

## Оценка возможности использования растительно-микробных ассоциаций при рекультивации почвы на объекте «Марадыковский»

© 2016. А. Г. Лазыкин<sup>1</sup>, к. б. н., доцент, А. А. Лещенко<sup>1</sup>, д. т. н., профессор, Т. Я. Ашихмина<sup>1,2</sup>, д. т. н., профессор, зав. кафедрой, зав. лабораторией, И. П. Погорельский<sup>1</sup>, д.м.н., профессор, И. В. Дармов<sup>1</sup>, д. м. н., профессор, зав. кафедрой, И. А. Лундовских<sup>1</sup>, к.х.н., доцент, И. А. Устюжанин<sup>3</sup>, к. с.-х. н., зам. директора, С. А. Шаров<sup>4,1</sup>, начальник отдела, аспирант,

<sup>1</sup> Вятский государственный университет, 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 167000, Россия, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 54,

<sup>3</sup> Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого РАСХН, 610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166 а,

<sup>4</sup> Объект по хранению и уничтожению химического оружия «Марадыковский», 612085, Россия, Кировская обл., п. Мирный, ул. Советской Армии, д. 94, e-mail: ipogorelsky@inbox.ru

Объектом изучения являлась растительно-микробная ассоциация клубеньковых бактерий *Rhizobium loti*, бактерий штамма – деструктора экотоксикантов *Pseudomonas delhiensis* В-11400 с бобовым растением лядвенцом рогатым (*Lotus corniculatus*). Обоснована возможность использования биодegradативного потенциала данной ассоциации в биотехнологии рекультивации почвы на территории объекта уничтожения химического оружия (УХО) «Марадыковский». Бактерии обоих штаммов непатогенны, выделены из окружающей среды, экологически безопасны. Клубеньковые бактерии *R. loti* вступают в симбиотические взаимоотношения с бобовыми растениями с образованием клубеньков, в которых протекает процесс симбиотической азотфиксации.

Моделирование натуральных условий биорекультивации почвы проводили на испытательном стенде, оборудованном системами поддержания и контроля технологических параметров ведения процесса. Глубину деструкции глифосата в составе гербицида «Раундап» в почве исследовали методом капиллярной газовой хроматомасс-спектрометрии с масс-селективным детектированием. Показана высокая биодеструктивная активность растительно-микробной ассоциации, обуславливающая существенное уменьшение содержания экотоксикантов в почве. В ходе аналитического определения глифосата в почве установлено, что при его исходном содержании 52 мг/кг к тринадцатому суткам эксперимента содержание экотоксиканта снизилось до уровня 0,13 мг/кг, что ниже исходного содержания более чем в 400 раз, и меньше ПДК (0,5 мг/кг). Результаты выполненных исследований свидетельствуют о возможности практического использования деградативного потенциала растительно-микробной ассоциации в ходе осуществления мероприятий по рекультивации почвы и очистке её от экотоксикантов.

**Ключевые слова:** рекультивация, экотоксикант, растительно-микробная ассоциация, фосфорорганические соединения, нефть, биодеструкция.

## Assessment of the possibility of using plant-microbial associations in biotechnology of soil remediation at the facility «Maradykovskiy»

A. G. Lazykin<sup>1</sup>, A. A. Leshchenko<sup>1</sup>, T. Ya. Ashikhmina<sup>1,2</sup>, I. P. Pogorelsky<sup>1</sup>, I. V. Darmov<sup>1</sup>, I. A. Lundovskikh<sup>1</sup>, I. A. Ustyuzhanin<sup>3</sup>, S. A. Sharov<sup>4</sup>,

<sup>1</sup> Vyatka State University,

36 Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

<sup>2</sup> Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, 54 Pervomayskaya St., Syktyvkar, Komi Republic, Russia, 167000,

<sup>3</sup> N. V. Rudnitski Zonal North-East Agricultural Research Institute, 166A, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,

<sup>4</sup> The facility for storage and destruction of chemical weapons «Maradykovskiy», 94 Soviet Army St., Mirnyy, Kirov region, Russia, 612085, e-mail: ipogorelsky@inbox.ru

The object of research is plant-microbial association of nodule bacteria *Rhizobium loti*, bacterial strain-destroyer of ecotoxicants *Pseudomonas delhiensis* B-11400 with the leguminous plant cat's clover (*Lotus corniculatus*). The possibility of using biodegradative potential of this association in biotechnology of soil remediation of the chemical weapon decommission plant of «Maradykovskiy» is well grounded. Both strains of bacteria are not pathogenic, they are isolated from the environment and ecologically safe. Nodule bacteria *Rhizobium loti* relate with leguminous plants to form nitrogen-fixing nodules, which leads to increase in productivity and protection of the symbionts against harmful fungi, it also accelerates the process of biodegradation of soil toxicants.

Modelling natural conditions of soil remediation was carried out on the test bench, equipped with systems of maintaining and control of technological parameters of the process. The depth of glyphosate degradation in the composition of herbicide «Raundap» in soil was studied by capillary GC-mass spectrometry with mass-selective detection. A high biodestructive activity of plant-microbial association is shown, it causes a significant decrease in the content of toxicants in soil. It has been found by analytical determination of glyphosate in soil, with the initial content of 52 mg/kg, thirteenth days later the content of ecotoxicant decreased to the level of 0.13 mg/kg, which is lower than the initial content more than 400 times and less than the MPC (0.5 mg/kg). The results of the study indicate the possibility of practical use of degradative potential of the plant-microbial association in soil remediation and purifying soil from ecotoxicants.

**Keywords:** remediation, toxicants, plant-microbial association, organophosphorus compounds, oil biodegradation.

Биодеградация фосфорорганических соединений (ФОС) специализированными микроорганизмами является перспективным научным направлением. Её отличительной особенностью является экологическая безопасность, высокая специфичность микробной деструкции и отсутствие токсических продуктов разложения [1]. В то же время высокие требования к санации загрязнённых территорий предполагают дополнительные исследования, в ходе которых могут быть созданы препараты, предназначенные для разложения ФОС и других поллютантов в конкретных условиях промплощадки объекта уничтожения химического оружия (УХО).

Проблема рекультивации почвы в месте функционирования объекта УХО «Марадыковский» после принятия решения по его перепрофилированию со всей очевидностью станет актуальной и может включать биологический этап с использованием биопрепарата [2, 3]. Технология такого биопрепарата – деструктора ФОС, нефти и нефтепродуктов с расширенным спектром биodeградативной активности базируется на основе использования бактерий двух штаммов псевдомонад *P. fluorescens* ЕК – 5–93 и *P. putida* ЕК – 8–14. Готовый к применению лиофильно обезвоженный биопрепарат представляет собой пористую массу светло-жёлтого цвета, которая хорошо регидратируется при добавлении воды. Интродукция специализированных штаммов *P. fluorescens* ЕК – 5–93 и *P. putida* ЕК – 8–14 в составе биопрепарата обеспечивает, с одной стороны, деградацию экотоксикантов в почве, а с другой стороны, – стимуляцию естественной (аборигенной) микрофлоры [3]. Входящие в состав биопрепарата специализированные микроорганизмы вместе с аборигенными

почвенными микроорганизмами способны формировать устойчивые трофические цепи и поэтапно участвовать в процессе деградации экотоксикантов.

Однако, как это явствует из опубликованных данных по результатам экспериментальных исследований [4], не существует универсального вида микроорганизмов, способного осуществить деградацию всех экотоксикантов и их компонентов. Поэтому в состав биопрепаратов, предназначенных для рекультивации почвы, необходимо вводить несколько видов микроорганизмов-деструкторов, принадлежащих различным таксономическим группам. Это тем более важно, что как на этапе вывода объекта УХО из эксплуатации, так и при выполнении работ по ликвидации последствий производственной деятельности, будет проводиться экологический мониторинг и комплекс реабилитационных мероприятий, в том числе с применением биотехнологии [5]. Дальнейшее расширение возможностей биотехнологии рекультивации почвы связано с применением биопрепарата, объединяющего микроорганизмы, которые обеспечивают био- и фиторекультивацию. В самой технологии фиторекультивации используют ассоциированные с растениями микроорганизмы. 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 экскреция экотоксикантов и последующая их деградация до клеточных

метаболитов и углекислого газа [6]. В этой связи представляется актуальным при разработке методов фиторекультивации осуществлять поиск и выделение штаммов бактерий – эффективных деструкторов экотоксикантов, способных к колонизации ассоциированных с ними растений. Такие штаммы бактерий, вступающие в растительно-микробные ассоциации, могут быть использованы в качестве биодополнения к уже разработанному биопрепарату – деструктору ФОС, нефти и нефтепродуктов [3]. Объединение в биопрепарате штаммов микроорганизмов – эффективных деструкторов ФОС, нефти и нефтепродуктов, а также семян бобовых растений, выступающих в качестве носителя специализированных природных клубеньковых бактерий [4, 6], создаст необходимые условия для стимулирования роста растений, защиты их от фитопатогенов и полноценной деградации экотоксикантов до полной рекультивации почвы.

Целью исследования являлось изучение растительно-микробной ассоциации клубеньковых бактерий *R. loti* и лядвенца рогатого *L. corniculatus* с бактериями штамма-деструктора экотоксикантов *P. delhiensis* В-11400 и оценка возможности её включения в состав новой формы двухкомпонентного биопрепарата, предназначенного для рекультивации почвы объекта УХО «Марадыковский».

### Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм клубеньковых бактерий *R. loti* и скарифицированные семена лядвенца рогатого (*L. corniculatus*) сорта Солнышко (семейство бобовые (*Fabaceae*)), полученные из ФГБНУ «НИИСХ Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого», а также штамм псевдомонад *P. delhiensis* В-11400, характеризующийся высокой деструктивной активностью в отношении нефти (нефтепродуктов) и ФОС. Штамм *P. delhiensis* В-11400 выделен и идентифицирован в 2013 г. сотрудниками кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов [7].

Культивирование бактерий *P. delhiensis* В-11400 проводили на мясо-пептонном агаре и в жидкой питательной среде на основе кислотного гидролизата казеина и дрожжевого автолизата, а клубеньковых бактерий *R. loti* – на маннитно-дрожжевом агаре [8].

Выращивание бактерий *P. delhiensis* В-11400 глубинным способом проводили в

лаборатории экспериментальной биотехнологии кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет» в биореакторе (ферментере) типа *LiFlus GX* производства ООО «Bio-Tronic» (Россия) в течение 24 час, а бактерий *R. loti* – в течение 48 час.

Режим культивирования бактерий штамма *P. delhiensis* В-11400: жидкая питательная среда на основе кислотного гидролизата казеина и дрожжевого автолизата; температура 28 °С; скорость перемешивания 450 об./мин; кислотность среды (рН) 7,0–7,4 (поддерживали автоматически с помощью добавления в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом – 3 л/мин в первые 4 час роста, а затем – 6 л/мин. В качестве ростстимулирующей добавки в биореактор вносили салицилат натрия через 4 часа после начала культивирования.

Режим культивирования бактерий *R. loti*: жидкая питательная среда на основе маннита (сахарозы) и дрожжевого автолизата; температура 28 °С; скорость перемешивания 450 об./мин; кислотность среды (рН) 6,8–7,2 (поддерживали автоматически с помощью добавления в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом – 3 л/мин в течение всего периода культивирования.

Определение количества жизнеспособных бактерий в исследуемых пробах проводили путём посева соответствующих десятикратных разведений бактериальных суспензий на селективные плотные питательные среды и подсчёта выросших колоний.

Иммобилизацию микроорганизмов [9] осуществляли путём перемешивания смеси культур *P. delhiensis* В-11400 и *R. loti* с семенами растения-фиторемедианта лядвенца рогатого (*L. corniculatus*) в защитной сахарозо-желатиновой среде (10% сахарозы + 1% желатина) на шейкере в течение 30 мин при 120 об./мин. 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 фирмы «Grandtec» (Китай). Сухую смесь концентрата микроорганизмов с семенами лядвенца рогатого снимали шпателем со дна кювет, помещали в пакеты из полимерного материала для размельчения, после чего объединяли с сорбентом – материалом естественного происхождения древесным опилом [10], переносили в герметично закрытую стеклянную тару и хранили при температуре от 0 до 8 °С.

Делигнификацию опила лиственных пород деревьев осуществляли путём кипячения в течение 4 час 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 [11].

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

Количественное определение нефти в исследуемых образцах проводили с использованием метода капиллярной газовой хроматомасс-спектрометрии на газовом хроматомасс-спектрометре GCMS – QP2010 Plus («Shimadzu», Япония) с масс-фильтром квадрупольного типа и последующей обработкой данных с помощью программного обеспечения GCMS Solution 2.5.

Имитацию природных условий процесса биорекультивации почвы проводили на испытательном стенде, оборудованном системами поддержания и контроля технологических параметров ведения процесса [2, 3]. Содержание глифосата в почве составляло 52 мг/кг. Глубину деструкции глифосата в составе гербицида «Раундап» в почве исследовали с использованием ВЖХ – МС на приборе Prominence с масс-селективным детектированием LCMS – 2010 («Shimadzu», Япония).

Статистическую обработку полученных результатов выполняли согласно руководству [12].

### Результаты исследований

Стандартный биотехнологический процесс получения микробных культур включал пять основных стадий:

- 1) подготовка питательной среды с заданными свойствами (pH, температура, концентрация питательных веществ и др.);
- 2) получение посевного материала из чистой культуры бактериальных клеток;
- 3) выращивание микроорганизмов в биореакторе;
- 4) концентрирование;
- 5) приготовление полуфабриката [13].

Посевной материал бактерий *P. delhiensis* В-11400 и *R. loti* готовили непосредственно перед глубинным культивированием из чистой, обновленной на агаризованной питательной среде, исходной (маточной) культуры бактериальных клеток с последующим вы-

ращиванием в жидкой питательной среде в стеклянных колбах на шейкере-инкубаторе. В дальнейшем посевной материал использовали на стадии глубинного культивирования, которая в биотехнологическом процессе получения биопрепарата является наиболее важной. Она включает в себя внесение посевного материала бактерий в питательную среду в биореакторе, установление оптимальных условий культивирования на аппарате для более высокого выхода биомассы клеток.

В таблице 1 приведены данные, характеризующие глубинные культуры и микробные концентраты, предназначенные для дальнейшего использования в технологии приготовления биопрепарата.

Как следует из представленных данных, глубинные культуры характеризуются высоким уровнем накопления микробной биомассы. При выращивании бактерий *P. delhiensis* В-11400 в биореакторе объёмом 3 л питательной среды количество жизнеспособных бактерий составило около  $15 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, а бактерий *R. loti* – свыше  $13 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

Для получения полуфабриката микробные клетки отделяли от питательной среды с помощью модульной ультра- и микрофильтрационной системы «Сартокон-мини». Параметры процесса концентрирования: давление на входе в установку ( $P_{вх.}$ ) 310 кПа, давление на выходе ( $P_{вых.}$ ) 250 кПа, скорость тангенциального потока ( $v$ ) 3,6 л/ч. Результаты концентрирования глубинных культур, представленные в таблице 1, показывают, что содержание микробных клеток штамма *P. delhiensis* В-11400 составило  $4,83 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл, а клубеньковых бактерий *R. loti* –  $4,43 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл.

Концентрированную смесь суспензий бактериальных клеток *P. delhiensis* В-11400 и ризобий *R. loti* в соотношении 1:1 смешивали с сахарозо-желатиновой средой (10% сахарозы + 1% желатина), обеспечивающей требуемую жизнеспособность клеток в процессе высушивания и хранения в герметично закрытой таре при температуре от 0 до +8 °С.

Следующим этапом исследований, который является одним из основных при разработке биопрепарата, является определение формы находящихся в нём живых микробных клеток: свободной или иммобилизованной. Преимущество использования иммобилизованных клеток, в отличие от свободных, определяется рядом таких характеристик, как повышенная жизнеспособность клеток, устойчивость к действию неблагоприятных

Таблица 1

Характеристика глубинных культур и микробных концентратов, предназначенных для использования в технологии приготовления биопрепарата

Наименование микроорганизма	Содержание бактериальных клеток в ..., · 10 <sup>9</sup> КОЕ/мл	
	глубинной культуре	микробном концентрате
<i>P. delhiensis</i> В-11400	14,90±2,2	48,30±1,3
<i>R. loti</i>	13,70±2,5	44,31±1,2

Примечание:  $X \pm I_{95}$ ,  $n = 3$ .

факторов внешней среды, высокая каталитическая активность иммобилизованных клеток и их ферментов, концентрация больших количеств биомассы и минимизация её потери при внесении в окружающую среду, экономичность [9].

К природным носителям следует отнести семена растений-фиторемедиаторов, являющихся важным элементом в процессах восстановления почвенного покрова, загрязнённого в результате хозяйственной деятельности [14–16]. Для формирования микробно-растительной ассоциации были проведены предварительные исследования по изучению трёх вариантов носителей на основе семян лядвенца рогатого и опилок с разным соотношением компонентов. Изученные ва-

рианты 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* В-11400 и *R. loti*. По окончании высушивания биопрепарата 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* В-11400 и ризобий *R. loti* на плотную питательную среду в чашках Петри с последующим подсчётом выросших колоний. Результаты подсчётов представлены в таблице 3.

Таблица 2

Варианты носителей, использованных для формирования микробно-растительной ассоциации



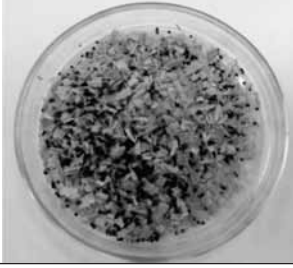
Состав носителей	Внешний вид носителя
Семена лядвенца рогатого	
Семена лядвенца рогатого и делигнифицированные опилки (соотношение 1:1)	
Семена лядвенца рогатого и елигнифицированные опилки (соотношение 4:1)	

Таблица 3

Характеристика выживаемости микроорганизмов, иммобилизованных на носителе

Состав носителя	Содержание жизнеспособных клеток, · 10 <sup>9</sup> КОЕ/г	
	<i>P. delhiensis</i> В-11400	<i>R. loti</i>
Семена лядвенца рогатого	7,9 ± 0,44	4,2 ± 0,2
Семена лядвенца рогатого: делигнифицированные опилки (соотношение 1:1)	19,43 ± 1,8	8,73 ± 0,5
Семена лядвенца рогатого: делигнифицированные опилки (соотношение 4:1)	17,1 ± 1,6	7,62 ± 0,3

Примечание:  $X \pm I_{95}$ ,  $n = 3$ .

На основании представленных результатов можно заключить, что наибольшее количество жизнеспособных бактериальных клеток *R. loti* и *P. delhiensis* В-11400 выявлено в экспериментах с использованием делигнифицированных опилок. При этом наиболее предпочтительным оказался состав носителя, включающий равные количества семян и опилок: в 1 г препарата сконцентрировалось наибольшее количество микроорганизмов, играющих основную роль в процессе биореккультурации.

Известно, что для иммобилизации микроорганизмов применяют органические и неорганические носители [10]. Среди органических носителей выделяют 2 класса: синтетические полимерные, например, на основе вискозы, пенополиуретана, и наиболее перспективные – природные носители. Для биопрепаратов, в частности нефтедеструкторов, чаще всего применяют последний вариант носителя на растительной и минеральной основе (торф, древесные опилки, солома, перлит, верховой мох, лузга гречки и подсолнуха). Материалы природного происхождения являются биоразлагаемыми и при их попадании в окружающую среду не оказывают дополнительной экологическую нагрузку, а при внесении в почву способствуют её «разрыхлению». Обычно эти материалы широко доступны, что определяет целесообразность их использования в качестве носителя иммобилизованных микроорганизмов [11].

Опилки лиственных пород деревьев (берёзы, ольхи и др.) являются отходом деревообрабатывающей промышленности. Как сорбент они обладают высокой поглощательной способностью, доступны для использования и экологически безопасны [14, 15]. Делигнифицированные опилки не обладают повышенной кислотностью, тогда как необработанные,

находясь в почве, способны изменять рН почвы до уровня 3,0–3,5. Для нейтрализации необработанных опилок в почве применяют минеральную щелочь, известь, фосфоритную муку. Удаление лигнина из опилок проводится также с целью увеличения их гидрофильности за счёт повышения числа гидроксильных групп [15].

Таким образом, экспериментальный образец биопрепарата представляет собой сухую неоднородную массу, состоящую из жизнеспособных микробных клеток штаммов *P. delhiensis* В-11400 и *R. loti* в соотношении 1:1 в количестве не менее  $4 \cdot 10^9$  клеток на 1 г носителя, являющегося семенами бобового растения лядвенца рогатого, объединённую с делигнифицированными опилками в соотношении 1:1.

Для оценки эксплуатационной характеристики (деструкции ФОС, нефти и нефтепродуктов) разработанного биопрепарата в условиях стендовых испытаний он был объединён с препаратом лиофилизированных бактерий двух видов *P. fluorescens* ЕК – 5–93 и *P. putida* ЕК – 8–14, составляющих основу разработанного ранее биопрепарата [3]. В качестве контроля при проведении стендовых испытаний использовали смесь делигнифицированных опилок с семенами лядвенца рогатого в соотношении 1:1 без добавления микроорганизмов.

Экспериментальная оценка глубины деструкции глифосата в почве двухкомпонентным биопрепаратом (при моделировании натуральных условий процесса рекультивации на испытательном стенде) позволила сделать вывод о том, что процесс деструкции экотоксиканта наиболее выражено происходит в первые сутки эксперимента: к 4 суткам его содержание снизилось до  $11,3 \pm 2,8$  мг/кг (21,7% от исходного количества), а к 13 суткам – до

0,12±0,03 мг/кг, снизившись, таким образом, в 433 раза (при ПДК в почве 0,5 мг/кг). В контрольном эксперименте, в котором не использовались микроорганизмы-деструкторы, снижения содержания глифосата в почве не было установлено.

Эксперименты с сырой нефтью, внесённой в почву, показали, что комплексное воздействие микроорганизмов (а также их ферментов), входящих в состав образца двухкомпонентного биопрепарата, обуславливает на 14 сут эксперимента деструкцию нефти с потерей её нативности примерно на 93%. Оставшиеся неизменными 7% идентифицированных методом капиллярной газовой хромато-масс-спектрометрии компонентов исходной нефти подвергаются комплексному воздействию растительно-микробной ассоциации и в последующем через три недели эксперимента фрагментируются на отдельные алканы с содержанием тяжёлых нефтяных фракций С17–С53 на уровне 15%.

### **Обсуждение результатов**

Известно, что по завершении уничтожения химического оружия будут проведены работы по выведению объектов УХО из эксплуатации, а также по рекультивации их загрязнённых территорий [17]. В частности, на объекте УХО «Марадыковский» Кировской области технология рекультивации загрязнённой территории должна включать дегазацию грунта перекисно-щелочной рецептурой с одновременным разрыхлением с помощью щелереза – рыхлителя-кротователя или машины для глубокого фрезерования земель МТП-44Б. Предполагается, что данная технология рекультивации, независимо от характера загрязнений, позволит произвести полную очистку загрязнённых территорий [17].

Не вдаваясь в подробности методологии определения и контроля остаточных количеств отравляющих веществ и их реакционных масс в почве промплощадки объекта УХО, отметим лишь, что при превышении допустимых норм их содержания, в частности в местах доконвенционного обращения с ХО, возможно использование двух существующих подходов к рекультивации загрязнённых территорий: обезвреживание загрязнённых земельных участков без выемки грунта методом взрыхления с последующим перемешиванием грунта с дегазирующей рецептурой непосредственно в местах загрязнения; выемка почвы и грунта,

их дегазация и термическая обработка вдали от промплощадки объекта УХО с последующим возвращением обезвреженного грунта на место изъятия [17]. Данный комплекс инженерных мероприятий представляет собой технический этап рекультивации, который не отменяет, но предваряет второй – биологический этап, включающий комплекс агротехнических и фитомелиоративных мероприятий. Этот второй этап призван обеспечить улучшение агрофизических, агрохимических, биохимических и других свойств почвы. Биопрепараты являются необходимым составным элементом биологического этапа рекультивации, а микроорганизмы, входящие в состав биопрепаратов, ускоряют процесс разрушения экотоксикантов в почве.

В этой связи, как указано в работе [18], необходимо выбрать наиболее оптимальные с экономической и экологической точек зрения методы санации с учётом особенностей каждого объекта и территории. Целесообразно также, по мнению авторов цитируемой работы, предусмотреть несколько способов (технологий) приведения в безопасное состояние почво-грунтов, оборудования, зданий и сооружений с учётом анализа информации о территории объекта УХО, уровнях и характере химического загрязнения всех расположенных на его территории зданий, сооружений, конструкций, оборудования, коммуникаций, а также данных о состоянии компонентов окружающей среды [18].

Новые возможности в реализации потенциала биотехнологии рекультивации почвы в последние годы связывают с применением биопрепаратов, в состав которых входят микроорганизмы с физиологическими функциями био- и фиторекультивации. В частности, микроорганизмы ризосферы растений (так называемые PGPR-бактерии) играют ведущую роль в деградации экотоксикантов в процессе рекультивации. В самой технологии фиторекультивации используют ассоциированные с растениями микроорганизмы. Данные ассоциации можно создать искусственно, объединив вместе в одном биопрепарате семена бобовых растений с живыми лиофилизированными микроорганизмами – деструкторами экотоксикантов.

Указанный научно обоснованный подход был реализован в технологии двухкомпонентного биопрепарата, который может быть использован на территории объекта УХО «Марадыковский» и на других техногенных территориях. Объединение двух компонентов, хранящихся при оптимальных условиях, в единый биопрепарат, осуществляется по запросу. Последующее внесение двухкомпонентного

биопрепарата в почву может быть осуществлено с использованием сеялки зернотукотравяной СЗТ-3,6А (или её аналога), предназначенной для рядового посева семян зерновых и зернобобовых культур как отдельно, так и одновременно с посевом сыпучих и несипучих семян трав с внесением в засеваемые рядки гранулированных минеральных удобрений, которые заменяют на двухкомпонентный биопрепарат.

Безусловно, использование разработанного биопрепарата для целей биотехнологии рекультивации почвы будет осуществляться в соответствии с планом проведения реабилитационных мероприятий, согласованным с органами государственного контроля в области природоохранной и санитарной деятельности [18].

### Заключение

После уничтожения запасов химического оружия главной задачей является проведение работ по обезвреживанию и оздоровлению высвободившихся объектов УХО и передачи их для перепрофилирования. В ходе санации и рекультивации почв промышленной зоны объекта могут быть использованы различные технологии, среди которых могут применяться биотехнологические методы. В течение последних трёх лет выполнен комплекс исследований, связанных с оценкой возможности создания новой формы двухкомпонентного биопрепарата, объединяющего бактерии *P. fluorescens* ЕК-5-93 и *P. putida* ЕК-8-4 – эффективных деструкторов ФОС и углеводородов нефти, с клубеньковыми бактериями *R. loti*, семенами нефтотолерантного бобового растения лядвенца рогатого *L. corniculatus*, а также с бактериями штамма-деструктора экотоксикантов *P. delhiensis* В-11400 в составе растительно-микробной ассоциации. Двухкомпонентный биопрепарат в новой форме с расширенным спектром деградативной активности биосовместимых, экологически безопасных микроорганизмов природного происхождения в ассоциации с семенами бобового растения в результате синергидного эффекта входящих в его состав биологически активных компонентов может быть использован для санации территории промплощадки объекта УХО «Марадыковский».

*Работа выполнена в рамках Госзадания по проекту № 863 (2016 г.).*

*Работа выполнена в рамках НИР «Оценка последствий антропогенного воздействия на природные и трансформированные экосистемы подзоны*

*южной тайги» (номер государственной регистрации 115020310080), включенных в государственное задание ИБ Коми НЦ УрО РАН на 2016 г.*

### Литература

1. Шаров С.А., Ашихмина Т.Я. Адаптация микробных биотехнологий ремедиации почв к реальным объектам санации // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 60–62.
2. 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 био-препарата деструктора фосфорорганических соединений // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 51–59.
3. Туманов А.С., Ашихмина Т.Я., Лещенко А.А., Погорельский И.П., Шаров С.А., Тетерин В.В., Лазыкин А.Г., Филимонова Г.В., Ежов А.В., Пермяков Р.Г. Биопрепарат с расширенным спектром биодеградативной активности для рекультивации почвы объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 61–69.
4. Иванова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Биодеградация нефти микробно-растительными ассоциациями // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 191–197.
5. Ашихмина Т.Я., Тимонов А.С., Кантор Г.Я., Пантелеева О.Г., Домнина Е.В., Дабах Е.В., Огородникова С.Ю., Новойдарский Ю.В., Титова В.А. Изучение воздействия объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский» на состояние природных сред и объектов // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 88–95.
6. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токси-кантов в высших растениях / Под ред. В.О. Попова. М.: Наука, 2005. 199 с.
7. Патент РФ № 2575063. МКП С12N 1/20, С09С 1/10, С12R 1/38. Штамм бактерий *Pseudomonas delhiensis* – деструктор нефти и нефтепродуктов / К.Е. Гаврилов, И.В. Дармов, Т.С. Кардакова, А.Г. Лазыкин, Е.А. Коновалова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет». Оpubл. 10.02.2016. Бюл. № 4.
8. Авторское свидетельство на изобретение СССР № 1036718. МКП С05 F11/08. Штамм клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus*) для производства бактериального удобрения астрагал / А.Т. Новикова, В.Л. Князева, А.П. Кожемяков, Н.Г. Орищенко; заявитель ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии. Оpubл. 23.12.1991. Бюл. № 47.
9. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.
10. Коцеев К.А. Имобилизованные клетки микроорганизмов и их применение // Промышленная микробиология. Учебное пособие для вузов. М.: Высшая школа, 1989. С. 216–235.
11. Филина Н.А. Исследование сорбционных свойств древесных отходов для сбора нефтепродуктов с последую-



щей утилизацией их в виде топливных брикетов: Автореф. дис.... канд. техн. наук. Пенза, 2011. 22 с.

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

13. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: Пособие для вузов. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 208 с.

14. Киреева Н.А., Водопьянов В.В. Мониторинг растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязнённых почв // Экология и промышленность России. 2007. сентябрь. С. 46–47.

15. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Серебренникова М.К. Оптимизация процесса иммобилизации клеток алканотрофных родококков на хвойных опилках в условиях колоночного биореактора // Вестник Пермского университета. 2010. Вып. 1 (4). С. 69–72.

16. Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моргунов П.А. Очистка нефтезагрязнённых почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов НАФТОКС 12-Р и НАФТОКС 48-У // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т. 9. № 2. С. 1–18.

17. Исаева А.Ю., Романов В.С., Белов Ю.А. Различные подходы к рекультивации загрязнённых территорий в рамках выполнения ликвидационных мероприятий на бывших объектах по хранению химического оружия // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 117–120.

18. Новойдарский Ю.В., Ашихмина Т.Я., Широких И.Г., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю. Методические аспекты проведения работ по подготовке объектов хранения и уничтожения химического оружия к мероприятиям по выводу их из эксплуатации // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 4. С. 100–104.

## References

1. Sharov S.A., Ashikhmina T.Ya. Adaptation of soil remediation biotechnologies to real objects of rehabilitation // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2014. № 4. P. 60–62 (in Russian).

2. Styazhkin K.K., Tumanov A.S., Ashikhmina T.Ya., Kolesnikov D.P., Teterin V.V., Pogorelsky I.P., Leshchenko A.A., Lazykin A.G., Ziganshin A.R. Experimental evaluation of microbicidal and degradative potential of biological product of destructor of organophosphorus compounds // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2014. № 4. P. 51–59 (in Russian).

3. Tumanov A.S., Ashikhmina T.Ya., Leshchenko A.A., Pogorelsky I.P., Sharov S.A., Teterin V.V., Lazykin A.G., Filimonova G.V., Ezhov A.V., Permyakov R.G. Biological product with spread spectrum of biodegradative activity for soil remediation at the facility for destruction of chemical weapons «Maradykovskiy» // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2015. № 3. P. 61–69 (in Russian).

4. Ivanova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Biodegradation of oil by microbe-plant associations // *Prikladnaya biochimia i microbiologia*. 2015. V. 51. № 2. P. 191–197 (in Russian).

5. Ashikhmina T.Ya., Timonov A.S., Kantor G.Ya., Panteleeva O.G., Domnina E.V., Dabakh E.V., Oгородникова S.Yu.,

Novoydarsky Yu.V., Titova V.A. The study of the impact of the facility for destruction of chemical weapons «Maradykovskiy» on natural environments and objects // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2015. № 3. P. 88–95 (in Russian).

6. Kvesitadze G.I., Khatishashvili G.A., Sadunishvili T.A., Evstigneeva Z.G. Metabolism of anthropogenic toxicants in higher plants / Ed. V.O. Popov. M.: Nauka, 2005. 199 p. (in Russian).

7. Patent of Russian Federation № 2575063. INC C12N 1/20, C09C 1/10, C12R 1/38. The strain of bacteria *Pseudomonas delhiensis* – destructor of oil and oil products / K.E. Gavrilov, I.V. Darmov, T.S. Kardakova, A.G. Lazykin, E.A. Konovalova; the applicant and patentee Vyatka State University. Publ. 10.02.2016. Bull. № 4 (in Russian).

8. Inventor's certificate USSR № 1036718. INC C05 F11/08. The strain of nodule bacteria *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus*) for the production of bacterial fertilizer *Astragalus* / A.T. Novikova, V.L. Knyazeva, A.P. Kozhemyakov, N.G. Orishchenkov; the applicant Institute of Agricultural Microbiology. Publ. 23.12.1991. Bull. № 47 (in Russian).

9. Sinityn A.P., Raynina E.I., Lozinsky V.I., Spasov S.D. Immobilized microbial cells. M.: MGU Press, 1994. 288 p. (in Russian).

10. Koshcheenko K.A. Immobilized microbial cells and their application // *Industrial Microbiology. Textbook for high schools*. M.: Higher School, 1989. P. 216–235. (in Russian).

11. Filina N.A. The study of sorption properties of wood waste for collection and subsequent disposal of petroleum products in the form of briquettes: Author. dis. cand. tech. sciences. Penza, 2011. 22 p. (in Russian).

12. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological researches. L.: Medgiz, 1962. 280 p. (in Russian).

13. Egorova T.A., Klunova S.M., Zhivukhina E.A. Fundamentals of biotechnology: a guide for high schools. M.: Publishing Center «Academy», 2003. 208 p. (in Russian).

14. Kireeva N.A., Vodopyanov V.V. Monitoring of plants used for phytoremediation of oil contaminated soils // *Ekologia i promyshlennost' Rossii*. 2007. september. P. 46–47 (in Russian).

15. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K. Optimization of the immobilization of cells of alkanotrophic rhodococcus on sortwood sawdust under a column bioreactor // *Vestnik Permskogo universiteta*. 2010. V. 1 (4). P. 69–72 (in Russian).

16. Rogozina E.A., Timergazina I.F., Morgunov P.A. Purification of oil contaminated soils using bacteria of the genus *Pseudomonas* – the basis of biological products Naftoks 12-R and Naftoks 48-U // *Neftegazovaya geologia. Teoria i praktika*. 2014. V. 9. № 2. P. 1–18 (in Russian).

17. Isaeva A.Yu., Romanov V.S., Belov Yu.A. Different approaches to the remediation of contaminated areas in the framework of the liquidation activities at the sites of former chemical weapons storage // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2015. № 3. P. 117–120 (in Russian).

18. Novoydarsky Yu.V., Ashikhmina T.Ya., Shirokikh I.G., Domracheva L.I., Oгородникова S.Yu. Methodological aspects of the work on preparation of facilities of storage and destruction of chemical weapons to decommissioning // *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*. 2014. № 4. P. 100–104 (in Russian).