

# БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКУЛЬТИВАЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПОЧВЫ В МЕСТАХ ПОСТОЯННОЙ ДИСЛОКАЦИИ ВОЙСК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА НЕФТЕДЕСТРУКТОРА НА ОСНОВЕ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ

И.П. Погорельский, А.А. Лещенко, А.Г. Лазыкин, К.И. Гурин,  
В.В. Тетерин, Д.А. Шаров

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения  
«48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации (г.Киров), 610000,  
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 17.07.2018 г. Принята к публикации 15.10.2018 г.

Объект изучения – деструктор экотоксикантов на основе штаммов бактерий *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas delhiensis* и ассоциации клубеньковых бактерий *Rhizobium loti* с бобовым растением Лядвенцом рогатым (*Lotus corniculatus*). Установлено, что при совместном использовании бактерий и бобового растения Лядвенца рогатого увеличивается скорость окисления углеводородов нефти по сравнению со скоростью деградации загрязнителя при интродукции каждого бактериального штамма отдельно примерно в три раза. Полученный нами препарат-деструктор представляет собой сухую неоднородную массу, состоящую из жизнеспособных микробных клеток штаммов *P. delhiensis* и *R. lotus* в соотношении 1:1 в количестве не менее 4 млрд ж.м.к. на 1 г носителя, являющегося семенами бобового растения Лядвенца рогатого, объединенную с делигнифицированным древесным опилом (соотношение семян Лядвенца рогатого и бактериальных ассоциантов с делигнифицированным древесным опилом 1:1). Нефтедеструктирующая активность препарата установлена в условиях микрополевых испытаний. Деградация экотоксикантов доказана методом капиллярной газовой хромато-масс-спектрометрии с масс-селективным детектированием. Бактерии штаммов, входящих в его состав, непатогенны для человека и животных, биосовместимы, экологически безопасны, стабильны по признаку биодеструкции экотоксикантов, неприхотливы по питательным потребностям, технологичны, не персистируют в объектах окружающей среды при отсутствии субстрата для деструкции. Разработана технология производства препарата. Результаты представленных исследований свидетельствуют о возможности практического использования деградативного потенциала препарата в ходе осуществления мероприятий по рекультивации почвы, очистке от экотоксикантов и восстановлению ее экологического статуса.

**Ключевые слова:** биодеструкция; клубеньковые бактерии; Лядвенец рогатый; микробно-растительная ассоциация; микроорганизмы; нефтепродукты; нефть; рекультивация; экологическая биотехнология; экотоксикант.

**Библиографическое описание:** Погорельский И.П., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Гурин К.И., Тетерин В.В., Шаров Д.А. Биотехнология рекультивации и восстановления экологического статуса почвы в местах постоянной дислокации войск с использованием препарата нефтедеструктора на основе микробно-растительной ассоциации // Вестник войск РХБ защиты. 2018. Т. 2, № 4. С. 44–56.

Развитие техносферы создало в биосфере множество количественных и качественных изменений, вызвавших «лавинообразные» процессы ухудшения среды обитания человека [1]. В ней скапливаются химические соединения, с которыми живой организм в ходе эволюции не сталкивался и поэтому не имеет соответствующих аналитических систем, сигнализирующих об их наличии. В этой связи чрезвычайно актуальным является сбор данных о загрязнениях окружающей среды и источниках их поступления с целью регламентации допустимых уровней загрязнения и принятия адекватных мер для ликвидации загрязнений и минимизации последствий для окружающей среды.

Нефтедобывающая промышленность является одной из важнейших отраслей хозяйственной деятельности в Российской Федерации. В 2017 г. добыча нефти составила 546,8 млн т, при этом объем утечек достигает 15–20 млн т в год. Более 75% состава нефти приходится на углеводороды, остальную часть составляют их производные, в которых содержится сера, азот и кислород. Доля Вооруженных Сил в выбросах загрязняющих веществ в атмосферный воздух и в загрязнении территорий в различных регионах России не столь велика по сравнению с промышленным комплексом страны. Тем не менее, военные объекты представляют потенциальную опасность для благополучия регионально-локальных и даже глобальных систем жизнеобеспечения на обширных территориях страны. В целом проблема обращения с отходами производства и потребления считается одной из наиболее актуальных и трудно решаемых экологических проблем не только в России, но и во всем мире. Решение этой проблемы также является одной из существенных задач, стоящих перед Вооруженными Силами России [2, 3].

Нарушение экологического статуса территорий в пунктах дислокации военных объектов и районах действий подразделений и частей Российской Армии происходит как в ходе их повседневной деятельности, так и при возникновении аварийных и чрезвычайных ситуаций. Нефтезагрязнения окружающей природной среды возникают на территориях баз и складов горючего, аэродромов, парков автомобилей и иной техники, площадках ремонтного фонда, котельных, работающих на мазутном топливе, на полигонах, где происходит массовое сосредоточение вооружения и военной техники, работающей с использованием горюче-смазочных материалов, а также в местах базирования сил флота и флотилии [2, 3] (рисунок 1)<sup>1</sup>.



Рисунок 1 – Участок нефтезагрязненной почвы

К числу наиболее перспективных технологий обезвреживания отходов мировая практика относит биотехнологию – науку, которая, применяя знания в области микробиологии, биохимии, генной инженерии, приборо- и машиностроения, использует биологические объекты (микроорганизмы различных биологических видов) для производства препаратов деструкторов, способных разлагать обширный спектр экотоксикантов, в том числе углеводородные соединения, а также очищать природные объекты (почвы, воды) от нефти и нефтепродуктов. Их совместное в течение длительного периода времени нахождение в почве может вызвать уничтожение почвенного покрова, являющегося важнейшим сорбционно-химическим барьером на пути миграции экотоксикантов из атмосферы в грунтовые воды и реки [4, 5]. Несмотря на предостережения экологов о деградации локальных экосистем под воздействием нефтезагрязнений, выдвинуты предложения о ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов на суше путем сжигания [6], что, вне всякого сомнения, приведет к экологической катастрофе.

Для преодоления негативного антропогенного воздействия на почво-грунты и экосистемы антропогенных ландшафтов используют технологию рекультивации [5, 7]. Рекультивация земель – это комплекс инженерных и санитарно-гигиенических мероприятий, предусматривающих улучшение (восстановление) свойств грунтов в целях исключения физического и химического

<sup>1</sup> Техника для рекультивации почвы. URL: [https://www.google.ru/search?newwindow=1&rlz=1C1GGRV\\_enRU783\\_RU783&ei](https://www.google.ru/search?newwindow=1&rlz=1C1GGRV_enRU783_RU783&ei) (дата обращения: 01.07.2018).

негативного воздействия на окружающую природную среду<sup>2,3,4</sup> [7].

В соответствии с общими требованиями к рекультивации земель<sup>5</sup>, в процессе восстановления исходного экологически приемлемого состояния земельных участков, загрязненных экотоксикантами, необходимо осуществлять мероприятия по охране окружающей среды: ускорить деградацию экотоксикантантов, ликвидировать засоленность и солонцеватость 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 с привлечением специальной техники, создающих необходимые условия для последующего использования рекультивированных земель по целевому назначению или для проведения мероприятий по восстановлению плодородия почв<sup>6,7</sup> (рисунок 2).

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<sup>8,9,10</sup>. По существу, рекультивация – это оптимизация физико-химических и биологических факторов очищения почвы. Этап рекультивации выполняется после завершения технического этапа и заключается в подготовке почвы, внесении удобрений и препаратов, подборе трав и травосмесей, посеве 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, препараты, содержащие ми-



Рисунок 2 – Образцы техники, используемой при рекультивации почвы

кроорганизмы-деструкторы загрязняющих почву соединений, являются естественной составной частью биологической рекультивации,

<sup>2</sup> ГОСТ 17.5.3.05–84. Охрана природы. Рекультивация земель. Общие требования к землеванию. М.: ИПК Издательство стандартов, 2015.

<sup>3</sup> ГОСТ 17.5.3.04–83 (с изменением № 1). Охрана природы. Земли. Общие требования к рекультивации земель. М.: ИПК Издательство стандартов, 2002.

<sup>4</sup> ГОСТ 17.5.3.06–85. Охрана природы. Земли. Требования к определению норм снятия природного слоя почвы при производстве земляных работ. М.: ИПК Издательство стандартов, 2015.

<sup>5</sup> ГОСТ 17.5.3.05–84.

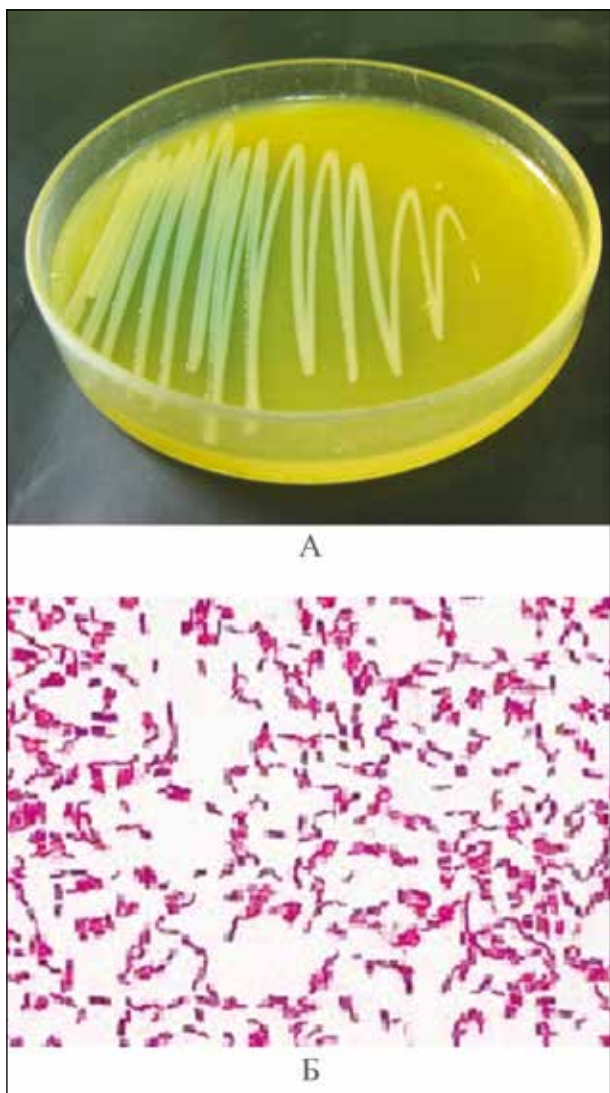
<sup>6</sup> Техника для рекультивации почвы. URL: [https://www.google.ru/search?newwindow=1&rlz=1C1GGRV\\_enRU783RU783&ei](https://www.google.ru/search?newwindow=1&rlz=1C1GGRV_enRU783RU783&ei).

<sup>7</sup> ГОСТ 17.5.3.06–85.

<sup>8</sup> ГОСТ 17.5.3.05–84.

<sup>9</sup> ГОСТ 17.5.3.04–83.

<sup>10</sup> ГОСТ 17.5.3.06–85.



**Рисунок 3 – Растущая культура и фиксированные бактериальные клетки бактерий *P. fluorescens* (А – Рост бактерий *P. fluorescens* на плотной питательной среде; Б – Микроскопия окрашенных по Граму бактерий *P. fluorescens*)**

которая призвана ускорить процесс разрушения экотоксикантов в почве<sup>11,12</sup> [8].

В настоящее время продолжают исследования по разработке научно обоснованных, экономически оправданных, эффективных технологий, в том числе биотехнологий, рекультивации и санации почв, восстановление их экологического статуса. Однако, как это явствует из опубликованных данных по результатам экспериментальных исследований [9], не существует универсального вида микроорганизмов, способного осуществить деградацию всех экотоксикантов и их компонентов. Поэтому в со-



**Рисунок 4 – Схема рекультивации нефтезагрязненной почвы [10]**

став препаратов, предназначенных для рекультивации почвы, необходимо включать несколько видов микроорганизмов-деструкторов, принадлежащих различным таксономическим группам. В выполненных ранее исследованиях [10] было установлено, что биотехнология препарата деструктора нефти и нефтепродуктов должна базироваться на использовании бактерий с высокой ферментативной активностью. Интродукция специализированных штаммов деструкторов *P. fluorescens* и *P. putida* в составе препарата в нефтезагрязненную почву обеспечивает, с одной стороны, деградацию экотоксикантов в почве, а с другой стороны – стимуляцию естественной (аборигенной) микрофлоры [7].

Входящие в состав препарата микроорганизмы вместе с аборигенными почвенными микроорганизмами способны формировать устойчивые трофические цепи и поэтапно участвовать в процессе деградации экотоксикантов. Применение препарата на основе указанных выше микроорганизмов-деструкторов перспективно для рекультивации сильно загрязненной нефтью и нефтепродуктами почвы, верхний слой которой, согласно технической рекультивации по ГОСТ<sup>13</sup>, подлежит снятию и санации на специально оборудованных площадках с последующим его возвращением на место изъятия [10]. Схема рекультивации нефтезагрязнённой почвы со снятием верхнего слоя представлена на рисунке 4.

Кроме того, учитывая тот факт, что входящие в состав препарата бактерии *P. fluorescens* и *P. putida*, обладают С-Р-лиазной активностью и способны разлагать фосфорорганические соединения, сам препарат перспективен для использования наряду с биокатализаторами на основе микроорганизмов-деструкторов (или их консорциумов) и продуцируемых ими ферментов [11] для рекультивации земли промплощадки объекта уничтожения химического

<sup>11</sup> ГОСТ 17.5.3.04–83.

<sup>12</sup> ГОСТ 17.5.3.06–85.

<sup>13</sup> Там же.

оружия «Марадыковский» после его перепрофилирования.

Дальнейшее расширение возможностей биотехнологии рекультивации почвы связано с применением препарата, объединяющего микроорганизмы, которые обеспечивают био- и фиторекультивацию. В самой технологии фиторекультивации предпочтение отдают ассоциированным с растениями микроорганизмам. Именно микроорганизмы ризосферы растений играют ведущую роль в деградации экотоксикантов в процессе рекультивации. Общеизвестно, что в ризосфере растений присутствуют так называемые PGPR-бактерии (от англ. *plant growth promoting rhizobacteria*), оказывающие стимулирующее влияние на рост растений. В свою очередь растения способны активно противодействовать экотоксикантам посредством таких процессов, как конъюгация, экскреция экотоксикантов и последующая их деградация до клеточных метаболитов и углекислого газа [12]. В этой связи при разработке методов фиторекультивации представляется актуальным создать препарат на основе бактерий эффективных деструкторов экотоксикантов, способных к колонизации ассоциированных с ними растений. Такие штаммы бактерий, как *P. delhiensis* и *R. loti*, обладающие способностью формировать микробно-растительные ассоциации, были использованы нами в качестве биодополнения к уже разработанному препарату деструктору нефти и нефтепродуктов [10]. Объединение в препарате штаммов микроорганизмов эффективных деструкторов нефти и нефтепродуктов, а также семян бобовых растений, выступающих в качестве носителя специализированных природных клубеньковых бактерий, создает необходимые условия для стимулирования роста растений, защиты их от фитопатогенов и полноценной деградации экотоксикантов до полного восстановления исходного экологического состояния почвы.

Цель исследования – разработка новой формы двухкомпонентного биопрепарата с расширенным спектром деградативного потенциала на основе бактериальных штаммов *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. delhiensis* и ассоциации клубеньковых бактерий *R. loti* с бобовым растением Лядвенцом рогатым (*L. corniculatus*) и обоснование возможности его применения для рекультивации и санации нефтезагрязненной почвы.

#### Материалы и методы

В работе использовали коллекционные штаммы *P. fluorescens*, *P. putida*; штамм *P. delhiensis* выделен и идентифицирован в 2013 г., депонирован во Всероссийской коллекции [13]. Клубеньковые бактерии *R. lotus* и семена Лядвенца рогатого (*L. corniculatus*) семейства бобовых (*Fabaceae*) получены из ФГБНУ «Федеральный аграрный

научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого».

Культивирование бактерий *P. delhiensis* проводили на мясо-пептонном агаре и в жидкой питательной среде на основе кислотного гидролизата казеина и дрожжевого автолизата, а клубеньковых бактерий *R. lotus* – на маннитно-дрожжевом агаре.

Выращивание бактерий *P. delhiensis* глубинным способом проводили при температуре 28 °С в биореакторе «Биор-01» (Россия) в течение 24 ч, а бактерий *R. lotus* – в течение 48 ч.

Иммобилизацию микроорганизмов [14] осуществляли путем перемешивания смеси культур *P. delhiensis* и *R. lotus* с семенами растения – фиторемедианта Лядвенца рогатого (*L. corniculatus*) в защитной сахарозо-желатиновой среде. Смесь концентрата микроорганизмов с семенами Лядвенца рогатого в защитной сахарозо-желатиновой среде распределяли равномерным слоем на дне кювет, которые помещали для высушивания в микроволновую вакуумную сушильную установку типа «Grandtec». Сухую смесь концентрата микроорганизмов с семенами Лядвенца рогатого снимали шпателем со дна кювет, помещали в пакеты из полимерного материала, после чего объединяли с сорбентом – материалом естественного происхождения – древесным опилом [15], переносили в герметично закрытую стеклянную тару и хранили при температуре от 0 до 8 °С.

Делигнификацию опила лиственных пород деревьев осуществляли путем кипячения в течение 4 часов в 0,1 М растворе NaOH в соотношении: 50 г опила и 1,5 л раствора щелочи с последующим отмыванием дистиллированной водой до значения pH 6,0–7,0 [16].

Количественный учет иммобилизованных на носителе бактерий выполняли чашечным методом Коха, высевая суспензию регидратированного в 9 мл изотонического раствора хлорида натрия 1 г препарата на плотную питательную среду в чашках Петри с последующим подсчетом выросших колоний.

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

Моделирование натуральных условий рекультивации почвы проводили на испытательном

**Таблица 1 – Характеристика глубинных культур и микробных концентратов, предназначенных для использования в технологии приготовления препарата (X, n=3)**

Наименование микроорганизма	Содержание бактериальных клеток в ..., млрд ж.м.к./мл	
	глубинной культуре	микробном концентрате
<i>P. delhiensis</i>	14,90±2,2	48,30±1,3
<i>R. lotus</i>	13,70±2,5	44,31±1,2

стенде, оборудованном системами поддержания и контроля технологических параметров ведения процесса [10].

Статистическую обработку полученных результатов выполняли по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [17].

### Результаты и обсуждение

Стандартный биотехнологический процесс получения микробных культур, необходимых для создания препарата деструктора, включает пять основных стадий: подготовку питательной среды с заданными свойствами (рН, температура, концентрация питательных веществ и др.); получение посевного материала из чистой культуры бактериальных клеток; выращивание микроорганизмов в биореакторе; концентрирование; приготовление полуфабриката. Именно этот поэтапный биотехнологический процесс с успехом использован в биотехнологии препарата деструктора на основе штаммов *P. delhiensis* и *R. lotus* [10]. Готовый к применению лиофильно обезвоженный препарат представляет собой пористую массу светло-желтого цвета без посторонних включений. Биотехнологию препарата на основе новых микроорганизмов предстояло адаптировать к существующей аппаратно-технологической линии для получения нового препарата на основе микробно-растительной ассоциации. Культуры микроорганизмов *P. delhiensis* и *R. lotus* были получены при глубинном выращивании в жидкой питательной среде в биореакторе при оптимальных условиях с целью более высокого выхода биомассы. В дальнейшем для получения полуфабриката микробные клетки глубинных культур отделяли от питательной среды с помощью модульной ультра- и микрофльтрации системы «Сартокон-мини». В таблице 1 приведены данные, характеризующие глубинные культуры и микробные концентраты, предназначенные для дальнейшего использования в технологии препарата.

Как следует из представленных данных, глубинные культуры характеризуются высоким уровнем накопления микробной биомассы, а па-

раметры процесса концентрирования позволяют получить концентрат, пригодный для создания полуфабриката.

Следующим этапом исследований было определение формы (свободной или иммобилизованной) находящихся в препарате живых микробных клеток. Преимущество использования иммобилизованных клеток, в отличие от свободных, определяется рядом характеристик, таких как повышенная жизнеспособность клеток, устойчивость к действию неблагоприятных факторов внешней среды, высокая каталитическая активность иммобилизованных клеток и их ферментов, концентрация больших количеств биомассы и минимизация потери биомассы при внесении в окружающую среду, экономичность [14].

Для последующего формирования микробно-растительной ассоциации необходимо было выбрать оптимальный вариант носителя микроорганизмов. Свой выбор мы остановили на природных носителях, к которым следует отнести семена растений фиторемедиантов, являющихся важным элементом в процессах восстановления почвенного покрова, загрязненного в результате хозяйственной деятельности [18]. В предварительных исследованиях были изучены три варианта носителей на основе семян Лядвенца рогатого и опила лиственных пород деревьев с разным соотношением компонентов. Очень важно, что делигнифицированный древесный опил не обладает повышенной кислотностью, но при этом имеет сорбирующие свойства и высокую поглощательную способность, которые создают дополнительные оптимальные условия

**Таблица 2 – Варианты носителей, использованных для формирования микробно-растительной ассоциации**

Варианты носителей	Состав носителей	Внешний вид носителя
1	Семена Лядвенца рогатого	
2	Семена Лядвенца рогатого и делигнифицированный опил (соотношение 1:1)	
3	Семена Лядвенца рогатого и делигнифицированный опил (соотношение 4:1)	

для проращивания семян Лядвенца рогатого. Изученные варианты микробно-растительной ассоциации представлены в таблице 2.

Каждый из представленных вариантов носителей в последующих экспериментах использовали для иммобилизации на них подготовленной смеси клеток микроорганизмов *P. delhiensis* и *R. lotus* и последующего высушивания в защитной сахарозо-желатиновой среде в микроволновой вакуумной сушильной установке типа «Grandtec». По окончании высушивания препарата в бактериологической лаборатории определяли количество иммобилизованных микроорганизмов на носителе путем высева регидратированной в изотоническом растворе хлорида натрия 1 г концентрированной смеси суспензий бактериальных клеток деструктора экотоксикантов *P. delhiensis* и ризобий *R. lotus* на плотную питательную среду в чашках Петри с последующим подсчетом выросших колоний (рисунок 5).

Результаты подсчетов представлены в таблице 3.

На основании представленных результатов можно заключить, что, судя по экспериментальным данным, наибольшее количество жизнеспособных бактериальных клеток *R. lotus* и *P. delhiensis* выявлено в экспериментах с вариантами носителя № 2 и № 3. При этом наиболее предпочтительным оказался состав носителя под № 2: в 1 г препарата сконцентрировалось наибольшее количество микроорганизмов, играющих основную роль в процессе биоремедиации.

Таким образом, экспериментальный образец препарата на основе микробно-растительной ассоциации представляет собой сухую неоднородную массу, состоящую из жизнеспособных микробных клеток штаммов *P. delhiensis* и *R. lotus* в соотношении 1:1 в количестве не менее 4 млрд ж.м.к. на 1 г носителя, являющегося семенами бобового растения Лядвенца рогатого, объединенную с делигнифицированным древесным опилом (соотношение семян Лядвенца рогатого и бактериальных ассоциантов с делигнифицированным древесным опилом 1:1).

Для оценки эксплуатационной характеристики (деструкции нефти и нефтепродуктов)



Рисунок 5 – Определение количества иммобилизованных микроорганизмов на носителе

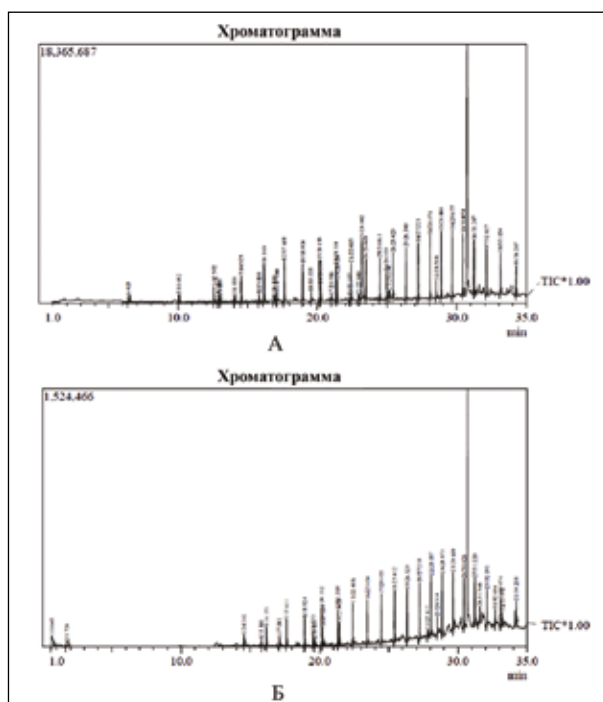


Рисунок 6 – Хроматограмма определения состава образцов контрольной (А) и деструктированной (Б) нефти

полученного образца препарата в условиях микрополевых испытаний он был объединен с

Таблица 3 – Характеристика выживаемости микроорганизмов, иммобилизованных на носителе (X, n=3)

Варианты носителей	Состав носителя	Содержание жизнеспособных клеток..., млрд ж.м.к./г	
		<i>P. delhiensis</i>	<i>R. lotus</i>
1	Семена Лядвенца рогатого	7,9±0,44	4,2±0,2
2	Семена Лядвенца рогатого : делигнифицированный опил (1:1)	19,43±1,8	8,73±0,5
3	Семена Лядвенца рогатого : делигнифицированный опил (4:1)	17,1±1,6	7,62±0,3

**Таблица 4 – Идентифицированные компоненты образцов контрольной и деструктированной нефти и их относительное содержание в пробах**

Содержание идентифицированных компонентов нефти в диапазоне ..., процент	Проба образца контрольной нефти (39 идентифицированных компонентов)	Проба образца деструктированной нефти (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 5 – Углеводороды ряда «алканы» в образцах контрольной и деструктированной нефти**

Алкан	Содержание алканов в образце контрольной нефти	Содержание алканов в образце деструктированной нефти
C1-C4 – газообразные алканы (в виде растворенного газа)	0	2
C5-C16 – основная масса жидких фракций нефти	17	13
C17-C53 – тяжелые нефтяные фракции (твердые парафины)	22	18

препаратом лиофилизированных бактерий двух штаммов *P. fluorescens* и *P. putida*, составляющих основу разработанного ранее биопрепарата [10]. Эксперименты были проведены с сырой нефтью, внесенной в почву (10–20 г на 1 кг почвы). После перемешивания нефти с почвой вносили двухкомпонентный препарат. В конце вегетационного периода отбирали образцы почвы (опытный и контрольный) и после соответствующей пробоподготовки их анализировали.

На рисунке 6 приведены хроматограммы, а в таблицах 4 и 5 идентифицированные компоненты исходной и деструктированной нефти.

Из представленных результатов хромато-масс-спектрометрического анализа (рисунок 6, таблица 4) 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)%. Если в образце нефти первым на хроматограмме появляется углеводород декан (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>) 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 5 данные однозначно свидетельствуют о процессе деструкции нефти под влиянием ферментов микроорганизмов двухкомпонентного препарата 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 фракции твердых парафинов (с 22 до 18). При этом следует отметить, что в образце деструктированной нефти появился циклопентан (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>), 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<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub>), характерные для нафтенной нефти.

Есть основание полагать, что начавшийся под воздействием ферментов микроорганизмов двухкомпонентного препарата процесс деградации нефти приводит к фрагментации нафтенных и в последующем он продолжается под воздействием ферментов деструкции почвенных микроорганизмов. Важно подчеркнуть, что микроорганизмы нефтедеструкторы синтезируют биосурфактанты, которые эмульгируют и солубилизируют углеводороды, облегчая поступление фрагментированных



нафтенов в микробные клетки для продолжения их деградации. Указанная углеводородоксилюющая активность микроорганизмов *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. delhiensis* обеспечивает практически полное снижение количества сырой нефти в почве. Усилению деструктирующей активности микроорганизмов *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. delhiensis* способствуют особенности биологического строения бобового растения Лядвенца рогатого, у которого корневая система стержневая, проникающая в почву до 2 м, с большим количеством крупных клубеньков и окружающих их клубеньковых бактерий.

Предложенный научно обоснованный подход реализован в технологии двухкомпонентного препарата, оба компонента которого хранятся при оптимальных условиях и объединяются в единый комплекс по запросу. Последующее внесение двухкомпонентного препарата, особенно при рекультивации почвы с обширной площадью нефтезагрязнения, может быть осуществлено с использованием сеялки зернотукотравяной СЗТ-3,6А (или ее аналогов)<sup>14</sup> для рядового посева семян Лядвенца рогатого с одновременным внесением гранулированных минеральных удобрений (рисунок 7) [23].

#### Заключение

Микроорганизмы широко распространены в неживой и живой природе. По данным А.А. Воробьева [19], число бактерий, населяющих почву, воду морей, рек и океанов, атмосфер, растительный и животный мир, достигает  $10^{27-30}$ . Именно благодаря микроорганизмам процесс трансформации органического вещества завершается полной минерализацией. В результате биохимических процессов природные и синтетические загрязнители превращаются в двуокись углерода, воду и другие экологически нейтральные соединения. Микроорганизмы деструкторы являются основой различных биоконверсий токсичных веществ и очистки от них загрязненных почв и водоемов. Это новое направление по защите окружающей среды от химических загрязнений получило название «экологической биотехнологии».

Двухкомпонентный препарат с расширенным спектром деградативной активности биосовместимых, экологически безопасных микроорганизмов природного происхождения в ассоциации с семенами бобового растения Лядвенца рогатого в результате синергидного эффекта входящих в его состав биологически активных компонентов может быть использован для санации нефтезагрязненных почв в местах постоянной дислокации войск и восстановления их экологического статуса. При совместном использовании бактерий и бобового растения Лядвенца рогатого увеличивается скорость



**Рисунок 7 – Техника для рядового посева зернобобовых культур с иммобилизованными микроорганизмами [23]**

окисления углеводов нефти по сравнению со скоростью деградации загрязнителя при интродукции каждого бактериального штамма отдельно примерно в три раза.

<sup>14</sup> Сеялки с анкерными сошниками. URL: [http://yandex.ru/images/search?img\\_url=https%3A%F%2Fzem.ms21.ru](http://yandex.ru/images/search?img_url=https%3A%F%2Fzem.ms21.ru) (дата обращения: 01.07.2018 г.).

**Благодарности**

Авторы выражают свою признательность Игорю Александровичу Устюжанину, заместителю директора ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого» по научной работе за предоставление семян Лядвенца рогатого для проведения научных исследований.

**Информация о конфликте интересов**

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

**Сведения о рецензировании**

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

**Список источников**

1. Лисичкин В.А., Шелепин Л.А., Боев Б.В. Закат цивилизации или движение к ноосфере (экология с разных сторон). М.: «ИЦ-Гарант», 1997. 352 с.
2. Григоров С.И., Родионов А.С. Военная экология и экологическое обеспечение Вооруженных Сил Российской Федерации // Военная мысль, 1994. № 2. С. 44–50.
3. Булатов В.И. Россия: Экология и армия. Новосибирск: ЦЭРИС, 1999. 168 с.
4. Шаров С.А., Ашихмина Т.Я. Адаптация микробных биотехнологий ремедиации почв к реальным объектам санации // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 60–62.
5. Приваленко В.В., Безуглова О.С. Экологические проблемы антропогенных ландшафтов Ростовской области. Ростов н/Дон: 2003. 288 с.
6. Фритц Д.Е. Ликвидация разливов нефти на суше путем сжигания (пер. с англ. Н. Черыгина) // Нефтегазовые технологии. 1997. № 5. С. 35–36.
7. Ганеев И.Г., Кулагин А.А. Ремедиация и рекультивация техногенно деградированных земель // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6 (100). С. 554–557.
8. Турковская О.В., Игнатов В.В. Роль микробиологии в разработке приемов рекультивации нефтезагрязненных почв // Материалы научной конференции, посвященной 225-летию РАН «Фундаментальные и прикладные исследования саратовских ученых для процветания России и Саратовской губернии» 23–25 марта 1999г. Саратов: Изд-во Саратовского Государственного Университета, 1999. С. 276–278.
9. Иванова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Биодegradация нефти микробно-растительными ассоциациями // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 191–197.
10. Туманов А.С., Ашихмина Т.Я., Лещенко А.А. и др. Биопрепарат с расширенным спектром биодegradативной активности для рекультивации почвы объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 61–69.
11. Филимонов И.В., Янковская А.А., Завьялова Н.В. и др. Биотехнологические методы деструкции отравляющих веществ и продуктов их детоксикации // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 1. С. 4–15.
12. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Под. ред. Попова В.О. М.: 2005.
13. Патент № 2575063. С12N 1/20, С09C 1/10, С12R 1/38. Авторы: К.Е. Гаврилов, И.В. Дармов, Т.С. Кардакова, А.Г. Лазыкин, Е.А. Коновалова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»; опубл. 10.02.2016; бюл. № 4.
14. Синицин А.Н., Райнина Е.А., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. М.: 1994.
15. Кощеенко К.А. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов и их применение // Промышленная микробиология. Учебное пособие для ВУЗов. М.: 1989. С. 216–235.
16. Филина Н.А. Исследование сорбционных свойств древесных отходов для сбора нефтепродуктов с последующей утилизацией их в виде топливных брикетов. Автореф. ... канд. техн. наук. Пенза, 2011. 22 с.
17. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 280 с.
18. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Серебренникова М.К. Оптимизация процесса иммуобилизации клеток алканотрофных родококков на хвойных опилках в условиях колоночного биореактора // Вестник Пермского университета. 2010. Вып. 1(1). С. 69–72.
19. Воробьев А.А. Идеи Луи Пастера и развитие инфектологии и иммунологии // Вестник РАМН. 1996. № 6. С. 6–11.

**Об авторах**

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г.Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

*Погорельский Иван Петрович.* Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р мед. наук, проф.

*Лещенко Андрей Анатольевич.* Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, д-р техн. наук, проф.

*Лазыкин Алексей Геннадьевич.* Старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

*Гурин Константин Игоревич.* Начальник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

*Тетерин Владимир Валентинович.* Начальник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

*Шаров Дмитрий Александрович.* Начальник научно-исследовательского отдела, канд. техн. наук.

*Контактная информация для всех авторов:* 23527@mil.ru

*Контактное лицо:* Лещенко Андрей Анатольевич; 23527@mil.ru

## **BIOTECHNOLOGY FOR REMEDIATION AND RESTORING THE ECOLOGICAL STATUS OF SOIL IN THE PLACES OF PERMANENT DISPOSITION OF THE TROOPS BY OIL-DESTRUCTOR PREPARATION ON THE BASIS OF THE MICROBIAL-PLANT ASSOCIATION**

I.P. Pogorelsky, A.A. Leshchenko, A.G. Lazykin, K.I. Gurin,

V.V. Teterin, D.A. Sharov

*Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment*

*«48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence*

*of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation*

The object of the study is a preparation of ecotoxicant destructor based on bacterial strains of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas delhiensis* and associations of nodule bacteria *Rhizobium loti* with *Lotus corniculatus*. It is established, that during the simultaneous use of the bacteria and the legume *Lotus corniculatus* the rate of oxidation of petroleum hydrocarbons increases three times in comparison with the degradation rate of the pollutant after the separate use of each bacterial strain. We have received the preparation of ecotoxicant destructor – dry heterogeneous mass consisting of viable microbial cells of strains of *P. delhiensis* and *R. lotus*, seeds of leguminous plant *Lotus corniculatus* and delignified sawdust. Oil destructive activity of the preparation is proved in the course of microfield experiments. The degradation of ecotoxins is proved by capillary gas chromatography-mass spectrometry with mass-selective detection. Bacteria of the strains, included in the preparation, are non-pathogenic for humans and animals, biocompatible, environmentally safe, stable, unpretentious to nutritional needs, technological, do not persist in environmental objects in the absence of a substrate for destruction. The technology of the production of the preparation is developed. The results of these studies demonstrate the possibility of practical use of the degradative potential of the preparation in the course of the implementation of the measures for soil reclamation, cleaning up ecotoxins and restoring its ecological status.

**Keywords:** biodegradation; root-nodule bacteria; bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*); microbial-plant associations; microorganisms; oil products; oil; recultivation; environmental biotechnology; ecotoxicant.

**For citation:** Pogorelsky I.P., Leshchenko A.A., Lazykin A.G., Gurin K.I., Teterin V.V., Sharov D.A. Biotechnology for remediation and restoring the ecological status of soil in the places of permanent disposition of the troops by oil-destroyer preparation on the basis of the microbial-plant association // *Journal of NBC Protection Corps*. 2018. V. 2. № 4. P. 44–56.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to Igor Aleksandrovich Ustyuzhanin, Deputy Director on scientific work of the FGBNU Federal Agrarian Scientific Center of the North-East named after N.V. Rudnitsky, for the provision of seeds of *Lotus corniculatus* for scientific research.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

#### References

1. Lisichkin V.A., Shelepin L.A., Boev B.V. The sunset of civilization or the movement to the noosphere (ecology from different sides). M.: «IT-Garant», 1997. 352 p. (in Russian).
2. Grigorov S.I., Rodionov A.S. Military ecology and ecological support of the Armed Forces of the Russian Federation // *Military Thought*, 1994. № 2. P. 44–50 (in Russian).
3. Bulatov V.I. Russia: Ecology and the army. Novosibirsk: TSERIS, 1999. 168 p. (in Russian).
4. Sharov S.A., Ashikhmina T.Ya. Adaptation of microbial biotechnologies of soil remediation to real sanitation objects // *Theoretical and Applied Ecology*. 2014. № 4. P. 60–62 (in Russian).
5. Privalenko V.V., Bezuglova O.S. Ecological problems of anthropogenic landscapes of the Rostov region. Rostov n/Don: publishing house SKNC VS, 2003. 288 p. (in Russian)
6. Fritz D.E. Liquidation of oil spills on land by burning (translated from English N. Cheyegin) // *Oil and gas technologies*. 1997. № 5. P. 35–36 (in Russian).
7. Ganeev I.G., Kulagin A.A. Remediation and reclamation of technogenically degraded lands // *Bulletin of the Orenburg State University*. 2009. № 6 (100). P. 554–555 (in Russian).
8. Turkovskaya O.V., Ignatov V.V. Role of microbiology in the development of recultivation techniques for oil-contaminated soils. Proceedings of the scientific conference devoted to the 225th anniversary of the Russian Academy of Sciences «Fundamental and applied research of Saratov scientists for the prosperity of Russia and the Saratov province» March 23–25, 1999. Saratov: Saratov State University, 1999. P. 276–278 (in Russian).
9. Ivanova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Biodegradation of oil by microbial-plant associations // *Applied biochemistry and microbiology*. 2015. V. 51. № 2. P. 191–197 (in Russian).
10. Tumanov A.S., Ashikhmina T.Ya., et al. A biopreparation with an extended spectrum of biodegradation activity for soil reclamation of the chemical weapons destruction facility «Maradykovsky» // *Theoretical and Applied Ecology*. 2015. № 3. P. 61–69 (in Russian).
11. Filimonov I.V., Yankovskaya A.A. et al. Biotechnological methods of destruction of poisonous substances and products of their detoxification // *Journal of NBC Protection Corps*. 2017. V. 1. № 1. P. 4–15 (in Russian).
12. Kvesitadze G.I., Khatishashvili G.A., Sadunishvili T.A., Evstigneeva Z.G. Metabolism of anthropogenic toxicants in higher plants / Ed. V.O. Popova. Moscow: Nauka, 2005. 199 p. (in Russian).
13. Patent No. 2575063. C12N 1/20, C09C 1/10, C12R 1/38. Authors: K.E. Gavrillov, I.V. Darmov, T.S. Kardakova,

A.G. Lazykin, E.A. Konovalova; Applicant and patent owner of the State Educational Establishment of Higher Education of Vyatka State University; publ. 10.02.2016; bul. № 4 (in Russian)

14. Sinitsin A.N., Rainina E.A., Lozinsky V.I., Spasov S.D. Immobilized cells of microorganisms. Moscow: Moscow State University. 1994. 288 p. (in Russian).

15. Koshcheenko K.A. Immobilized cells of microorganisms and their application // Industrial microbiology. Textbook for High Schools. M.: High School. 1989. P. 216–235 (in Russian).

16. Filina N.A. Study of sorption properties of wood waste for the collection of petroleum products with subsequent disposal of them in the form of fuel briquettes.

Abstract for the degree of Candidate of Technical Sciences. Penza. 2011. 22 p. (in Russian).

17. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistical methods in microbiological studies. L.: Medgiz, 1962. 280 p. (in Russian).

18. Kuyukina M.S., Ivshyna I.B., Serebrennikova M.K. Optimization of the progress of immobilization of cells of alkanotrophic rhodococci on coniferous sawdust under conditions of a column bioreactor // Bulletin of Perm University. 2010. Issue. 1 (1). P. 69–72 (in Russian).

19 Vorobiev A.A. The ideas of Louis Pasteur and the development of infectology and immunology // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences. 1996. № 6. P. 6–11 (in Russian).

#### *Authors*

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

*Pogorelskii Ivan Petrovich.* Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Medical Sciences, Professor.

*Leshchenko Andrey Anatolyevich.* Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Doctor of Technical Sciences, Professor

*Lazykin Aleksey Gennadyevich.* Senior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

*Gurin Konstantin Igorevich.* Head of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

*Teterin Vladimir Valentinovich.* Head of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

*Sharov Dmitry Aleksandrovich.* Head of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

*Contact information for all authors:* 23527@mil.ru

*Contact person:* Leshchenko Andrey Anatolyevich; 23527@mil.ru