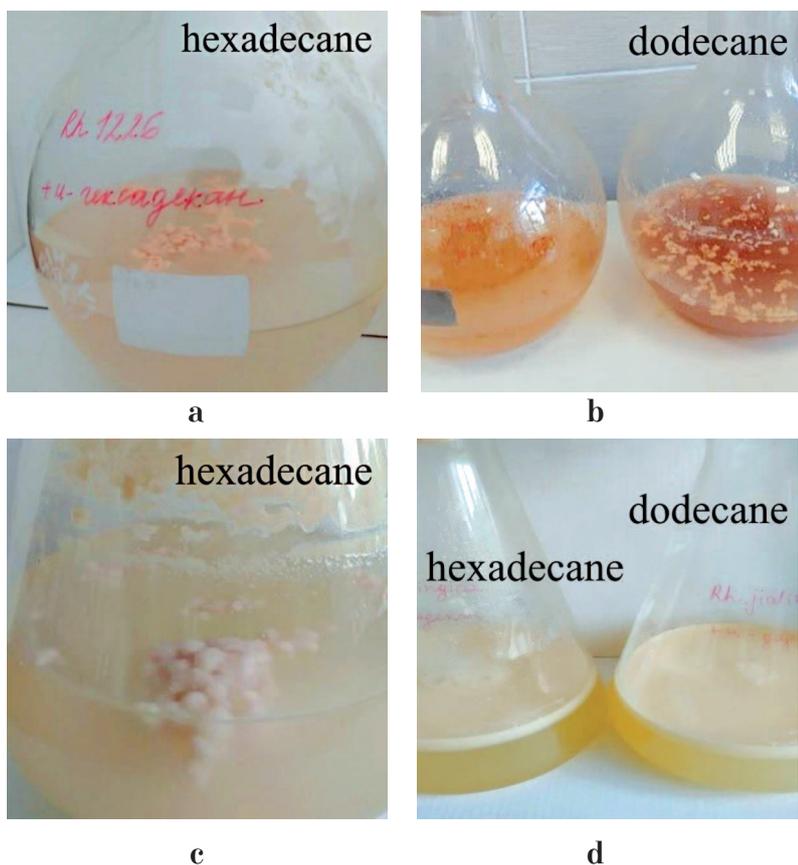


Рис. 1. Образование конгломератов при культивировании на средах с додеканом и гексадеканом у бактерий:

- a – *R. erythropolis* 36a-1 (4 сут);
- b – *P. autotrophica* DSM 43096, 43190 гексадекан (9 сут), додекан (9 сут);
- c – *P. fluorescens* 28/5, гексадекан (6 сут);
- d – пена на *R. jialingiae* Б-М-1, гексадекан (1 сут), додекан (5 сут)

Fig. 1. The appearance of conglomerates during cultivation on media with dodecane and hexadecane in bacteria:

- a – *R. erythropolis* 36a-1 (4th day);
- b – *P. autotrophica* DSM 43096, 43190 hexadecane (9th day), dodecane (9th day);
- c – *P. fluorescens* 28/5, hexadecane (6th day);
- d – foam on *R. jialingiae* B-M-1, hexadecane (1st day), dodecane (5th day)

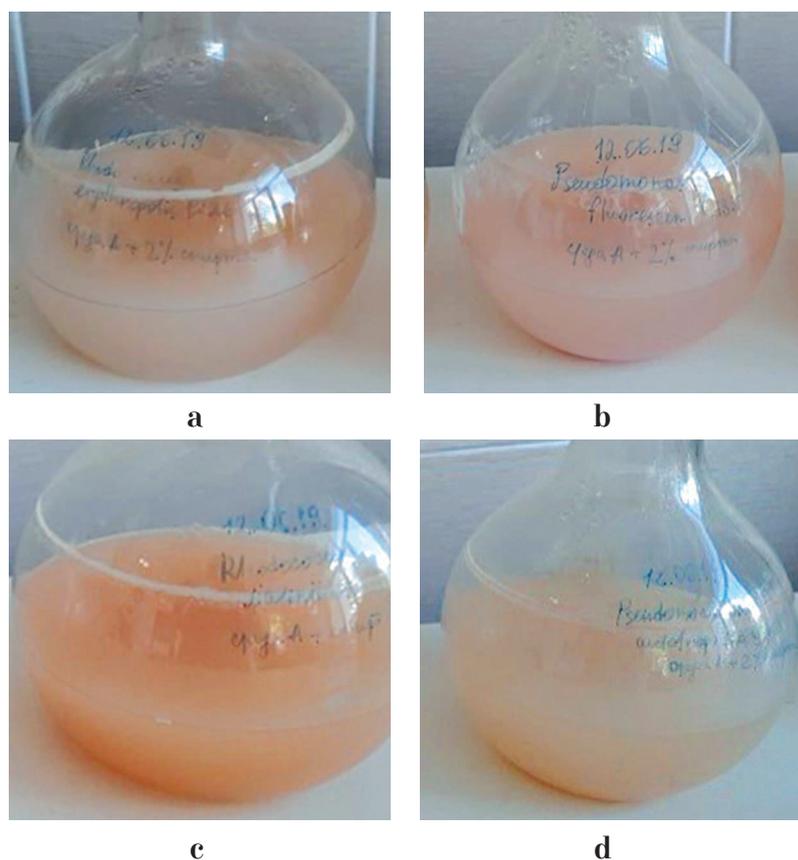


Рис. 2. Культуральные жидкости бактерий на седьмые сутки культивирования на среде с 2% этанола:

- a – *R. erythropolis* 36a-1;
- b – *P. fluorescens* 28/5;
- c – *R. jialingiae* Б-М-1;
- d – *P. autotrophica* DSM 43096, 43190

Fig. 2. Cultivation liquids on the seventh day of cultivation with the addition of 2% ethanol:

- a – *R. erythropolis* 36a-1;
- b – *P. fluorescens* 28/5;
- c – *R. jialingiae* B-M-1;
- d – *P. autotrophica* DSM 43096, 43190

Выход биосурфактантов после отгонки растворителей
The output of biosurfactants after distillation of solvents

Штамм микроорганизма The strain of microorganism	Количество биосурфактанта в зависимости от источника углерода, мл The volume of biosurfactant using carbon source, mL		
	додекан dodecan	гексадекан hexadecane	этанол ethanol
<i>R. erythropolis</i> 36a-1	1,80	0,30	1,00
<i>P. fluorescens</i> 28/5	1,60	1,60	0,20
<i>R. jialingiae</i> Б-М-1	1,70	1,60	0,15
<i>P. autotrophica</i> DSM 43096, 43190	1,30	1,90	0,20

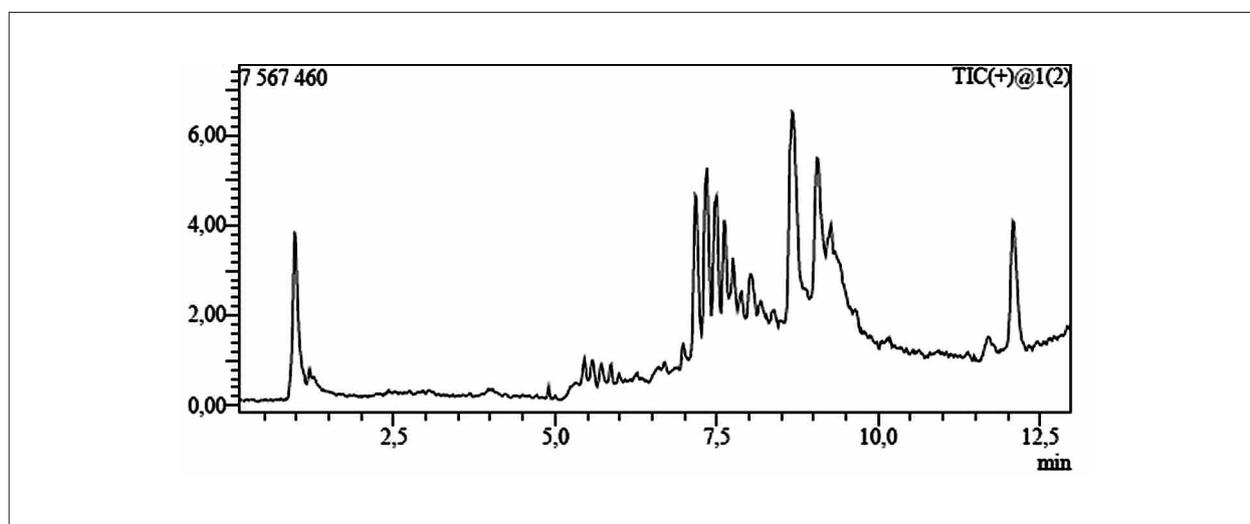


Рис. 3. Хроматограмма биосурфактанта *R. erythropolis* 36a-1 при культивировании на среде с гексадеканом
Fig. 3. Chromatogram of the *R. erythropolis* 36a-1 biosurfactant obtained by cultivation on a substrate with hexadecane

ждалось образованием конгломератов (рис. 2, см. цветную вкладку).

По окончании культивирования проводили отделение клеток, экстракцию биосурфактанта смесью хлороформа и метанола (3:1) и отгонку растворителей на роторном испарителе. Объём биосурфактантов варьировал от 0,15 до 1,90 мл (табл.).

Полученные биосурфактанты представляли собой маслянистые жидкости от прозрачного до буро-жёлтого цвета.

С целью определения общего химического состава исследуемых экстрактов подготовленные пробы анализировали в режиме сканирования m/z в диапазоне 400–1500 как при положительной, так и при отрицательной полярности ионного источника. При этом получали данные в виде хроматограмм, регистрируемых по полному ионному току (TIC).

Путём сопоставления первичных масс-спектров (содержащих псевдомолекулярные

ионы и их аддукты) хроматографических пиков был установлен идентичный качественный состав для двенадцати образцов. Различия отмечали лишь в количественном соотношении отдельных компонентов в разных пробах. Пример хроматограммы, полученной при положительной полярности ионизации, типичной для всех образцов, представлен на рисунке 3.

На хроматограммах всех образцов присутствуют группы пиков различной степени интенсивности в следующих интервалах времени: от 5 до 6,5 мин, от 7 до 8,5 мин и от 8,5 до 10 мин. Кроме того, во всех случаях наблюдаются группы пиков на начальных участках хроматограмм.

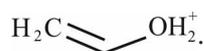
Достаточно интенсивные и плохо разделённые пики с небольшим временем удерживания (0,5–2 мин) обусловлены выходом из хроматографической колонки компонентов, имеющих низкое сродство к неподвижной неполярной фазе. К таким компонентам относят-

ся низкомолекулярные гидрофильные соединения: такие, как сахара, карбоновые кислоты, спирты, а также неорганические ионы. На сложный состав данной фракции указывает наличие большого количества ионов во всём диапазоне регистрируемых m/z .

В ходе исследований были выявлены аналогичные закономерности также и для группы компонентов, выходящих из хроматографической колонки в интервале от 5 до 6,5 мин. Их пики разной степени интенсивности присутствуют на хроматограммах всех образцов. В данном случае речь идёт также о соединениях, относящихся к сравнительно низкомолекулярным полиэтиленгликолям или их производным. Интервал молекулярных масс этих компонентов находится в пределах 400–650 Да.

Все анализируемые компоненты, выходящие из хроматографической колонки в интервале 7–8,5 мин, имели одинаковое строение молекул, являясь при этом представителями гомологического ряда соединений, отличающихся по молекулярным массам на 44 Да. С наибольшей вероятностью такими соединениями могут быть полиэтиленгликоли с общей формулой $[-CH_2-CH_2-O-]_n$ ($n = 9-16$) либо другие оксиэтилированные производные, содержащие в своей структуре фрагменты полиэтиленгликолей.

Ионы с m/z 45, 89 и 133 могут быть отнесены к протонированным в разной степени фрагментам цепочек полиэтиленгликоля. Так, ион с m/z 45, вероятнее всего представляет собой мономерный, с m/z 89 – димерный, а с m/z 133 – тримерный протонированный фрагмент. В частности, ион с m/z 45 может иметь структуру:



Описываемые соединения являются основой многих синтетических неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ). К ним относятся, например, этоксилированные спирты (синтанолы, полисорбаты), жирные кислоты, амины и др.

Компоненты, выходящие из хроматографической колонки в интервале времени от 8,5 до 10 мин, представляют собой производные дисахарида трегалозы, ацилированные в разной степени по гидроксильным группам, каприловой и каприновой кислотами. Кроме указанных кислот, возможно присутствие в структурах остатков других карбоксилсодержащих фрагментов, в частности янтарной кис-

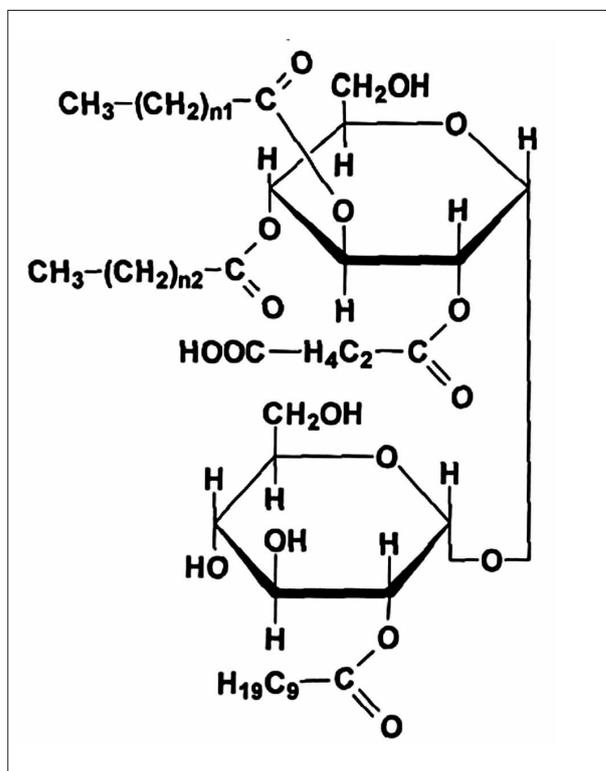


Рис. 4. Предполагаемая структурная формула биосурфактанта
Fig. 4. Presumptive structural formula of bio-surfactant

лоты. Молекулярные массы этих соединений лежат ориентировочно в пределах от 600 до 950 Да. Описываемые вещества, содержащие в своей структуре как гидрофильные (остатки трегалозы), так и гидрофобные (остатки жирных кислот) фрагменты, а также карбоксильные группы, могут представлять собой эффективные ПАВ, образовавшиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов, то есть являются биосурфактантами. Следует отметить, что количественное содержание биосурфактантов – производных трегалозы практически одинаково во всех исследованных образцах, на что указывают соизмеримые по площадям пики при 8,5–10 мин (рис. 3).

На рисунке 4 представлена одна из предполагаемых структур соединений данного ряда.

Пересчёт выхода биосурфактантов на 1 л среды показал, что их количество варьировало от 1,2 до 15,2 г/л. Максимальный выход отмечен у штаммов *P. autotrophica* DSM 43096, 43190 (15,2 г/л) при использовании в качестве источника углерода гексадекана и *R. erythropolis* 36a-1 (14,4 г/л) – при использовании додекана.

На основании результатов по выходу и анализу химической структуры биосурфактантов

для дальнейшей работы по созданию биопрепаратов для ликвидации нефтяных разливов можно рекомендовать штаммы *P. autotrophica* DSM 43096, 43190 и *R. erythropolis* 36a-1.

Заключение

Таким образом, для всех образцов биосурфактантов установлен одинаковый качественный компонентный состав. В составе биосурфактанта присутствует несколько групп однотипных химических соединений, относящихся к производным полиэтиленгликолей, то есть соединений, содержащих полиэтоксильированные фрагменты. Данные соединения являются неионогенными ПАВ. В составе образцов обнаружены химические соединения, относящиеся к биосурфактантам. Установлено, что эти вещества являются сложными эфирами дисахарида трегалозы и жирных кислот, в основном каприловой (октановой) и каприновой (декановой). Выявлено присутствие в их молекулах карбоксильных групп, на основании чего данные биосурфактанты могут быть отнесены к классу биоПАВ. Способность исследуемых штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов к образованию биосурфактантов, а также возможность использования этих соединений в чистом виде можно рекомендовать при разработке компонентного состава препаратов для ликвидации нефтяных разливов.

References

1. Akbari S., Abdurahman N.H., Yunus R.M., Fayaz F., Alara O.R. Biosurfactants – a new frontier for social and environmental safety: a mini review // *Biotechnol. Res. Innov.* 2018. V. 2. No. 1. P. 81–90. doi: 10.1016/J.BIORI.2018.09.001
2. Chetan D.M., Keerthana S., Prabhu B.A., Manjula M., Ranjit S., Ramesh R., Bhat S. Biosurfactants: an alternative to the synthetic surfactants and their production by bacteria isolated from solid waste // *J. Pure Appl. Microbiol.* 2018. V. 12. No. 3. P. 1561–1567. doi:10.22207/jpam.12.3.61
3. Gutnick D.L., Bach H. Biosurfactants. From genes to applications. Springer, 2011. 216 p. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00237-3
4. Bodour A.A., Drees K.P., Maier R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. No. 6. P. 3280–3287. doi: 10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003
5. Freitas B.G., Brito J.G.M., Brasileiro P.P.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1646. doi: 10.3389/fmicb.2016.01646
6. Rahman P.K.S.M., Gakpe E. Production, characterisation and applications of biosurfactants – Review // *Biotechnology.* 2008. V. 7. No. 2. P. 360–370. doi: 10.3923/biotech.2008.360.370
7. Marti M.E., Colonna W.J., Patra P., Zhang H., Green C., Reznik G., Pynn M., Jarrell K., Nyman J.A., Somasundaran P., Glatz C.E., Lamsal B.P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation // *Enzyme Microb. Technol.* 2014. V. 55. P. 31–39. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2013.12.001
8. Sen R. Biosurfactants // *Advances in experimental medicine and biology.* 2010. V. 672. 331 p. doi: 10.1007/978-1-4419-5979-9
9. Fracchia L., Cavallo M., Giovanna M., Banat I.M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – present status and future potentials // *Biomed. Sci. Eng. Technol.* 2012. 31 p. doi: 10.5772/23821
10. Karlapudi A.P., Venkateswarulu T.C.C., Tammineedi J., Kanumuri L., Ravuru B.K., Dirisala V.R., Kodali V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution – a review // *Petroleum.* 2018. V. 4. No. 3. P. 241–249. doi: 10.1016/j.petlm.2018.03.007
11. Nikolaeva A.V., Dunaeva A.S., Troshin M.A., Shipilova L.A., Chernyaeva I.A. Peat-borne hydrophobic biosorbent to eliminate the effects of accidental spills of oil and oil products on water and soil // *Nauka i tekhnologiya truboprovodnogo transporta nefti i nefteproduktov.* 2016. V. 2. No. 22. P. 100–105 (in Russian)
12. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Oleophilic biological preparation useful for cleaning oil-polluted soil // Patent RU 2180276 C1. Application: RU2001104629A, 19.02.2001. Date of publication: 10.03.2002 (in Russian).
13. Rubtsova E.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. The influence of cultivation conditions on the adhesive activity of rhodococci against n-hexadecane // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2012. V. 48. No. 5. P. 501–501 (in Russian).
14. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2004. V. 40. No. 5. P. 544–550 (in Russian).