

Экспериментальная оценка микробицидного и деградативного потенциала биопрепарата деструктора фосфорорганических соединений

© 2014. К. К. Стяжкин¹, д.б.н., начальник, А. С. Туманов², к.м.н., начальник,
Т. Я. Ашихмина^{3,4}, д.т.н., руководитель, Д. П. Колесников², к.т.н., начальник управления,
В. В. Тетерин², к.б.н., начальник отдела, И. П. Погорельский², д.м.н., в.н.с.,
А. А. Лещенко², д.т.н., в.н.с., А. Г. Лазыкин², к.б.н., с.н.с., А. Р. Зиганшин², с.н.с.,
¹27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации,
²Научно-исследовательский центр ФГКУ 48 Центрального научно-
исследовательского института Министерства обороны Российской Федерации,
³Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
⁴Вятский государственный гуманитарный университет,
e-mail: ecolab2@gmail.com

Объектом изучения является биопрепарат-деструктор фосфорорганических соединений, созданный на основе бактерий штамма *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93. На основании всестороннего изучения штамма и биопрепарата на его основе получено санитарно-эпидемиологическое заключение на его производство. Биопрепарат предназначен для осуществления биоремедиации почвы на промплощадке объекта уничтожения химического оружия (УХО) «Марадыковский». Для её практического выполнения разработана технология производства экологически безопасного биопрепарата. Настоящие исследования предприняты с целью изучения микробицидного и деградативного потенциала биопрепарата, что предполагает оценку взаимоотношений микроорганизмов биопрепарата с почвенными микроорганизмами, а также определение глубины деградации экотоксиканта глифосата, внесённого в почву в составе препарата «Раундап». Изучение взаимоотношений микроорганизмов биопрепарата с почвенными микроорганизмами проводили с использованием метода попарного культивирования бульонных культур на плотной питательной среде. Моделирование натуральных условий процесса биоремедиации почвы проводили на испытательном стенде с системами кондиционирования, контроля, регистрации и поддержания технологических параметров процесса биоремедиации. Эффективность деградации глифосата оценивали с использованием ВЖХ-МС с масс-селективным детектированием. Проведённые исследования по изучению взаимоотношений микроорганизмов биопрепарата с представителями почвенных микроорганизмов свидетельствует об их биосовместимости и является гарантией того, что микроорганизмы биопрепарата не будут отторгаться почвенной микробиотой. В ходе аналитического определения содержания глифосата в почве при его исходном содержании 47,6 мг/кг к 12 суткам эксперимента количество экотоксиканта в почве снизилось до уровня 0,15 мг/кг, что ниже исходного содержания в 317 раз и меньше ПДК (0,5 мг/кг). Полученные экспериментальные данные дают основание заключить, что разработанный биопрепарат при интродукции в почву, содержащую глифосат, в режиме биодополнения осуществляет эффективную биоремедиацию почвы с понижением содержания экотоксиканта глифосата ниже предельно допустимых концентраций.

The object of study is a biopreparation, created on the basis the bacteria *Pseudomonas fluorescens* strain EC-5-93, which is a destructor of organophosphorus compounds. Sanitary-epidemiological certificate for the production of the biopreparation is obtained on the basis of the comprehensive study of the strain and biological product based on it. The biopreparation is intended for bioremediation of soil in the industrial site of chemical weapons destruction plant (CWD) «Maradykovsky». The technology of production of environmentally safe biopreparation is developed for its practical implementation. The aim of the study is to explore the microbicidal and degradation potential of the biopreparation that involves the assessment of the relationship of microorganisms in the biopreparation with soil microorganisms, as well as the determination of the degree of degradation of the ecotoxicant glyphosate applied into the soil in the preparation «Roundup». The study of the relationship of microorganisms in the biopreparation with soil microorganisms was performed using the method of pairwise cultivation of broth cultures on solid medium. Simulation of natural conditions of the process of soil bioremediation was carried out on a test bench with air-conditioning systems and systems of monitoring, recording and maintenance of technological parameters of the bioremediation process. Glyphosate degradation efficiency was evaluated using HPLC-MS method with mass selective detection. Studies on the relationship of microorganisms in the biopreparation with soil microorganisms indicate their biocompatibility and are a guarantee that microorganisms in the biopreparation will not be rejected by the soil microbiota. During the analytical determination of glyphosate in soil with its original content of 50 mg/kg ecotoxicant amount in the soil decreased to 12 days of the experiment to the levels of 0.15 mg/kg, which is lower than the initial content by 317 times and less than MPCs (0.5 mg/kg). The experimental data give reason to conclude that the biopreparation developed when introduced into the soil containing glyphosate in a biocomplementary mode implements effective bioremediation of soils with the reduction of ecotoxicant glyphosate level below recommended exposure limits.

Ключевые слова: штамм-биодеструктор, фосфорорганические соединения, реакционные массы, биотехнология утилизации.

Keywords: biodestructor, organophosphate substances, reaction complexes, recycling biotechnology of reactivity complexes.

Введение

Использование производственного, научно-технического и интеллектуального потенциала организаций и учреждений, расположенных в регионах размещения объектов хранения и уничтожения химического оружия (УХО), было предусмотрено ещё в 2005 г. при разработке проекта Положения по перепрофилированию объектов после прекращения их использования по прямому назначению [1]. Как отметил директор Департамента реализации конвенционных обязательств Министерства промышленности и торговли Российской Федерации В. И. Холстов [2], перепрофилирование объектов УХО – наиболее актуальный вопрос сегодняшнего дня, решение которого напрямую связано с ликвидацией последствий работы объекта по уничтожению химического оружия. Для этого необходимо полностью избавиться от опасных отходов, осуществить дегазацию оборудования, задействованного в процессе уничтожения химического оружия. Особо отмечено, что на промплощадках, где размещены объекты УХО, будут проведены реабилитационные работы [2]. Правительство Кировской области взаимодействует с Департаментом реализации конвенционных обязательств Минпромторга России по вопросам вовлечения в хозяйственный оборот имущественной базы объекта УХО «Марадыковский» на основе инвестиционного проекта «Химико-технологический лесопромышленный комплекс» [3].

Осуществление реабилитационных мероприятий на промплощадке объекта УХО «Марадыковский» после принятия решения по его перепрофилированию с очевидностью будет включать биоремедиацию как комплекс методов очистки почвы на промплощадке с использованием метаболического потенциала таких биологических объектов, как микроорганизмы [4]. Одно из направлений биоремедиации, именуемое как биодополнение, предполагает внесение в почву биопрепаратов микроорганизмов, способных к деградации экотоксикантов. Биоремедиация, реализуемая как биодополнение, безопасна для окружающей среды, поскольку предполагает исполь-

зование микроорганизмов-деструкторов, выделенных из почвы, где предусматривается проведение реабилитационных работ. В этой связи реализация биоремедиации возможна *in situ*, то есть на месте, без вывоза почвы на специальную площадку. Относительно низкая себестоимость по сравнению с функционированием традиционных очистных сооружений, возможность мониторинга процесса очистки, а также высокий уровень очистки почвы, не уступающий традиционным методам, свидетельствуют о явных преимуществах технологии биоремедиации почвы.

По данным на 1 сентября 2013 г., доля уничтоженных отравляющих веществ (Vx, зарин, зоман, зоман вязкий) на объекте УХО «Марадыковский» составляет 98,2%, оставшееся количество фосфорорганических отравляющих веществ – 123,35 тонны [5]. Таким образом, в 2015 г. по завершении уничтожения отравляющих веществ на объекте УХО «Марадыковский» и начале осуществления реабилитационных мероприятий на промплощадке возможно реальное применение биоремедиации. Для её практического осуществления разработана технология производства экологически безопасного препарата – биодеструктора токсичных фосфорорганических соединений (ФОС) на основе бактерий штамма *Pseudomonas fluorescens* EK-5-93 [6]. Согласно экспериментальным данным [7], при уровне загрязнения почвы ФОС, равном 70–100 мг/кг, для очистки территории на 82–85% в течение 7–8 суток необходимо 0,7–1,4 мг биопрепарата при содержании в 1 г 150 млрд жизнеспособных бактерий.

Как известно, фосфонаты являются классом ФОС со связью С–Р, придающей содержащим её молекулам устойчивость к химическому гидролизу и термическому разрушению [8]. К производным фосфонатов антропогенного происхождения относятся отравляющие вещества Vx (алкилфосфонотиолят), зарин и зоман (метилфосфонофторидные эфиры), а также неселективный системный гербицид глифосат (N-(фосфометил)-глицин). Конечными продуктами их разложения являются менее токсичные алкилфосфо-

новые кислоты, а глифосата – аминотил-фосфоновая кислота, которые очень устойчивы к разложению в почве, где обнаруживаются в течение десятков лет даже на глубине свыше 1 м [9]. Большинство бактерий, для которых установлено разложение фосфонатов по С–Р лиазному механизму, в частности, для представителей рода *Pseudomonas*, относятся к грамотрицательным бактериям. Бактериальные штаммы способны полностью минерализовать как природные, так и ксенобиотические фосфонаты в качестве источников не только фосфора, но и азота и углерода [10, 11]. Фермент С–Р лиаза, синтезируемый штаммами-деструкторами ФОС, в частности, *P. fluorescens* 23F [12], отвечает за расщепления неактивированных связей С–Р алкилфосфонатов с образованием ортофосфата и соответствующих алканов, используемых бактериями в качестве единственного источника фосфора [13].

Генетика деградации фосфонатов по С–Р лиазному пути довольно хорошо изучена [13, 14]. Более того, с использованием методов генной инженерии получена рекомбинантная плазмидная ДНК рTgc TE-ОРН, детерминирующая синтез бактериями органофосфатгидролазы – фермента с высокой эффективностью его каталитического действия в реакциях разложения ФОС [15].

Таким образом, вся совокупность фундаментальных знаний о механизме биодegradации ФОС с С–Р связью [8–14] явилась основой выделения природного штамма биодеградатора *P. fluorescens* ЕК-5-93 ФОС, всестороннего изучения и создания на его основе биопрепарата для ремедиации почвы. На основании выполненных исследований по изучению биологических характеристик препарата получено санитарно-эпидемиологическое заключение № 66.МО.01.244.00000501.02 от 26.01.2012 г. на производство биопрепарата деструктора ФОС.

Материалы и методы

В работе использовали биопрепарат-деструктор ФОС и выделенную из него чистую культуру бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93. Исходная культура бактерий выделена методом накопительной культуры из мест естественной адаптации к ФОС, проявляет к ним в присутствии органических кислот С–Р лиазную активность, выражающуюся в расщеплении углерод-фосфорной связи [6, 7]. Для изучения биосовместимости бактерий *P. fluorescens* ЕК-

5-93 с почвенными микроорганизмами из образцов почвы выделены и идентифицированы типичные представители почвенных бактерий: бациллы *Bacillus subtilis* и *B. mesentericus*, псевдомонады *Pseudomonas putida*, *P. alcaligenes*, клебсиеллы *Klebsiella aerogenes*, протей *Proteus vulgais*, а также кишечная палочка *Escherichia coli*. В экспериментах в качестве контрольного был также использован клинический изолят *Alcaligenes faecalis*, выделенный от больного с отитом.

Культивирование бактерий штамма деструктора и изолятов почвенной микрофлоры и клинического изолята проводили на питательных средах рекомендованного состава [15]. Концентрацию живых микробов в суспензиях оценивали методом высева серийных десятикратных разведений на плотную питательную среду в чашках Петри с последующим подсчетом выросших колоний. Общую концентрацию бактерий в культурах и суспензиях определяли по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-29-86П).

Взаимоотношения между бактериями штамма-деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 с бактериями – представителями почвенной микрофлоры оценивали методом парного культивирования на плотной питательной среде по Н. А. Глушановой и Б. А. Шендерову [16].

Моделирование природных условий процесса биоремедиации почвы проводили на испытательном стенде с системами кондиционирования, контроля, регистрации и поддержания технологических параметров процесса биоремедиации. В аналитических исследованиях использовали глифосат («Fluka» Германия). При проведении исследований на испытательном стенде в почву вносили гербицид «Раундап», содержащий в 1 литре 360 г глифосата (ЗАО фирма «Август», Россия по лицензионному соглашению с фирмой «Монсанто Европа С. А.», Бельгия). Эффективность деградации глифосата в составе гербицида «Раундап», внесённого в почву, исследовали ВЖХ-МС на приборе Prominense с масс-селективным детектором LCMS-2010 («Shimadzu», Япония) и колонкой Luna C 18 («Phenomenax» США). Расчётное содержание глифосата в почве составило 50 мг/кг. Отбор проб почвы для анализа проводили в начале эксперимента и на 3-и, 6-е, 9-е и 12-е сутки. Статистическую обработку результатов экспериментов выполняли согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И. П. Ашмарина и А. А. Воробьёва [17].

Результаты

Интродуцированные в почву микроорганизмы, как в виде чистой культуры, так и в составе биологического препарата с неизбежностью вступают во взаимодействия с почвенными микроорганизмами. Важнейшим фактором, определяющим жизнестойкость интродуцированного вида микробов, является его биотический потенциал, противостоящий сопротивлению окружающей среды. Поскольку интродуцированный вид микробов является высокоспециализированным видом, то для его роста и размножения, а также для проявления технофильных свойств нужен соответствующий субстрат, находящийся в почве. При исчерпании последнего специализированный вид микробов будет исключён из микробного консорциума почвы, и его место займут другие микроорганизмы аборигенной микрофлоры. Однако полного замещения интродуцированного вида в ряде случаев не происходит, и сохранившиеся микробы интродуцированного вида могут снижать ауторе медиационные процессы в почве за счёт подавления активности представителей аборигенной микрофлоры.

Культура бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93, выделенная из биопрепарата деструктора ФОС, была исследована на биосовместимость (или антагонистическую активность) с типичными представителями почвенной микрофлоры бациллами, псевдомонадами, клебсиеллами и протеем. Три оценки характера взаимоотношений различных видов микробов в условиях совместного культивирования *in vitro* [16], эти взаимоотношения могут быть антагонистическими, синергидными, индифферентными и, как следствие, совместимыми или конкурентными. Результаты оценки взаимоотношений между микробами представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о биосовместимости бактерий штамма-деструктора ФОС *P. fluorescens* ЕК-5-93 с микроорганизмами, выделенными из почвы. В то же время клинический изолят *A. faecalis* проявил антагонистическую активность в отношении *P. fluorescens* ЕК-5-93 в виде несовместимости с экспансивным ростом. Об этом же свидетельствуют микрофотографии на рисунке, на которых видно, что культура *A. faecalis* (рисунок А-1), выделенная от больного с ЛОР-патологией, проявила несовместимость с бактериями *P. fluorescens* ЕК-5-93 с явным экспансивным бактериальным ростом, а почвенные культуры *P. alcaligenes* и *B. subtilis* оказались биосовместимыми с культурой *P. fluorescens* ЕК-5-93.

Полученные результаты важны с практической точки зрения, поскольку бактерии специализированного штамма-биодеструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93, вносимые в составе биопрепарата в почву, подвергаемую биодеструкции, должны быть совместимыми с почвенными микроорганизмами и не вступать с ними в конкурентные взаимоотношения. Безусловно, на начальном этапе биоремедиации, когда в почве есть субстрат (фосфонаты), штамм-биодеструктор будет иметь явное преимущество перед другими почвенными микроорганизмами, но на следующих этапах именно почвенные микроорганизмы должны будут «продолжить эстафету» биоремедиации. В этом случае чрезвычайно важны будут формы поведения микроорганизмов, которых в царстве микробов довольно много. К ним следует отнести агрессию, изоляцию, конкуренцию, афилиацию, кооперацию, координацию [18]. С точки зрения биологической интерпретации взаимодействий микроорганизмов в популяциях, колония микроорганизмов может быть рассмотрена как «клеточное государство» с разделением функциональных ролей между особями или даже как единый многоклеточ-

Таблица 1

Взаимоотношения бактерий штамма деструктора ФОС *P. fluorescens* ЕК-5-93 с представителями почвенной микрофлоры при совместном культивировании попарно на плотной питательной среде

Микроорганизмы	Характер взаимоотношений	
	биосовместимость	несовместимость
<i>B. subtilis</i>	+	–
<i>B. mesentericus</i>	+	–
<i>P. putida</i>	+	–
<i>P. alcaligenes</i>	+	–
<i>K. aerogenes</i>	+	–
<i>E. coli</i>	+	–
<i>P. vulgais</i>	+	–
<i>A. faecalis</i> (контроль)	–	+

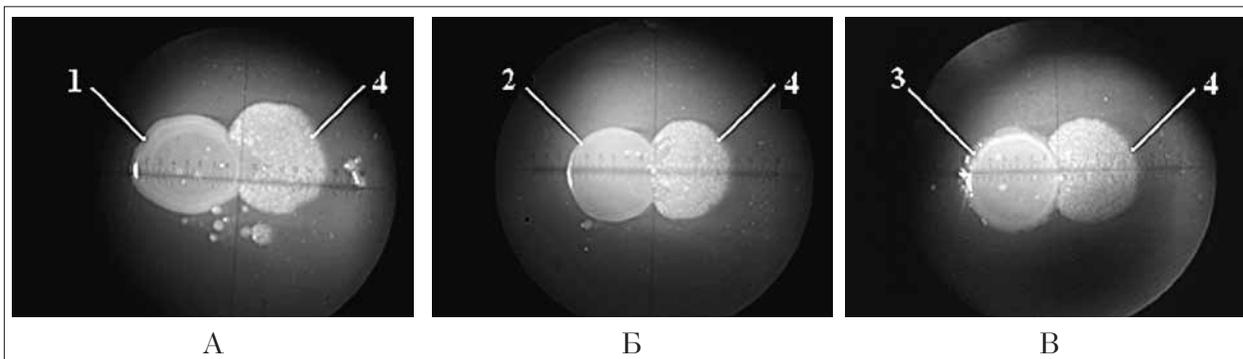


Рис. Микрофотографии бионесовместимой культуры *A.-faecalis* (1), и биосовместимых культур *P. alcaligenes* (2), *B. subtilis* (3), с культурой *P. fluorescens* EK-5-93 (4).

ный организм [18, 19]. Многие поведенческие реакции, наблюдаемые у высших животных, у микроорганизмов проявляются в «обнажённом» виде, в частности, ярко выражены биохимические, биофизические и генетические механизмы этих реакций. Например, комплексная форма поведения микроорганизмов, именуемая афiliation, проявляется в виде клеточной агрегации, зависимой от химических стимулов [18]. Именно фосфонаты как химический стимул обеспечивают согласованное участие и дифференцированное поведение бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* EK-5-93 в зависимости от их функциональной специализации, приводящее к очищению почвы в ходе биоремедиации.

Результаты оценки биосовместимости бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* EK-5-93 с представителями почвенной микрофлоры свидетельствуют о том, что бактерии, отобранные из мест естественной адаптации к ФОС, не являются чужеродными почвенной микрофлоры и поэтому не отторгаются микробным сообществом, несмотря на его иную функционально-морфологическую специфику, отличную от специфики монокультуры бактерий *P. fluorescens* EK-5-93.

Совместимость бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* EK-5-93 с почвенными микроорганизмами проявилась в ходе проведения экспериментов, моделирующих

натурные условия процесса биоремедиации почвы на испытательном стенде, обеспечивающем такие условия кондиционирования, как влажность, температура, аэрация. Для бактериологического изучения отбирали пробы из верхнего слоя (не превышающего 0,1 м) грунта модулей испытательного стенда. Внесение в почву экотоксиканта «Раундап» осуществляли методом орошения. В эксперименте использовали дозу «Раундапа», пятикратно превышающую дозу гербицида, рекомендуемую при одноразовом внесении в почву для борьбы с сорняками. Через 26 часов, в течение которых происходила равномерная сорбция гербицида на почвенных частицах, в почву испытательного стенда интродуцировали исследуемый регидратированный биопрепарат (источники углерода и минеральных элементов в почву дополнительно не вносили). Пробы почвы для бактериологического исследования отбирали на 1-е, 3-и, 6-е, 9-е и 12-е сутки. Результаты исследований, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что после внесения в почву биопрепарата общее содержание микробных клеток увеличилось по сравнению с таковым в исходной дерново-подзолистой почве, что может быть связано с усиленным размножением в ней бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* EK-5-93 и утилизацией субстрата (глифосата). В последующем (на 3-и

Таблица 2

Динамика содержания живых микробных клеток в почве (КОЕ/г) в процессе биоремедиации ($x \pm I_{95}$)

Исследуемая почва	Сутки эксперимента				
	1	3	6	9	12
Дерново-подзолистая	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(0,9 \pm 0,02) \cdot 10^6$
Дерново-подзолистая с внесённым биопрепаратом	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(3,4 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(4,9 \pm 0,7) \cdot 10^7$
Дерново-подзолистая с внесённым биопрепаратом без экотоксиканта	$(8,9 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(9,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$	$(9,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(9,4 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(8,8 \pm 0,1) \cdot 10^8$

сутки) отмечается существенное снижение содержания микробов в почве с интродуцированным биопрепаратом в связи со снижением в ней количества внесённого гербицида. При этом на 3-и сутки эксперимента бактериологическим методом установлено двукратное увеличение содержания почвенных микроорганизмов в исходной почве, содержащей гербицид. Важно отметить, что даже на 12-е сутки эксперимента содержание микроорганизмов в почве с интродуцированным био-препаратом значительно превышает содержание микроорганизмов в исходной почве, и это можно с большей долей вероятности связать со сложившейся в ходе эксперимента формой существования микробных ассоциаций. Необходимо также отметить и другое: гербицид «Раундап», внесённый в исходную дерново-подзолистую почву, снижает содержание почвенных микроорганизмов вследствие токсического антибактериального эффекта с последующим их увеличением после снижения токсического действия глифосата.

Уменьшение содержания жизнеспособных микробных клеток, в том числе *P. fluorescens* ЕК-5-93, зафиксированное на 3-12-е сутки эксперимента, сопровождается интенсивной деструкцией глифосата, внесённого в составе гербицида «Раундап» в почву, о чём свидетельствуют данные, представленные в таблице 3.

Эти результаты свидетельствуют о том, что процесс биоремедиации происходил наиболее интенсивно в первые трое суток, в результате чего количество экотоксиканта уменьшилось в 3,8 раза. В последующем каждые 3 дня количество глифосата в почве, по данным аналитического определения, снижалось в 2 раза и на 12-е сутки достигло 0,15 мг/кг, что ниже исходного количества в почве в 317 раз и меньше ПДК (0,5 мг/кг).

В контрольной дерново-подзолистой почве происходила незначительная естественная биодеструкция глифосата почвенными микроорганизмами, приведшая к его снижению на 12-е сутки определения в 1,4 раза (или на 28%).

Таким образом, экспериментально подтверждена высокая биодеградативная активность бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 в составе биопрепарата, метаболический потенциал которого обеспечил снижение содержания фосфоната-глифосата в почве ниже значения ПДК [20], а также ниже значения ПДК для метилфосфоновой кислоты (0,22 мг/кг), являющиеся конечным продуктом гидролиза в природном комплексе фосфонатов [21].

Проведённые исследования дают основание полагать, что поиск и селекция микроорганизмов, способных к биоутилизации и трансформации реакционных масс ФОС, образующихся в процессе химической детоксикации, и которые могут попасть в почву на промплощадках объекта УХО «Марадыковский», увенчались успехом. Биопрепарат, созданный на основе микроорганизмов-деструкторов ФОС *P. fluorescens* ЕК-5-93, может быть использован в комплексе с другими средствами для решения проблемы защиты почвы от экотоксикантов и её ремедиации.

Характерной биологической особенностью бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93, как показали настоящие исследования, является их биосовместимость с почвенными микроорганизмами, выделенными непосредственно из ячеек испытательного стенда. Этот факт является чрезвычайно важным, поскольку, как подчёркивает Г. Г. Миллер [22], в природе не существует «чистых» биосистем, и подавляющее большинство явлений, наблюдаемых в естественных условиях, является результатом эволюционно сложившихся форм существования различных ассоциаций. В этой связи особенно примечательно, что взаимоотношения между членами ассоциаций складываются на разных условиях, в том числе и на генетическом. В нашем случае бактерии штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 проявили биосовместимость с представителями почвенной микрофлоры: бациллами, псевдомонадами, клебсиеллами, протеом, кишечной палочкой. Следствием биосовместимости интродуцированных бактерий

Таблица 3

Динамика содержания глифосата в почве (мг/кг) в процессе биоремедиации ($x \pm I_{95}$, n=15)

Исследуемая почва	Сутки биоремедиации				
	1	3	6	9	12
Дерново-подзолистая	50,8 ± 4,1	47,5 ± 3,2	41,8 ± 2,9	39,2 ± 1,9	36,5 ± 1,2
Дерново-подзолистая с внесённым био-препаратом	47,6 ± 2,8	12,4 ± 1,3	6,1 ± 0,8	3,2 ± 0,1	0,15 ± 0,02

P. fluorescens ЕК-5-93 с почвенными микроорганизмами является отсутствие конкуренции за преимущественное использование тех или иных ресурсов, в частности, глифосата. При снижении количества последнего в почве до уровня ПДК численность бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 снижается вплоть до полного замещения аборигенной микрофлорой, завершающей процесс ауто-ремедиации почвы. При этом численность общего количества микроорганизмов в случае интродукции биопрепарата в почву на 12-е сутки эксперимента более, чем в 54 раза, превышает численность естественной почвенной микрофлоры в контрольной ячейке испытательного стенда (табл. 2).

Таким образом, анализируя полученные результаты по взаимоотношению бактерий штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 с почвенными микроорганизмами, можно отметить, что в данном конкретном случае мы соприкасаемся с проблемой ассоциации интродуцированных бактерий с почвенными бактериями (или аборигенными бактериями) и эта ассоциация взаимовыгодна. С другой стороны, мы целенаправленно используем эти ассоциации микроорганизмов для решения проблемы более высокого уровня – проблемы биоремедиации почвы, загрязнённой фосфонатами. И эта проблема имеет сугубо практическую направленность, связанную с обеспечением экологической безопасности людей, которые будут работать на территории перепрофилированного объекта УХО «Мардыковский». Судя по представленным в таблице 3 результатам, почвенная микрофлора обладает определённым деградативным потенциалом, позволяющим ей снизить к 12-м суткам эксперимента содержание глифосата в 1,4 раза в сравнении с его исходным количеством. Следовательно, ауто-ремедиация почвы без биодополнения специализированными бактериями-деструкторами фосфонатов в составе биопрепарата может растянуться во времени. В этой связи суть биодополнения как одного из направлений биоремедиации состоит во внесении (интродукции) в почву бактерий, дополняющих естественный деградативный потенциал почвенной микрофлоры.

Как показано в работе [13], среди выделенных из образцов почвы микроорганизмов, разлагающих фосфонат глифосат по С-Р лиазному типу, отсутствуют бактерии, относящиеся к роду *Pseudomonas*. Вполне вероятно, что выделенный штамм *P. fluorescens* ЕК-5-93 из места естественной адаптации к ФОС, яв-

ляется мутантом, в геноме которого присутствует оперон, аналогичный обнаруженному у кишечной палочки [23]. Данный оперон размером 10,9 т.п.о. состоит из 14 генов *phn CDEFGHIJKLMNOP*, локализованных около 92,8 мин. на хромосомной карте. Считается, что оперон транскрибируется с единственного промотора, расположенного перед геном *phnC*. На основании результатов молекулярно-генетического исследования, представленных в работе [23], можно предположить, что в процессе деградации глифосата бактериями штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 участвует поликомпонентная система-гены оперона и детерминируемые генные продукты, имеющие локализацию как в мембране, так и периплазме бактериальных клеток.

Анализ данных по генетике биодegradации фосфонатов по С-Р лиазному пути [10–14, 23] позволил выделить ключевые моменты, связанные с поддержанием эталонной культуры штамма деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 в функционально активном состоянии в течение длительного времени. Ввиду того, что бактерии штамма были выделены из места естественной адаптации к ФОС, сам штамм можно отнести к разряду «адаптивных» мутантов [24, 25]. Накопление в почве таких мутантов требует времени, а анализ популяции мутантов свидетельствует о её гетерогенности как по морфологии колоний бактерий, так и по деградативной способности [25]. В этой связи для предотвращения увеличения гетерогенности популяции бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 и сохранения на высоком уровне генетически закреплённой способности к биодеструкции фосфонатов, важным для биотехнологии получения биопрепарата деструктора ФОС, был предусмотрен необходимый этап поддержания эталонной культуры бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93. Он предусматривал пассаж культуры бактерий на минимальной плотной питательной среде с глифосатом. Данный технологический приём подготовки эталонной культуры бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93 обеспечивает однородность популяции штамма и её готовность к использованию для культивирования штамма деструктора ФОС.

На основании оценки антимикробного и деградативного потенциала штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93, входящего в состав биопрепарата деструктора ФОС, можно говорить о том, что после внесения в почву, содержащую глифосат, микробы штамма деструктора вступают в симбиотические формы взаимоотношений

с разными видами почвенных микроорганизмов. При этом для них создаются взаимовыгодные условия, и ассоцианты совместно участвуют в биодеградации экотоксиканта в почве и в целом в регуляции отношений со средой обитания, а также биоремедиации почвы.

Заключение

Проблема защиты почвы и её ремедиация в местах функционирования объекта УХО «Марадыковский» стала актуальной и в то же время решаемой задачей, связанной с катаболизмом фосфонатов антропогенного происхождения. Многие микроорганизмы, преимущественно грамотрицательные бактерии, способны к деградации фосфонатов. Экспериментально доказана множественность путей их катаболизма [13], однако только деградация наиболее стабильной С-Р связи позволяет рассчитывать на полную инактивацию фосфонатов и в последующем их безопасность для людей и окружающей среды. Физиологические и биохимические характеристики системы деградации алкилфосфонатов, выявленные у микроорганизмов, позволили специалистам НИЦ ФГКУ «48 ЦНИИ» Минобороны России разработать технологию производства экологически безопасного препарата биодеструктора ФОС на основе грамотрицательных бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93. Препарат способен при интродукции в почву в режиме биодополнения осуществлять эффективную ремедиацию с понижением уровня фосфонатов в почве ниже предельно допустимых концентраций.

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № ЦР 107/2085/У307К.

Литература

1. Чететенко В.В., Капур О.Н. Вопросы и ответы по текущим проблемам химического разоружения в регионах хранения и уничтожения химического оружия. Библиотека «Российской газеты». 2005. Вып. № 24А. 96 с.
2. Холстов В.И. Итоги реализации Федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» в преддверии 2014 года // Теоретическая и прикладная экология. 2013. № 4. С. 6.
3. Мачехин Г.Н. Уничтожение химического оружия в Кировской области // Теоретическая и прикладная экология. 2013. № 4. С. 19–20.
4. Баландина А.В., Ерёмченко О.З., Одегова Т.Ф., Кузнецов Д.Б. Микробная ремедиация техногенных

поверхностных образований керженецкой нефтебазы // Фундаментальные исследования. 2013. № 10. Часть 2. С. 328–333.

5. Сербин С.В., Поляков А.И., Назаров В.Д. Нормативно-правовые аспекты в сфере обеспечения экологической и промышленной безопасности при уничтожении химического оружия // Теоретическая и прикладная экология. 2013. № 4. С. 64–69.

6. 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.

7. Стяжкин К.К., Дармов И.В., Бредихин В.Н., Воробьев К.А., Погорельский И.П., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г. Экспериментальная оценка иммунотоксического действия штамма *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93 // Теоретическая и прикладная экология. 2012. № 2. С. 54–59.

8. Freedman L.D., Doak G.O. The preparation and properties of phosphonic acid // Chem. Rev. 1957. V. 57. P. 479–523.

9. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А., Радилев А.С., Пшеничная Г.В. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии // Российский химический журнал. 2002. Т. 46. № 6. С. 82–91.

10. Ternan N.G., Quinn V.P. In vitro cleavage of the carbon-phosphorus bond on phosphonopyruvate by cell extracts of the environmental Burkholderia cepacia isolate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 248. P. 378–381.

11. Ternan N.G., Quinn V.P. Phosphate starvation-independent 2-aminoethylphosphonic acid biodegradation in a newly isolated strain *Pseudomonas putida*, 62 // Syst. Appl. Microbiol. 1998. V. 21. P. 346–352.

12. McMullan G., Quinn V.P. In vitro characterization of a phosphate starvation-independent carbon-phosphorus bond cleavage activity in *Pseudomonas fluorescens* 23F. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 320–324.

13. Кононова С.В., Несмеянова М.А. Фосфонаты и их деградация микроорганизмами // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 2. С. 220–233.

14. Варфоломеев С.Д., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Ветчицева Ю.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рTrc ТЕ-ОРН и продуцент фермента органофосфатгидролазы // Патент РФ № 2232807 (20.07.2004). Бюл. № 20.

15. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника: методические рекомендации. М.: ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. 2007. 70 с.

16. Глушакова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл

хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* // Журнал микробиологии. 2005. № 2. С. 56–61.

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

18. Олескин А.В. Надорганизменный уровень взаимодействия в микробных популяциях // Микробиология. 1993. Т. 62. Вып. 3. С. 389–402.

19. Кузнецов О.Ю. Бактериальная колония как сложно организованное сообщество клеток // Журнал микробиологии. 2005. № 1. С. 3–7.

20. Генетические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды: ГН 1.2.1323-03. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 02.05.2003. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 2003. 38 с.

21. Капашин В.П., Поляков А.И., Круглов В.А. Обеспечение экологической и промышленной безопасности

объектов по уничтожению химического оружия // Теоретическая и прикладная экология. 2013. № 4. С. 10–18.

22. Миллер Г.Г. Биологическое значение ассоциаций микроорганизмов // Вестник РАМН. 2000. № 1. С. 45–51.

23. Metcalf W.W., Wanner B.L. Mutation analysis of an *Escherichia coli*, fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using *TnphoA* elements // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 3430–3442.

24. Wackett L.P., Wanner B.L., Venditti C.P., Walsh C.T. Involvement of the phosphonate regulon and the *psi D* locus carbon-phosphorus lyase of *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. 1987. V. 169. P. 1753–1756.

25. Matys V., Laurinavichus K.S., Krupyanko V.I., Nesmeynova M.A. Optimisation of degradation of methylphosphonate-analogue of toxic pollutants with direct C-P bond by *Escherichia coli* // Process biochemistry. 2001. V. 36. P. 821–827.