

Биопрепарат с расширенным спектром биодеградативной активности для рекультивации почвы объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский»

© 2015. А. С. Туманов¹, к.м.н., начальник, Т. Я. Ашихмина^{2,3}, д.т.н., зав. лабораторией, зав. кафедрой, А. А. Лещенко¹, д.т.н., в.н.с., И. П. Погорельский¹, д.м.н., в.н.с., С. А. Шаров⁴, начальник отдела, В. В. Тетерин¹, к.б.н., начальник отдела, А. Г. Лазыкин¹, к.б.н., с.н.с., Г. В. Филимонова¹, м.н.с., А. В. Ежов¹, д.м.н., с.н.с., Р. Г. Пермяков¹, м.н.с.,
¹Научно-исследовательский центр ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России,
²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
³Вятский государственный гуманитарный университет,
⁴Объект по хранению и уничтожению химического оружия «Марадыковский»,
e-mail: ecolab2@gmail.com

Объектом изучения является биопрепарат – деструктор фосфорорганических соединений, нефти и нефтепродуктов, созданный на основе бактерий двух штаммов *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93 и *Pseudomonas putida* ЕК-8-14. Биопрепарат предназначен для рекультивации почвы на промплощадке и прилегающей территории объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский». Бактерии обоих штаммов непатогенны, биосовместимы, экологически безопасны, стабильны по признаку биодеградации экотоксикантов, неприхотливы по питательным потребностям, технологичны, не персистируют в объектах окружающей среды при отсутствии субстрата для деструкции. Разработана технология производства биопрепарата. Готовый к применению лиофильно обезвоженный биопрепарат представляет собой пористую массу светло-жёлтого цвета без посторонних включений. Целью выполненных исследований являлось расширение спектра деградативного потенциала биопрепарата за счёт дополнительного введения в его состав бактериального штамма *Pseudomonas putida* ЕК-8-14 – эффективного деструктора нефтезагрязнений почвы. У биопрепарата – деструктора, полученного по разработанной технологии, была изучена нефтедеструктирующая активность и способность к деградации глифосата. Изучение нефтедеструктирующей активности биопрепарата проведено в опытах *in vitro* при культивировании входящих в состав биопрепарата микроорганизмов в минеральной среде с нефтью. Моделирование природных условий процесса рекультивации почвы проводили на испытательном стенде с системами кондиционирования, контроля, регистрации и поддержания технологических параметров рекультивации. Эффективность деградации экотоксикантов оценивали методом капиллярной газовой хроматомасс-спектрометрии с масс-селективным детектированием. Показана высокая нефтедеструктирующая активность микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата, использующих углеводороды нефти в качестве источника углерода и энергии. В ходе аналитического определения содержания глифосата в почве было установлено, что при его исходном содержании 53,6 мг/кг к 12 суткам эксперимента количество экотоксиканта снизилось до уровня 0,15 мг/кг, что ниже исходного содержания в 357 раз и меньше ПДК (0,5 мг/кг). Результаты выполненных исследований свидетельствуют о возможности практического использования деградативного потенциала биопрепарата – деструктора в ходе осуществления мероприятий по биоремедиации почвы и очистке ее от экотоксикантов.

The object of the study is a biological preparation – destructor of organophosphorus compounds, oil and oil products, created on the basis of the two bacterial strains of *Pseudomonas fluorescens* EC-5-93 and *Pseudomonas putida* EC-8-14. The biopreparation is designed for soil remediation at the industrial site and adjacent territory of the object for destruction of chemical weapons «Maradykovsky». The bacteria of both strains are non-pathogenic, biocompatible, ecologically safe, stable on the grounds of biodegradation of ecotoxicants, unpretentious for nutritional needs, technological, do not persist in the environment in the absence of a substrate for degradation. The technology of production of the biopreparation is designed. Ready to use freeze-dried biological preparation is a porous mass of light-yellow color without inclusions.

The aim of the study is to expand the range of degradative potential of the biopreparation due to the additional introduction into its structure of the bacterial strain *Pseudomonas putida* EC-8-14 – effective destructor of oil pollutants of soil. The activity to oil degradation of the biopreparation obtained according to the technology developed has been investigated in experiments *in vitro* by culturing the microorganisms included in the biopreparation in mineral medium with oil. Simulation of natural conditions of soil remediation and the study of the ability of the biopreparation to degradation of glyphosate was carried out on a test stand with systems for air-conditioning, monitoring, recording and maintenance of technological parameters of recultivation. Efficiency of ecotoxicants degradation was assessed by CG-СM spectrometry with mass-selective detection. The high activity of the microorganisms included in the biopreparation, to degradation of petroleum hydrocarbons and ecotoxicants is shown. During the analytical determination of glyphosate in soil it was found that when the initial content of glyphosate was 53.6 mg/kg, to 12 days of experiment the amount of ecotoxicants decreased to the level of 0.15 mg/kg, which is lower than the initial content in 357 times and the MPC (0.5 mg/kg).

The results of the study indicate the possibility of the practical use of the biopreparation-destructor degradative potential in the course of bioremediation of soil and cleaning it from toxicants.

Ключевые слова: ремедиация, экотоксикант, фосфорорганические соединения, нефть, микроорганизмы, биодеструкция.

Keywords: remediation, ecotoxicants, organophosphorus compounds, oil, bacteria, biodegradation.

Введение

Негативное антропогенное воздействие на почву является одной из острейших проблем современного общества [1, 2]. Непрерывный рост антропогенных нагрузок на окружающую среду в целом, и на почву в частности, идёт параллельно с ростом производства и потребления. Обратной стороной цивилизации является загрязнение и деградация почвы, рассматриваемые как устойчивое негативное изменение состава, строения и свойства почвы, включая частичное или полное её разрушение в результате хозяйственной или иной деятельности, а также воздействия различных факторов природного и техногенного характера, приводящие к ухудшению или утрате способности почвы выполнять свои функции [1, 3].

Наряду с потенциальными экотоксикантами, подлежащими санации после прекращения деятельности объекта уничтожения химического оружия (УХО) «Марадыковский», такими как фосфорорганические соединения, деструкции подлежат нефть и нефтепродукты [2, 3]. Их совместное длительное нахождение в почве может вызвать крайнюю степень деградации – уничтожение почвенного покрова, являющегося важнейшим сорбционно – химическим барьером на пути миграции экотоксикантов из атмосферы в грунтовые воды и реки [2, 4].

Для преодоления негативного антропогенного воздействия на почво-грунты и экосистемы антропогенных ландшафтов используют технологию рекультивации [5]. Рекультивация земель – это комплекс инженерных и санитарно – гигиенических мероприятий, предусматривающих улучшение (восстановление) свойств грунтов в целях исключения физического и химического негативного воздействия на окружающую природную среду [3, 5, 6]. В процессе восстановления исходного состояния земельных участков, загрязнённых экотоксикантами, необходимо осуществлять мероприятия по охране окружающей среды: ускорить деградацию экотоксикантов, ликвидировать засоленность и солонцева-

тость почв, а также осуществить ряд других мероприятий. Сам же процесс рекультивации земель и грунтов предполагает удаление экотоксикантов из состава почвы и собственно рекультивацию, включающую технический и биологический этапы. Технический этап рекультивации – это проведение работ, создающих необходимые условия для дальнейшего использования рекультивированных земель по целевому назначению или для проведения мероприятий по восстановлению плодородия почв. Таким образом, меры технической рекультивации направлены на ускорение процессов физического очищения почвы.

Биологический этап включает комплекс агротехнических и фитомелиоративных мероприятий, направленных на улучшение агрофизических, агрохимических, биохимических и других свойств почвы [5–7]. По существу, биорекультивация – это оптимизация физико-химических и биологических факторов очищения почвы. Сам же этап биорекультивации выполняется после завершения технического этапа и заключается в подготовке почвы, внесении удобрений и биопрепаратов, подборе трав и травосмесей, посевах и уходе за посевами, что обеспечивает закрепление поверхностного слоя почвы корневой системой растений, создание сомкнутого травостоя и предотвращает развитие водной и ветровой эрозии почвы на нарушенных землях. Таким образом, биопрепараты, содержащие микроорганизмы – деструкторы загрязняющих почву соединений, являются составной частью биологической рекультивации, которая призвана ускорить процесс разрушения экотоксикантов в почве [6–8].

В настоящее время ведутся исследования по разработке экологически приемлемых, экономически оправданных, эффективных технологий рекультивации почв как на территориях объектов УХО, так и на территориях, расположенных в непосредственной близости от таких объектов [2, 8]. Основу предлагаемых адаптивных технологий составляют микробные биотехнологии, использующие высокий

деградативный потенциал микроорганизмов – деструкторов экотоксикантов. Так, для осуществления реабилитационных мероприятий на промплощадке объекта УХО «Марадыковский» после его перепрофилирования для рекультивации почвы создан биопрепарат – деструктор фосфоорганических соединений (ФОС) на основе природного штамма биодеструктора *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93. Штамм экологически безопасен, непатогенный, проявляет в присутствии органических кислот С-Р – лиазную активность [9], способен к накоплению биомассы в процессе культивирования и обладает рядом положительных эксплуатационных характеристик, обуславливающих возможность его использования при переработке остаточных количеств реакционных масс, образующихся в процессе утилизации ФОС.

С учётом того, что рекультивируемые земли и прилегающая к ним территория объекта УХО «Марадыковский» после завершения всего комплекса работ должны представлять собой оптимально организованный и сбалансированный ландшафт [5–7], представляется целесообразным расширить деградативный потенциал существующего биопрепарата – деструктора ФОС, введя в его основу бактериальный штамм, активно деградирующий нефтезагрязнения в почве.

Материалы и методы

В работе использовали культуру бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93, выделенную из биопрепарата-деструктора ФОС. Микроорганизмы, утилизирующие углеводороды нефти, выделены методом накопительных культур из мест естественной адаптации к нефтепродуктам. Отбор культуры, перспективной для дальнейшего использования, осуществляли по способности утилизировать углеводороды нефти и расти на специальной глюкозо-минеральной среде с нефтью [10].

Идентификация перспективного для включения в состав биопрепарата штамма нефтедеструктора произведена специалистами ФГУП ГосНИИ Генетика на основании анализа первичной нуклеотидной последовательности генов 16S рибосомальной РНК.

Изучение биосовместимости микроорганизмов деструкторов нефти и ФОС проведено методом попарного культивирования бульонных культур на плотной питательной среде, предложенной Н. А. Глушановой и Б. А. Шендеровым [11].

Процесс лиофильного высушивания культур микроорганизмов-деструкторов проводили на установке TG-6 (Германия) по технологическому режиму: температура сублиматора – 40°C; длительность сублимационного периода 6 ч; максимальная температура досушивания +25°C; разрежение в системе от 200 до 100 мкм; продолжительность высушивания 24 ч [12].

Культивирование этих бактерий проводили на агаре Хоттингера. Концентрацию живых микробов в суспензиях оценивали методом посева серийных десятикратных разведений на плотную питательную среду в чашках Петри с последующим подсчётом выросших колоний. Общую концентрацию бактерий в культурах и суспензиях определяли по стандарту мутности ГИСК им Л.А. Тарасевича (ОСО 43-28-29-86П).

Изучение нефтедеструктирующей активности биопрепарата проводили в опытах *in vitro*, выращивая микроорганизмы биопрепарата в глюкозо-минеральной среде с нефтью при шуттелировании.

Для количественного определения нефти в образцах использовали метод капиллярной газовой хроматомасс – спектрометрии, сочетающей в себе газовую хроматографию и масс – спектрометрию. Исследования проводили на газовом хроматомасс – спектрометре GCMS – QP2010 Plus («Shimadzu», Япония) с масс – фильтром квадрупольного типа. Последующую обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения GCMS Solution 2.5, укомплектованного универсальной библиотекой масс – спектров 250 000 органических соединений NIST 05. Для количественного определения анализируемого компонента применяли метод внешнего стандарта. Расчет проводили по площадям пиков.

Моделирование натуральных условий процесса биорекультивации почвы проводили на испытательном стенде, оборудованном системами поддержания и контроля технологических параметров ведения процесса [13]. Эффективность деградации глифосата в составе гербицида «Раундап» в почве исследовали с использованием ВЖХ-МС на приборе Prominense с масс-селективным детектором LCMS-2010 («Shimadzu» Япония) и колонкой Luna C18 («Phenomenax», США). Расчётное содержание глифосата в почве составило 50 мг/кг.

Статистическую обработку результатов экспериментов выполняли по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [13].

Результаты

Разработанная специалистами НИЦ ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России технология производства экологически безопасного стандартизованного препарата-деструктора ФОС на основе бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 обеспечивает высокую жизнеспособность бактерий, находящихся в лиофильно высушенном состоянии [12]. Под данную технологию необходимо было адаптировать культуру нового штамма бактерий, активно утилизирующих углеводороды нефти и биосовместимых с бактериями, на основе которых создан биопрепарат.

Из большого количества первичных изолятов микробных культур, выделенных из образцов почв Кировской области, загрязняемых в течение длительного времени сырой нефтью и нефтепродуктами, для последующего изучения были отобраны 6 культур, которые на среде с нефтью были способны утилизировать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода. Одна из исследуемых культур, кроме способности к интенсивному росту на среде с нефтью, характеризовалась ускоренным ростом на агаре Хоттингера на уровне 170–180 млрд. микробных клеток в 1 мл. Именно эта культура была исследована в ФГУП ГосНИИГенетики как *Pseudomonas putida* (наш коллекционный номер штамма *P. putida* ЕК-8-14). Деструкция сырой нефти в жидкой среде при исходной концентрации 15 г/л составляет 26,8% через 14 суток при температуре 27–29°C, а в почве при тех же условиях – 35,3% за тот же период. Биодеструкция нефтепродуктов (дизельное топливо, керосин) в почве составила 35,8% соответственно.

Культурально-морфологические признаки. При росте на агаре Хоттингера через 48 часов роста бактерии формируют колонии округлые, выпуклые, блестящие, прозрачные с ровными краями, диаметром 2,5–3 мм. На агаре Эндо – колонии бледно – розовые, что свидетельствует об отсутствии у бактерий способности ферментировать лактозу. В бульоне Хоттингера рост бактерий в виде равномерного помутнения со слизистым осадком. Окраска бактерий по Граму отрицательная.

Физиолого-биохимические признаки. Штамм *P. putida* ЕК-8-14 является аэробным. Температурный оптимум 27–29°C. В качестве источника углерода потребляет глюкозу, не использует сахарозу. Прототроф, в дополнительных факторах роста не нуждается. Аэробный и анаэробный тест Хью – Лейфсона отрица-

тельный. Обладает оксидазной и каталазной активностью, пигмент не образует, желатин не разжижает, крахмал не гидролизует. Штамм не обладает патогенностью, токсичностью, не способен к диссеминации во внутренние органы подопытных животных. Штамм обладает биодеструктивной активностью в отношении С–С связей нефти и нефтепродуктов, используя образующиеся при расщеплении углеродсодержащие фрагменты для роста микробных клеток.

Результаты оценки биосовместимости бактерий штамма *P. putida* ЕК-8-14 с бактериями *P. fluorescens* ЕК – 5-93, составляющими основу биопрепарата-деструктора ФОС, свидетельствуют об их биосовместимости (отсутствии антагонизма) и возможности включения штамма *P. putida* ЕК-8-14 в состав биоагентов, на основе которых целесообразно создавать новый биопрепарат с расширенным спектром деструктивной активности в отношении ФОС и нефти (нефтепродуктов), с перспективой использования для рекультивации загрязнённой почвы. Выявленная биосовместимость микроорганизмов деструкторов *P. fluorescens* ЕК – 5 – 93 и *P. putida* ЕК-8-14 предполагает проведение следующего этапа – пилотных испытаний, связанных с определением значений показателей деструкции нефти (нефтепродуктов). В предварительных опытах было показано, что в клетках обоих штаммов присутствует крупная плазида с молекулярной массой порядка 60–65 МДа. С большой долей вероятности можно предполагать, что эта плазида несёт гены биодegradации экотоксикантов. Действительно, посев бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 на плотную питательную среду с нефтью позволил установить их способность к разложению углеводородов нефти и утилизации в качестве единственного источника углерода для роста и размножения. Таким образом, биосовместимые микроорганизмы *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14 в результате синергизма смогут более эффективно разлагать углеводороды нефти по одному из трёх путей: монотерминальному окислению метильной группы n-алкана, субтерминальному окислению, дитерминальному окислению или по смешанному типу [14, 15].

В экспериментах по изучению нефтедеструктирующей активности бактерий обоих штаммов посевные культуры бактерий штаммов вносили в жидкую минеральную среду с нефтью в колбах, на дне которых находилась стерильная агаризованная водная почвенная вытяжка, имитирующая в определённой мере

условия биодеструкции нефтепродуктов в почве. Культивирование микроорганизмов проводили при шуттелировании в течение 10 суток при температуре 28°C. По окончании эксперимента отбирали пробы для аналитического определения продуктов деградации нефти. Контролем в экспериментах служила минеральная среда с нефтью без добавления биопрепарата. В течение всего периода культивирования контрольная среда с нефтью оставалась прозрачной, нефть частично оседала на стенках колбы, но основная её часть

в виде «линзы» находилась на поверхности среды культивирования. Опытная среда с нефтью под воздействием размножающихся микроорганизмов на 3 сутки эксперимента потемнела, а на 5 сутки стала бурой из-за окраски высокомолекулярными компонентами нефти – асфальтенами. На рисунке приведены хроматограммы, а в таблицах 1 и 2 идентифицированы компоненты исходной и деструктированной нефти.

При сопоставлении площадей пиков, выявленных на хроматограммах, которые коли-

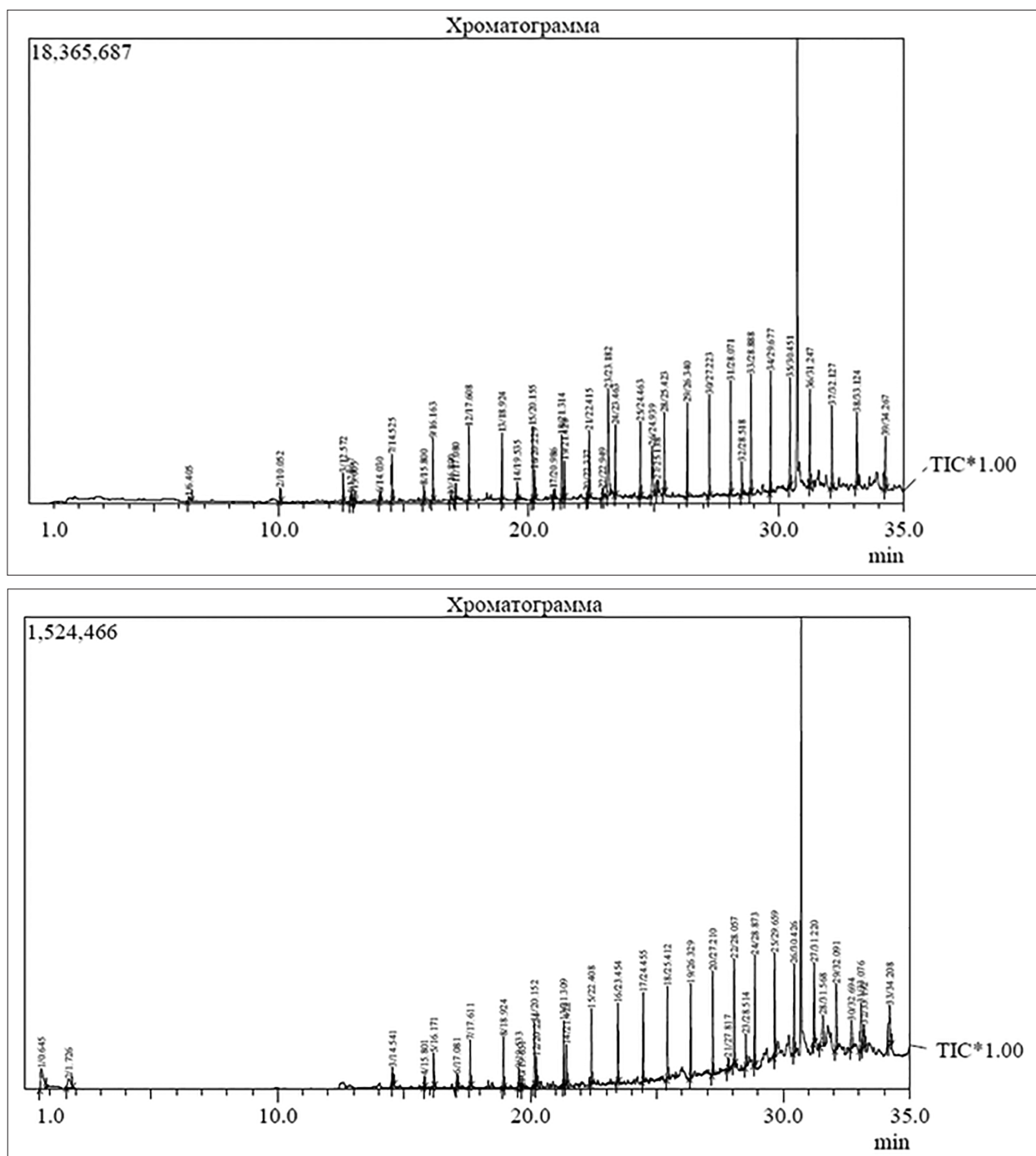


Рис. Хроматограммы определения состава исходной (1) и деструктированной (2) нефти.

ественно соответствуют идентифицированным компонентам исходной и деструктированной нефти (рисунок), можно говорить о том, что в результате воздействия микроорганизмов *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14, а также их ферментов, происходит деструкция нефти с потерей её нативности на 91,3%. Оставшиеся неизменёнными (нативными) 8,7% идентифицированных компонентов могут быть подвержены деструкции как специализированными микроорганизмами, так и почвенными микроорганизмами в случае, если процесс будет проходить в естественных природных условиях.

Из представленных результатов хроматомасс-спектрометрического анализа исследуемых образцов следует, что в исходной нефти идентифицировано 39 компонентов, а в деструктированной – 33. При этом в деструктированной нефти уменьшилось содержание компонентов, доля которых в общем количестве находится в диапазонах (0-1)%, (1-2)%, (4-6)%, (8-10)%, но в то же время возросла доля компонентов в диапазоне (2-4)% и (6-8)%. И если в образце нефти первым на хроматограмме появляется углеводород декан (C₁₀H₂₂) при времени выхода 6,405 мин, то в образце деструктированной нефти перед тем же углеводородом, появляющемся на хроматограмме на 14,541 мин, выявляются трихлорометан и метан (время выхода 0,645 мин), дихлоронитрометан (время выхода 1,726 мин).

Представленные в таблице 2 данные однозначно свидетельствуют о процессе деструкции нефти под влиянием ферментов микро-

организмов биопрепарата – деструктора: по сравнению с исходной нефтью в образце деструктированной нефти появились газообразные алканы (трихлорометан, дихлоронитрометан), снизилось содержание жидких фракций нефти (с 17 до 13), а также содержание фракций твёрдых парафинов (с 22 до 18). При этом следует отметить, что в образце деструктированной нефти появился циклопентан (C₂₅H₅₀), относящийся к нафтенам, доля которого среди алканов составляет 4,65%. Согласно полученным данным, можно говорить о том, что исследуемая нефть относится к классу метановой нефти, в которой преобладающими являются ненасыщенные углеводороды, а в процессе биодеструкции появляются циклические углеводороды (C_nH_{2n+2}), характерные для нафтенной нефти.

Начавшийся под воздействием ферментов микроорганизмов биопрепарата процесс деструкции нефти приводит к фрагментации нафтенных и, если процесс будет проходить непосредственно в почве, то в последующем он продолжится под воздействием ферментов деструкции почвенных микроорганизмов. Важно подчеркнуть, что микроорганизмы нефтедеструкторы синтезируют биосурфактанты, которые эмульгируют и солюбилизируют углеводороды, облегчая поступление фрагментированных нафтенных в микробные клетки для продолжения их деструкции. Указанная углеводородокисляющая активность микроорганизмов *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14 прогностически может обеспечить

Таблица 1

Идентифицированные компоненты исходной и деструктированной нефти и их относительное содержание в пробах

Содержание идентифицированных компонентов нефти в диапазоне, %	Исходная нефть (39 идентифицированных компонентов)	Деструктированная нефть (33 идентифицированных компонента)
0-1	12	4
1-2	6	4
2-4	12	17
4-6	8	6
6-8	0	2
8-10 и более	1	0

Таблица 2

Углеводороды ряда «алканы» в исходной и деструктированной нефти

Алканы	Содержание алканов в исходной нефти	Содержание алканов в деструктированной нефти
C ₁ -C ₄ – газообразные алканы (в виде растворённого газа)	0	2
C ₅ -C ₁₆ – основная масса жидких фракций нефти	17	13
C ₁₇ -C ₃₃ – тяжёлые нефтяные фракции (твёрдые парафины)	22	18

снижение количества сырой нефти в почве на 80–90% от первоначального значения.

Характеристика биодеградативного потенциала биопрепарата была бы не полной без оценки глубины деструкции глифосата в почве при моделировании натуральных условий процесса биорекультивации на испытательном стенде, обеспечивающим поддержание необходимых технологических параметров процесса [9]. Результаты экспериментов представлены в таблице 3, из которых следует, что процесс деструкции глифосата бактериями, входящими в состав биопрепарата, наиболее интенсивно проходит в первые 3 суток: содержание экотоксиканта в почве уменьшилось в 3,7 раза. В дальнейшем происходит прогрессирующее снижение глифосата в почве и к 12 суткам наблюдения оно составляет 0,145 мг/кг, что меньше исходного количества в почве в 357 раз и меньше ПДК (0,5 мг/кг).

Обсуждение

Экспериментально установлено, что микроорганизмы, обитающие в определённом биоценозе, обладают принципиально сходными потребностями в источниках энергии и питания [16]. Это в полной мере относится к почве, заселённой многочисленными видами микроорганизмов, каждый из которых адаптируется как к различным органическим и неорганическим субстратам, так и к окружающим микроорганизмам. Подобная адаптация может привести к приобретению особых метаболических свойств, наделяющих их обладателей уникальной способностью занимать специфические ниши. Такой своеобразной специфической нишей является почва, содержащая остаточные количества ФОС и нефтепродуктов. В подобных условиях почвенные микроорганизмы не могут развиваться в течение длительного периода до тех пор, пока в их популяциях не возникнут мутанты, способные к деградации находящихся в почве экотоксикантов. Процесс возникновения в результате естественного отбора спонтанных мутантов, утилизирующих экотоксиканты, довольно длительный, требующий определённых

условий и факторов. В то же время для проведения биологического этапа рекультивации почвы необходим биопрепарат, содержащий специализированные микроорганизмы, при интродукции которых в составе биопрепарата возможна быстрая инициация деструкции экотоксикантов. При этом важно иметь в виду то, что подбор специализированных микроорганизмов в качестве основы создания биопрепарата осуществляется не только на основе экспериментально доказанной их способности к биодеградации экотоксикантов, а также других важных эксплуатационных характеристик, но и на основе изучения их биосовместимости друг с другом и с почвенными микроорганизмами. Как показано настоящими исследованиями, микроорганизмы *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14, входящие в состав биопрепарата, являются биосовместимыми. Они же, выделенные из почвы, биосовместимы с почвенными микроорганизмами, но обладают экологическим преимуществом перед последними в условиях загрязнённой экотоксикантами почвы, поскольку специфически адаптированы к их утилизации в качестве источников энергии и питания. По мере снижения содержания экотоксикантов в почве численность интродуцированных микроорганизмов будет уменьшаться в результате конкурентной борьбы с аборигенными почвенными микроорганизмами в соответствии с одним из основных экологических законов, сформулированных Г.Ф. Хильми [17], согласно которому (применительно к микробному сообществу) ограниченная популяция, существующая в среде с иным уровнем организации, постепенно теряет свою структуру и как бы растворяется в данной среде. Указанное обстоятельство имеет существенное значение при оценке экологической безопасности интродуцируемых микроорганизмов *P. fluorescens* ЕК-5 – 93 и *P. putida* ЕК-8-14, как и то, что плазмиды, гены которых детерминируют синтез ферментов деградации экотоксикантов, относятся к классу нетрансмиссивных плазмид и не могут быть переданы в результате конъюгации в почвенные микроорганизмы.

Таблица 3
Динамика содержания глифосата в почве в процессе биорекультивации ($\bar{x} \pm I_{95}$, мг/кг, n=10)

Исследуемая почва	Содержание глифосата в пробе почвы, мг/кг				
	сутки эксперимента				
	1	3	6	9	12
Дерново-подзолистая	56,4±4,1	45,5±3,2	42,3±2,9	37,7±2,1	36,9±1,8
Дерново-подзолистая с внесением биопрепарата	53,6± 3,9	14,6±1,8	5,1±0,7	3,0±0,2	0,15±0,03

На основании результатов оценки безопасности бактерий штаммов *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14, а также результатов комплексного изучения биологических свойств штаммов, в частности апатогенности, стабильности свойств биодеструкции ФОС и нефти (нефтепродуктов), технологичности, неприхотливости по питательным потребностям, невозможности длительно персистировать в объектах окружающей среды при отсутствии субстрата для деструкции стало возможным конструирование биопрепарата – деструктора с расширенным спектром биодеструктивной активности, предназначенного для рекультивации загрязненных почво-грунтов объекта УХО «Марадыковский». Приготовление биопрепарата осуществлено по разработанной аппаратурно – технологической схеме от посевной культуры до полуфабриката. На заключительном этапе процесса приготовления сухого биопрепарата жидкий его полуфабрикат замораживали во флаконах до температуры минус 30–40°C со скоростью 5–8°C мин⁻¹ в течение 30 мин. непосредственно в сублиматоре сушильной установки. Лиофильное обезвоживание биопрепарата осуществляли по следующему режиму: температура замораживания минус 40°C; длительность сублимационного периода 6 часов; максимальная температура досушивания (25–28)°C; разрежение в системе 100–200 мкн; продолжительность цикла 20–24 часа. Готовый к применению биопрепарат представляет собой пористую массу светло-жёлтого цвета без посторонних включений. Изучение регидратированного биопрепарата и свойств входящих в его состав микроорганизмов деструкторов по основным биологическим, культурально-морфологическим и биохимическим показателям позволило сделать заключение об их соответствии по изученным показателям эталонным микробным культурам, а также о сохранении свойств в течение всего периода хранения.

Заключение

Современная стратегия очистки почв от экотоксикантов с использованием биологических подходов основывается, с одной стороны, на стимуляции естественной (аборигенной) микрофлоры, а с другой, – на интродукции специализированных штаммов бактерий в составе биопрепарата, обладающих способностью к деградации экотоксикантов. Микроорганизмы, входящие в состав биопрепарата – деструктора экотоксикантов, который

применяется в ходе биологического этапа рекультивации, совместно с микроорганизмами аборигенной почвенной микрофлоры образуют трофические цепи и постадийно участвуют в процессе биодеструкции загрязнений почвы. Наследственно закреплённая способность к биодеструкции экотоксикантов, детерминруемая соответствующими плазмидными генами, входящими в состав генома специализированных микроорганизмов *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14, делают их ведущими в инициации процесса биодеструкции как природных, так и ксенобиотических фосфонатов, а также нефти и нефтепродуктов, находящихся в почве. Физиологическая и биохимическая активность микроорганизмов *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-14 явились основой разработки технологии производства экологически безопасного биопрепарата с расширенным спектром биодеградативного потенциала, перспективного для использования при рекультивации почвы на промплощадке объекта УХО «Марадыковский».

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № ЦР107/2085/У307К.

Литература

1. Лисичкин В.А., Шелепин Л.А., Боев Б.В. Закат цивилизации или движение к ноосфере (экология с разных сторон). М: ИЦ – Гарант, 1997. 352с.
2. Шаров С.А., Ашихмина Т.Я. Адаптация микробных биотехнологий ремедиации почв к реальным объектам санации // Теоретическая и прикладная экология. 2014. №4. С. 60 – 62
3. Ганеев И.Г., Кулагин А.А. Ремедиация и рекультивация техногенно деградированных земель // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. №6 (100). С. 554 –557.
4. Приваленко В.В., Безуглова О.С. Экологические проблемы антропогенных ландшафтов Ростовской области. Ростов н/Дон: Изд-во СКНЦ ВШ, 2003. 288 с.
5. ГОСТ 17.5.3.05 – 84. Охрана природы. Рекультивация земель. Общие требования к землеванию. Введ. 1985 – 01.01. Статус: действующий. Переиздание. Дата последнего изменения 16.01.2015. М.: ИПК Издательство стандартов, 2015.
6. ГОСТ 17.5.3.04 – 83 (с изменением №1). Охрана природы. Земли. Общие требования к рекультивации земель. Введ. 1984-01.01. Статус: действующий. Переиздание. Дата последнего изменения – сентябрь 1986. М.: ИПК Издательство стандартов, 2002.
7. ГОСТ 17.5.3.06 – 85. Охрана природы. Земли. Требования к определению норм снятия природного слоя почвы при производстве земляных работ. Введ. 1986

– 01.07. Статус: действующий. Переиздание. Дата последнего изменения 16.01.2015. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2015.

8. Турковская О.В., Игнатов В.В. Роль микробиологии в разработке приемов рекультивации нефтезагрязненных почв // Фундаментальные и прикладные исследования саратовских ученых для процветания России и Саратовской губернии: Материалы научной конференции, посвященной 225 – летию РАН. Саратов: Изд-во Саратовского государственного университета, 1999. С. 276–278.

9. Стяжкин К.К., Туманов, А.С., Ашихмина Т.Я., Колесников Д.П., Тетерин В.В., Погорельский И.П., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Зиганшин А.Р. Экспериментальная оценка микробицидного и деградативного потенциала биопрепарата деструктора фосфоорганических соединений // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 51–59.

10. Патент № 2390555 Российская Федерация. Питательная среда для выращивания углеводородокисляющей бактерий с повышенной деструктивной способностью / Погорельский И.П., Дробков В.И., Зиганшин Р.Ш.; заявитель и патентообладатель ФГУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. – № 2008141195/13; заявл. 16.10.2008; опубл. 27.05.2010.

11. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* // Журнал микробиологии. 2005. №2. С. 56–61.

12. Стяжкин К.К., Петров С.В., Туманов А.С., Завьялова Н.В., Воробьев К.А., Тетерин В.В., Погорельский И.П., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Менухова В.С. Биопрепарат для ремедиации почвы в пределах зоны защитных мероприятий объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2013. №4. С. 41–48.

13. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 280 с.

14. Зайцева Т.А. Рудакова Л.В., Комбарова М.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти // Научные исследования и инновации. 2010. №4. С. 59–63.

15. Тимергазина И.Ф. Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. Т. 7. № 1. С. 5 – 31.

16. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. М.: Изд-во МГУ, 1989. 175 с.

17. Хильми Г.Ф. Основы биофизики биосферы. Л.: Гидрометеоиздат, 1966. 272 с.