

Микробная биотехнология рекультивации почвы для санирования и устойчивого функционирования техногенной экосистемы

© 2017. А. А. Лещенко¹, д. т. н., профессор,
 И. П. Погорельский¹, д. м. н., профессор,
 Т. Я. Ашихмина^{1,3}, д. т. н., профессор, зав. кафедрой, зав. лабораторией,
 И. А. Лундовских¹, к. х. н., доцент, И. В. Дармов¹, д. м. н., профессор, зав. кафедрой,
 С. Н. Янов¹, д. б. н., профессор, А. Г. Лазыкин¹, к. б. н., доцент,
 М. Р. Шабалина¹, к. п. н., доцент, И. А. Устюжанин², к. с-х. н., зам. директора,
 С. А. Шаров¹, аспирант, Г. М. Рычков¹, бакалавр,
¹Вятский государственный университет,
 610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,
²Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства
 Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого РАСХН,
 610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, 166-а,
³ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
 167982, Россия, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28,
 e-mail: ipogorelsky@inbox.ru

В соответствии с Федеральным законом «Об уничтожении химического оружия» объекты по уничтожению запасов химического оружия (УХО) являются федеральной собственностью и подлежат перепрофилированию в интересах обороны и безопасности страны. В связи с этим как на этапе вывода объекта из эксплуатации, так и при выполнении работ по ликвидации последствий его деятельности, необходимо проведение комплекса реабилитационных мероприятий и, следовательно, проблема рекультивации и санации почвы в месте функционирования объекта УХО «Марадыковский» после принятия решения по его перепрофилированию со всей очевидностью становится актуальной и может включать этап с использованием биопрепаратов. Результаты многолетнего биомониторинга свидетельствуют о том, что объект не оказал негативного воздействия на природные экосистемы. В статье рассматриваются существующие научно-практические подходы для проведения комплекса реабилитационных мероприятий, в частности, нового ферментативного и микробиологического подходов, являющихся базой экологической биотехнологии рекультивации и санирования техногенной экосистемы объекта. Проанализированы результаты комбинированного использования гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазы, гидролизующей фосфорорганические соединения (ФОС), и биокатализатора в виде иммобилизованных клеток бактерий рода *Pseudomonas*, осуществляющего метаболическое разложение метилфосфоновой кислоты в процессах биодеструкции фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) и продуктов их гидролиза в составе реакционных масс, образующихся в результате химического уничтожения ФОВ.

Представлены данные об использовании растительно-микробной ассоциации клубеньковых бактерий *Rhizobium loti*, бактерий штамма-деструктора нефти и нефтепродуктов *Pseudomonas delhiensis* VG-11 с бобовым растением лядвенцом рогатым (*Lotus corniculatus*) и сочетания данной ассоциации с биодеградативным потенциалом псевдомонад – деструкторов ФОС – *Pseudomonas fluorescens* VG-5 и *Pseudomonas putida* VG-8 в составе единого двухкомпонентного биопрепарата. Апробация двухкомпонентного биопрепарата в микрополевых экспериментах свидетельствует о возможности практического использования его потенциала в биотехнологии рекультивации почвы на объекте УХО «Марадыковский».

Ключевые слова: рекультивация, экотоксикант, органофосфатгидролаза, биокатализаторы, микроорганизмы, растительно-микробная ассоциация, биодеструкция.

Microbial biotechnology of soil remediation for sanitation and sustainable functioning of the technogenic ecosystem

A. A. Leshchenko¹, I. P. Pogorelsky¹,
 T. Ya. Ashikhmina^{1,3}, I. A. Lundovskikh¹,
 I. V. Darmov¹, S. N. Yanov¹, A. G. Lazykin¹, M. R. Shabalina¹,
 I. A. Ustyuzhanin², S. A. Sharov¹, G. M. Rychkov¹,

¹Vyatka State University,

36 Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

²N.V. Rudnitsky Zonal North-East Agricultural Research Institute,

166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,

³Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,

28 Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: ipogorelsky@inbox.ru

In accordance with the federal law On Chemical Weapons Destruction, chemical weapons destruction plants (CWD) are a federal property and are subject to redevelopment in the interests of national defense and security. In this regard, both at the stage of decommissioning and during liquidation of activities, it is necessary to carry out a complex of rehabilitation measures. Consequently, the problem of reclamation and sanitation of soil at the site of operation of the "Maradykovsky CWD plant after the decision of its reorientation evidently will be relevant and may include a biological stage of using biopreparations. The results of biomonitoring indicate that the plant did not have a negative impact on natural ecosystems. The article considers the existing scientific and practical approaches for carrying out a complex of rehabilitation measures: new enzymatic and microbiological approaches, which are the basis of ecological biotechnology of reclamation and sanitation of the technogenic ecosystem of the plant. The results are analyzed of the combined use of hexahistidine-containing organophosphate hydrolase hydrolyzing organophosphorus compounds (OPC) and the biocatalyst in the form of immobilized cells of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which performs metabolic decomposition of methylphosphonic acid in the process of biodegradation of organophosphorus toxic agents and their hydrolysis products in the reactionary masses formed as a result of chemical destruction of OPC. The data are presented on the use of the plant-microbial association of nodule bacteria *Rhizobium loti*, the oil and petroleum products destructor strain *Pseudomonas delhiensis* VG-11 with leg corn plant (*Lotus corniculatus*), and the combination of this association with a biodegradative potential of *Pseudomonas fluorescens* VG-5 and *Pseudomonas putida* VG-8 – destructors of POC as a part of a single two-component biopreparation. Approval of the two-component biopreparation in microfield experiments indicates the possibility of practical use of its potential in biotechnology of soil remediation at the "Maradykovsky" CWD plant.

Keywords: recultivation, ecotoxicants, organophosphate hydrolase, biocatalysts, microorganisms, plant-microbial association, biodegradation.

В 2015 г. на объекте уничтожения химического оружия (УХО) «Марадыковский» был ликвидирован последний боеприпас с отравляющим веществом из хранящихся в арсенале. Внедрение и сертификация системы экологического менеджмента на природной и техногенной территории объекта УХО, создание и функционирование многоуровневых систем производственного контроля, а также государственного экологического контроля и мониторинга, в значительной степени обеспечили необходимую эффективность природоохранной деятельности [1]. Результаты исследования экологического состояния территории объекта УХО «Марадыковский» и участков мониторинга с использованием широкого спектра современных методов обследования и репрезентативных показателей свидетельствуют об отсутствии опасных превышений ПДК загрязняющих веществ в природных средах и объектах окружающей среды [2]. Влияние объекта УХО проявилось лишь в накоплении соединений фосфора в эпифитных лишайниках на участках мониторинга, ближайших к объекту УХО [3]. В то же время, по мнению специалистов, нельзя исключить возможность отсроченного действия загрязняющих веществ на окружающую среду [4]. Такая

возможность подлежит обязательному рассмотрению, исходя из аккумулялирующей функции почвенной микробиоты. После воздействия на почву химических соединений, образующихся в ходе выполнения специального комплекса инженерно-технических мероприятий по обезвреживанию и приведению в безопасное состояние инфраструктуры объекта и технического оборудования, контактировавшего с отравляющими веществами, а также дегазирующими рецептурами, территория объекта УХО окажется малоприспособленной для жизни, по крайней мере для многих почвенных обитателей. Данное обстоятельство служит императивом для экологизации реабилитационных мероприятий, обеспечивающих более действенную санацию территории объекта УХО.

Как известно, в экологии одним из самых сложных вопросов является соотношение между видовым биоразнообразием и устойчивостью биотических сообществ и экосистем. Функционирование объекта УХО «Марадыковский» в определенной степени привело к снижению или исчезновению из экосистемы одного или нескольких видов, образующих консорцию, за которыми, естественно, последовало «исчезновение консорбентов, не входящих в другие консорции той же или другой

территориально и функционально близкой экосистемы» [5]. Поэтому очень важно произвести отбор проб почвы с загрязнённой территории и установить жизнеспособность природных микроорганизмов. При этом микробиологический анализ почвы должен быть частью комплексного обследования для последующего формирования полноценной характеристики территории объекта УХО. Как следует из опубликованных в работе материалов [4], тщательное обследование территории объекта УХО, мест бывшего производства, хранения, уничтожения отравляющих веществ является существенным для установления типа токсического соединения, обнаруженного на загрязнённой территории, его концентрации, глубины проникновения экотоксиканта в почву; типа почвы, её влажности, кислотности и процентного содержания гумуса; предполагаемого количества осадков, выпадающих на данной территории; наличия и глубины залегания грунтовых вод; определения загрязнённости вод.

Итоги проведения такого комплексного обследования следует рассматривать в качестве естественного дополнения к результатам анализов фондовых материалов, а также к результатам полевого обследования, в ходе которых было установлено, что за период строительства и эксплуатации объекта УХО территория вблизи полигона подвергалась изменению вследствие изъятия грунта, вырубки леса, планировки местности, движения транспорта, строительства дамб и дорог. Проводилась также расчистка леса вокруг объекта УХО с вырубкой подлеска, наблюдалось постепенное зарастание ранее существующих просек, сохранились следы ветровалов [2]. Безусловно, что при проведении таких масштабных строительных, мелиоративных и других видов работ, коренным образом изменивших природный ландшафт места дислокации объекта УХО, нельзя было обойтись без нефтепродуктов и, как следствие, их проливов на почву. Нефть и нефтепродукты лишь добавляют остроту проблеме по рекультивации почвы и ставят её решение в зависимость от общей стратегии санации территории объекта УХО.

Известно, что в соответствии с Федеральным законом «Об уничтожении химического оружия» объекты УХО являются исключительно федеральной собственностью и управляются в установленном порядке. После приведения в надлежащее состояние их предлагается использовать в первую очередь для нужд обороны и безопасности страны, а

в случае отсутствия такой потребности они будут вовлечены в хозяйственный оборот в интересах региона их расположения [1]. В настоящее время на этапе вывода объекта УХО «Марадыковский» из эксплуатации главной задачей является проведение работ по обезвреживанию и санации высвободившихся корпусов и передачи их для репрофилирования инвесторам. Реализация этих мероприятий должна осуществляться в рамках подпрограммы «Ликвидация последствий деятельности объектов по хранению и объектов по уничтожению химического оружия в Российской Федерации на 2019–2024 гг.». Есть все основания надеяться на то, что при проведении санации территории объекта УХО будут обязательно учтены данные экологического мониторинга территории объекта и без внимания не останутся имеющиеся результаты проведения комплексного её обследования. И, конечно же, должна быть разработана и утверждена технология очистки загрязнённых территорий объекта с учётом того, что загрязнения могут быть причиной таких последствий, как торможение почвообразовательных процессов и самоочищения почвы, значительного изменения видового состава и жизнеспособности почвенной микробиоты, накопления вредных веществ в окружающей среде, которые прямо или опосредованно могут оказывать влияние на здоровье человека. Вся эта информация, особенно характеризующая жизнеспособность природных микроорганизмов, крайне необходима для успешного осуществления биологического этапа рекультивации почвы. Почвенная микробиота должна рассматриваться как необходимый естественный элемент и активный участник биотехнологии рекультивации почвы на объекте УХО. Но именно жизнеспособность природных микроорганизмов ставится под сомнение в случае использования разработанной применительно к условиям объекта УХО «Марадыковский» технологии «рекультивации загрязнённой территории» [6]. Суть её заключается в дегазации грунта перекисно-щелочной рецептурой с одновременным рыхлением с помощью щелереза-рыхлителя-кратователя или машины для глубокого фрезерования земель МТП-44Б. При этом норма расхода перекисно-щелочной рецептуры должна составить до 100 л на 1 м². Данная рецептура, по заявлению разработчиков [6], эффективна как для обеззараживания (дегазации) отравляющих веществ, так и продуктов их детоксикации, и применима независимо от

характера загрязнений. Прогнозируется, что технология позволит произвести гарантированную очистку загрязнённой территории. С точки зрения специалиста по ликвидации последствий деятельности объекта УХО, данная технология вполне вписывается в общий план мероприятий по перепрофилированию объектов УХО. Но с точки зрения эколога, а тем более микробиолога, применение такого способа очистки загрязнённой территории – это явное нарушение принципа экологической адекватности, поскольку вследствие воздействия значительных количеств перекисно-щелочной рецептуры произойдёт «микрoэкологическая катастрофа» локального масштаба: будет на длительное время уничтожена почвенная микробиота вместе с почвенным покровом [7]. А уничтожение почвенного покрова, являющегося важнейшим сорбционно-химическим барьером на пути миграции экотоксикантов из атмосферы в грунтовые воды и реки – это крайняя степень деградации почвы. Кроме того, при таком подходе к рекультивации будет полностью проигнорирована эколого-микробиологическая концепция охраны почв от химического загрязнения [7].

Таким образом, эколого-микробиологическая концепция охраны почв от химического загрязнения однозначно фиксирует существенную роль микроорганизмов (почвенных, в том числе фотосинтезирующих микробов, водорослей и цианобактерий) в процессах биологической реабилитации почвы. К сожалению, в настоящее время почва как среда обитания микробиоты претерпевает значительные, а порой невосполнимые, негативные изменения. Уже сейчас ясно, что природная среда сохранилась там, где она была недоступна людям для «успешного» преобразования: это суровые, малопродуктивные для жизни земли с экстремальными для человека условиями существования. Тенденция этих изменений такова, что темпы разрушения почвенного покрова значительно выше, чем скорость образования, а в некоторых странах Европы они приобрели угрожающие масштабы [8]. К этому следует добавить, что для формирования 1 см почвенного слоя требуется в зависимости от условий от 10 до 50 лет. В то же время под монокультурой, например, кукурузы, дефляция почвы идёт со скоростью 1,3 см в год, т. е. во много раз быстрее почвообразования. Естественно, что вслед за прямым уничтожением видов, в том числе представителей микромира, неизбежно может наступить самодеструкция живого. В

этой связи на начальном этапе рекультивации почвы необходимо определиться с выбором щадящего способа обеззараживания и рекультивации почвы территории объекта, эффективность которого соответствовала бы основному принципу медицины, который сформулировал Гиппократ, – «Noli nocere!» («Прежде всего – не навреди!»).

Проблема рекультивации и санации почвы в месте функционирования объекта УХО «Марадыковский» после принятия решения по его перепрофилированию со всей очевидностью стала актуальной. Рекультивация почвы – это комплекс инженерных и санитарно-гигиенических мероприятий, предусматривающих улучшение (восстановление) свойств грунтов в целях исключения физического и химического негативного воздействия на окружающую природную среду [9]. В процессе восстановления исходного состояния земельных участков, загрязнённых экотоксикантами, необходимо осуществлять следующие мероприятия по охране окружающей среды: произвести деградацию экотоксикантов, ликвидировать при необходимости 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, создающих необходимые условия для дальнейшего использования рекультивированных земель по целевому назначению или для проведения мероприятий по восстановлению почвы. 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 [9, 10]. Таким образом, биорекультивации – это оптимизация физико-химических и биологических факторов очищения почвы. Сам же этап биорекультивации должен выполняться после завершения технического этапа. Суть этапа биорекультивации заключается в подготовке почвы, внесении удобрений и биопрепаратов, 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, биопрепараты, содержащие микроорганизмы-деструкторы, являются составной частью биологической рекультивации, которая призвана ускорить процесс разрушения экотоксикантов в почве [11, 12], и биологический этап её реализации совершенно естественен. Разработка биотехнологии экологически безопасной санации почвы *in situ* в сравнении с физическими, химическими и физико-химическими способами рекультивации почвы является относительно новым направлением научных исследований. Его становление стало возможным благодаря накоплению знаний в таких областях науки, как общая биология, микробиология, в том числе сельскохозяйственная, энзимология, биотехнология, экология, аналитическая химия и ряд других, для которых микроорганизмы являются объектом теоретических и прикладных исследований. Итогом многолетних комплексных междисциплинарных исследований стало признание биотехнологических способов и методов очистки и восстановления почвы, предусматривающих применение бактерий и/или продуцируемых ими ферментов. При этом следует отметить, что микроорганизмы-деструкторы достаточно широко распространены в почве, где создаются все необходимые условия для их адаптации ко многим экотоксикантам, а также для роста и размножения. Однако при кажущейся многочисленности и многообразии встречающихся в природе видов микроорганизмов крайне трудно выделить из окружающей среды штамм бактерий, пригодный по эксплуатационным характеристикам для целей рекультивации почвы той территории, где осуществлялась деятельность объекта УХО «Марадыковский». Известно, что не существует бактерий одного вида, которые бы в одиночку осуществляли биodeградацию экотоксикантов. Поэтому крайне важно иметь в коллекции несколько видов таких микроорганизмов-синергистов, которые были бы биосовместимыми и в то же время высокоэффективными деструкторами ФОВ. По понятным причинам микроорганизмы в естественных условиях их обитания не встречаются с такого рода экотоксикантами и не могут быть адаптированы к ним, что создаёт определённые трудности для выделения природных мутантных штаммов бактерий-деструкторов ФОВ. На помощь пришли методы генетики и селекции, генной инженерии, благодаря которым создана необходимая микробиологическая и ферментативная база

экологической биотехнологии деструкции продуктов детоксикации отравляющих веществ [12].

По принятым в России технологиям уничтожения ФОВ, в получаемых реакционных массах остаётся часть неразложившихся фосфорорганических соединений, сохраняющих нейротоксичную активность [13]. В зависимости от конкретной ситуации, складывающейся на начало проведения комплекса реабилитационных мероприятий и санации почвы в районе функционирования объекта УХО «Марадыковский» после принятия решения по его перепрофилированию, реализация биотехнологических подходов может быть осуществлена в процессе выполнения следующих основных мероприятий:

- обработки почвы *in situ* путём стимулирования природных микроорганизмов-деструкторов, аэрации и введения в почву питательных веществ;
- внесении в почву биокатализаторов на основе ферментов, суспензий или лиофилизированных бактерий-деструкторов, а также иммобилизованных ферментов и бактерий-деструкторов или консорциумов микроорганизмов;
- обработки почвы иммобилизованными ферментными препаратами бактерий-деструкторов, устойчивыми к большим концентрациям экотоксикантов;
- внесении (интродукции) в почву биопрепаратов, сконструированных на основе специализированных микроорганизмов или микроорганизмов в составе растительно-микробных ассоциаций.

В условиях незначительного загрязнения почвы, по-видимому, достаточно будет использовать обычные агротехнические приёмы с внесением необходимых минеральных удобрений, способствующих быстрому самоочищению почвы [12–14]. В случае более интенсивного загрязнения почвы экотоксикантом и глубокого проникновения его в почву надеяться исключительно на самоочищение почвы будет неправильно. Единственным выходом из этой ситуации является «доочистка» реакционных масс, образующихся в процессе уничтожения отравляющих веществ, а образовавшиеся продукты детоксикации должны соответствовать нормативам токсикологической и экологической безопасности, т. е. разложение фосфонатов должно быть максимальным [14]. Данное требование является научно обоснованным, поскольку имеются опубликованные данные о том, что токсичные эфиры метилфосфоновой

кислоты устойчивы к деградации почвенной микробиотой и их удаётся обнаружить даже спустя десятилетия на глубине свыше 1 м [15]. Таким образом, биodeградация таких глубоко проникших в почву экотоксикантов может быть осуществлена с использованием специализированных микроорганизмов на этапе её биологической рекультивации.

Можно условно выделить два направления экологической биотехнологии санации почвы. Одно направление связано с использованием бактериальных ферментов, иммобилизованных клеток бактерий-деструкторов или их консорциумов, а второе направление – с применением для рекультивации почвы биопрепаратов на основе микроорганизмов-деструкторов или на основе растительно-микробных ассоциаций. В обоих случаях реализуются на практике потенциальные возможности микроорганизмов-деструкторов разлагать содержащиеся в получаемых реакционных массах остаточные количества фосфорорганических соединений, сохраняющих нейротоксичную активность [12, 14]. Известно, в частности, несколько ферментов микроорганизмов, ответственных за деструкцию С-Р связи: фосфонатаза, фосфоноацетатгидролаза, фосфонопируватгидролаза, а также полиферментный комплекс С-Р-лиаза. Только последний полиферментный комплекс обладает способностью расщеплять алкилфосфонаты с неактивированной С-Р связью, тогда как первые три фермента активны в отношении небольшого числа фосфонатов с активированной С-Р связью. Особо следует отметить такую характерную особенность С-Р-лиазы, как проявление её специфической активности исключительно в клетках грамтрицательных бактерий [14]. Важно также и то, что С-Р-лиаза в клетках кишечной палочки кодируется четырнадцатью генами *phn* оперона; сам оперон конститутивный, зарепрессированный и в присутствии органического фосфора неактивный, а сам полиферментный комплекс С-Р-лиаза собирается на наружной мембране и с нею связан [16]. Именно поэтому активность С-Р-лиазы никогда не была обнаружена в бесклеточных лизатах, что в определённой степени препятствовало внедрению в практику ферментативной деградации фосфорорганических соединений [17–23]. Выход был найден лишь через 10 лет интенсивных научных исследований, направленных на поиск источников выделения ферментов, активных по отношению к фосфонатам и продуктам их разрушения [19–23]. Планомерные

целенаправленные исследования в данном направлении на первом этапе были связаны с получением и изучением свойств фермента органофосфатгидролазы (ОРН), на основе которого затем, на втором этапе исследований, при введении гексагистидиновой (His_6) последовательности в N-конец молекулы ОРН (His_6 -ОРН) был получен рекомбинантный фермент, проявивший высокую каталитическую активность по отношению к различным ФОВ, и наконец третий этап исследований был связан с получением иммобилизованного в гелеобразующем сорбенте фермента His_6 -ОРН, способного катализировать расщепление С-Р связи и осуществлять деструкцию как высокотоксичных отравляющих веществ, так и первичных продуктов их гидролиза до образования фосфорной кислоты (т. е. проводить минерализацию фосфорорганических токсичных соединений).

Использованию препаратов на основе иммобилизованных ферментов для санации почвы способствуют следующие их качества: гидролитический ферментативный процесс может быть осуществлён в нейтральных, слабощелочных и слабощелочных средах; скорость реакции минерализации достаточно высока, в силу чего достигается конверсия экотоксиканта в ограниченные промежутки времени; ферментативная нейтрализация является важным звеном экологически безопасной детоксикации ФОС; ферменты совместимы с биологическими системами, что обеспечивает экологическую безопасность самого процесса ферментативного разрушения продуктов деструкции отравляющих веществ, которыми может быть загрязнена почва [12–14, 18–23].

Созданные препараты на основе иммобилизованных ферментов для санации почвы перспективны при разложении реакционных масс в экологически безопасных условиях (без применения сильных химических окислителей и концентрированных щелочных растворов). В технологическом плане они не требуют создания высоких температур, повышенного давления и использования оборудования, изготовленного из дорогостоящих коррозионно-стойких материалов [13, 14].

В настоящее время разработана технология, в которой используется эффективный комбинированный биокатализатор в виде фермента гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы (His_6 -ОРН) и иммобилизованных клеток псевдомонад (*Pseudomonas* sp.) деструкторов ФОС для решения таких сложных экологических задач, к которым

относится детоксикация почвы с остаточным количеством ФОВ. Способность эффективно функционирования разработанных биокатализаторов в сложных по химическому составу системах открывает новые возможности для биокаталитического, экологически безопасного решения проблем, связанных с деструкцией ФОВ и продуктов их деградации [12, 14, 19–23]. Таким образом, разработка и использование ферментного комплекса His₆-ОРН является одним из эффективных путей решения проблемы глубокого разложения фосфонатов.

Другим направлением экологической биотехнологии санации почвы на территории объекта УХО при его перепрофилировании является использование специально созданных биопрепаратов на основе так называемой аборигенной микрофлоры, т. е. микроорганизмов, выделенных из мест их естественной адаптации к экотоксикантам на территории объекта УХО. Данное обстоятельство даёт возможность в полной мере проявить микроорганизмам их биодеградативный потенциал в отношении широкого спектра экотоксикантов, в том числе в отношении остаточных количеств реакционных масс и продуктов детоксикации, образующихся при нейтрализации ФОВ. Микроорганизмы-деструкторы в составе биопрепарата в процессе хранения самого препарата хоть и находятся в лиофилизированном состоянии, но своей жизнеспособности они не теряют. Восстановив свою жизнеспособность после интродукции в почву, они способны взаимодействовать с почвенной микробиотой. Эта констатация отражает тот факт, что в составе экосистем и биосферы в целом имеются виды различного геологического возраста – «экогеноэлементы» экосистем [5]. Трансформирующие воздействия человеческой деятельности в общепланетарном масштабе дают основание предполагать возможность существования нисходящей ветви эволюции биосферы, а в региональных рамках – изменение такой комплексной формы поведенческой реакции микроорганизмов, как афилиация, что может проявиться нарушением клеточной агрегации и постадийной биодеструкции экотоксикантов. Таким образом, имеются определённые трудности, которые неизбежно возникают при изучении и поддержании устойчивости природных экосистем. Их преодоление возможно при условии соблюдения одного из основных экологических принципов (принципа Р. Риклефса): эффективность сообщества и его стабильность возрастают

прямо пропорционально той степени, в которой составляющие её популяции в процессе эволюции приноровились друг к другу [24]. Согласно данному принципу интродуцируемые в природную экосистему микроорганизмы, осуществляя биодеструкцию сложных по химическому составу реакционных масс, не должны нарушать динамическое равновесие между всеми компонентами в составе экосистем, поскольку именно видовое разнообразие обеспечивает стабильность экосистем. Таким образом, принцип Р. Риклефса, применённый к интродуцируемым видам микроорганизмов, используемым в биотехнологии рекультивации почвы, налагает на них и их биологические свойства определённые ограничительные рамки. Микроорганизмы не должны быть экологически чужеродными (т. е. должны относиться к так называемой аборигенной микрофлоре); они должны быть экологически безопасными, непатогенными, генетически однородными (в плане стабильности генов биодеструкции экотоксикантов), совместимыми друг с другом и с почвенными микроорганизмами, а также обладать таким важным свойством, как элиминация из экосистемы при полной деградации субстрата биодеструкции. Элиминация микроорганизмов-деструкторов из экосистемы имеет существенное значение для предотвращения процесса «депривации» микробного сообщества. Депривация или упрощение может происходить на фоне интенсивного размножения интродуцированного вида микроорганизмов, что сужает возможности менее конкурентоспособных видов и тем самым ведёт к их исчезновению или к видоизменению экологических ниш функционально близких видов, создавая предпосылки для сохранения их численности или, наоборот, массового размножения («принцип незваного гостя»); при этом может измениться всё сообщество, включая даже как будто бы не связанные с внедрившимся видом формы [5].

В естественных условиях функционирования экосистем возможны изменения количества и качества одного из экологических компонентов, ведущие к замене одной экосистемы другой, при этом не всегда желательной. Как правило, природные изменения экологических компонентов бывают непродолжительными и не выходят за рамки нормы реакции экосистемы. Искусственные изменения нередко бывают перманентными, отнюдь не всегда соотносятся с «выносливостью» экосистем и часто приводят к их деградации. Экологическая надёжность (устойчивость) экосистемы, её

способность к самовосстановлению и саморегуляции (в пределах естественных колебаний) зависит от её положения в иерархии природных образований, степени взаимодействия её компонентов и элементов (их экологической комплементарности, конгруэнтности, равновесия, экологической корреляции и оптимальности в компонентой дополнительности), а также от частных приспособлений организмов (размеры, продолжительность жизни, скорость смены поколений, отношение продуктивности к биомассе и т. д.), составляющих биоту экосистемы [5]. Разнообразие, сложность и другие характеристики экосистемы имеют неоднозначное значение и зависят от эволюционной сукцессионной зрелости. Безусловно, такие тонкие качественные изменения структуры экосистемы нельзя учесть во всей полноте, когда речь идёт о санации почвы длительно функционирующего объекта УХО. Однако, несмотря на определённые различия, у экосистем имеются универсальные механизмы, которые обеспечивают их устойчивое функционирование. Именно знание и учёт этих механизмов позволили применить на практике биодеградативный потенциал микроорганизмов, выделенных из мест их естественной адаптации к экотоксикантам.

В течение последних трёх лет выполнен большой комплекс исследований по разработке технологии новой формы перспективного двухкомпонентного биопрепарата. В его состав вошли бактерии *Pseudomonas fluorescens* VG-5 и *P. putida* VG-8 – эффективные деструкторы ФОС и углеводов нефти, клубеньковые бактерии *Rhizobium loti*, сорбированные на семенах нефтотолерантного бобового растения лядвенца рогатого *Lotus corniculatus*, а также бактерии эффективного штамма-деструктора экотоксикантов *P. delhiensis* VG-11 в составе растительно-микробной ассоциации. Разрабатывались две технологии получения биопрепаратов индивидуального состава, которые, согласно их использованию, будут храниться отдельно и которые объединяются в одно целое непосредственно перед применением на местности. Важно также и то, что при конструировании биопрепаратов принимались во внимание экспериментальные данные, свидетельствующие об отсутствии на сегодняшний день универсального вида микроорганизмов, обладающих способностью осуществлять деградацию всех экотоксикантов в почве, а также и их компонентов [25]. Поэтому в состав биопрепаратов, предназначенных для рекультивации почвы, были введены предста-

вители нескольких видов микроорганизмов-деструкторов, принадлежащих к различным таксономическим группам. Таким образом, расширение возможностей биотехнологии рекультивации почвы напрямую связано с применением двухкомпонентного биопрепарата, обеспечивающего био- и фиторекультивацию почвы. 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 [25–28]. При этом существенно расширяется биодеградативный потенциал биопрепарата и, как следствие, возможности биотехнологии рекультивации, связанные с объединением микроорганизмов.

В технологии первого биопрепарата-деструктора ФОС, нефти и нефтепродуктов с расширенным спектром биодеградативной активности используются бактерии двух штаммов псевдомонад *P. fluorescens* VG-5 и *P. putida* VG-8 [29]. Бактерии обоих штаммов непатогенны, биосовместимы, экологически безопасны, стабильны по признаку биодеструкции экотоксикантов, неприхотливы по питательным потребностям, технологичны, не персистируют в окружающей среде при отсутствии субстрата для деструкции. Готовый к применению лиофильно обезвоженный биопрепарат представляет собой пористую массу светло-жёлтого цвета без посторонних включений. С использованием метода капиллярной газовой хроматомасс-спектрометрии с масс-селективным детектированием была установлена высокая нефтеструктурирующая активность микроорганизмов, использующих в эксперименте при выращивании на минеральных питательных средах, содержащих нефть или нефтепродукты в качестве единственного источника углерода.

В микрополевых экспериментах штаммы псевдомонад *P. fluorescens* VG-5 и *P. putida* VG-8 проявили выраженную биодеструктивную активность в отношении гербицида Раундап: содержание в почве глифосата [29, 30],

входящего в состав гербицида, снизилось к 12 суткам эксперимента с исходного количества 53,6 мг/кг до уровня 0,15 мг/кг, что ниже исходного содержания в 357 раз и меньше ПДК (0,5 мг/кг). Микроорганизмы биопрепарата совместно с почвенными микроорганизмами образуют трофические цепи и поэтапно участвуют в процессе биодеструкции поллютантов почвы. Наследственно закрепленная способность к биодеструкции экотоксикантов, детерминируемая соответствующими плазмидными генами микроорганизмов-деструкторов, делает их ведущими в инициации процесса биодеструкции как природных, так и ксенобиотических фосфонатов, а также нефти и нефтепродуктов, находящихся в почве.

Второй биопрепарат представляет собой сухую неоднородную массу, состоящую из жизнеспособных микробных клеток штаммов *P. delhiensis* VG-11 и *R. loti* [28] в соотношении 1:1 в количестве не менее $4 \cdot 10^9$ клеток на 1 г носителя, в качестве которого выступают семена бобового растения лядвенца рогатого, объединённые с делигнифицированными опилками в соотношении 1:1 [29].

Оценка глубины деструкции глифосата [30] в почве двухкомпонентным биопрепаратом позволила сделать вывод о том, что процесс деструкции экотоксиканта наиболее интенсивно происходит в первые сутки эксперимента: к 4 суткам его содержание снизилось с исходного количества 52 мг/кг до $11,3 \pm 2,8$ мг/кг (21,7% от исходного количества), а к 13 суткам – до $0,12 \pm 0,03$ мг/кг, снизившись, таким образом, в 433 раза (при ПДК в почве 0,5 мг/кг).

Эксперименты с сырой нефтью, внесённой в почву, показали, что комплексное воздействие микроорганизмов (а также их ферментов) [31], входящих в состав образца двухкомпонентного биопрепарата, обуславливает на 14 сутки эксперимента деструкцию нефти с потерей её нативности примерно на 93%. Оставшиеся неизменными 7% идентифицированных методом капиллярной газовой хроматомасс-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 C17–C53 на уровне 15%.

Заключение

Микроорганизмы и продукты их метаболизма вполне закономерно нашли прак-

тическое применение в биотехнологии рекультивации почвы. Эволюционируя вместе с биосферой, микроорганизмы адаптировались к различным условиям существования и расселились повсеместно, заняв различные экологические ниши. Существует мнение, что для микробного биоразнообразия, в отличие от биоразнообразия растительного и животного мира, характерно динамическое равновесие, что якобы облегчает их выделение, идентификацию и использование в биотехнологии. Однако, как показывает опыт, в действительности частота выделения искомым технофильных микроорганизмов из естественной среды обитания довольно низка и составляет менее $1 \cdot 10^{-9}$. В то же время специфические микробиологические методы и селективные питательные среды, а также научно-методические подходы, разработанные учёными смежных научных дисциплин, позволяют изолировать из окружающей среды такие микроорганизмы, которые обладают набором свойств, делающих их естественными участниками биотехнологических процессов, в том числе биотехнологии рекультивации почвы. Это тем более важно, что в силу специфики реализации технологий уничтожения ФОС на объекте УХО «Марадыковский» рассчитывать на самовосстановление почвы и её санацию путём активации процессов самоочищения агротехническими приёмами, внесением удобрений, поверхностной обработкой и глубоким рыхлением, оказывающими стимулирующее влияние на естественную микрофлору, не приходится. Данное обстоятельство предопределило проведение специальных исследований, связанных с использованием мощного биодеградативного потенциала микроорганизмов в биотехнологических целях.

В настоящее время для микробной биотехнологии рекультивации почвы разработаны ферментный и сугубо микробиологический подходы решения проблемы санирования и устойчивого функционирования техногенной экосистемы объекта «Марадыковский». В рамках ферментного подхода к биотехнологии рекультивации почвы созданы и апробированы высокоэффективные генетические конструкции и рекомбинантные штаммы, прежде всего кишечной палочки *E. coli* и псевдомонад *Pseudomonas* sp., обеспечивающие биосинтез органофосфатгидролазы в цитоплазме клеток, а также её генетически модифицированных аналогов, содержащих полигистидиновые последовательности в растворимой и каталитически активной форме. Экспериментально

доказана высокая эффективность органофосфатгидролазы с шестью остатками гистидина в процессах деструкции ФОВ и продуктов их деградации. Кроме того, на основе микробных клеток – продуцентов ферментов с активностью органофосфатгидролазы созданы гетерогенные биокатализаторы, которые, как и метаболически активные клетки, в составе искусственного иммобилизованного консорциума перспективны для использования в процессах разложения фосфорорганических нейротоксинов, а также в биотехнологии санирования природных экосистем объекта «Марадыковский».

Другим эффективным путём решения проблемы санирования и устойчивого функционирования экосистемы объекта «Марадыковский» является использование в биотехнологии рекультивации почвы биопрепарата-деструктора экотоксикантов, созданного на базе растительно-микробной ассоциации бактерий *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.* и бобового растения *L. corniculatus*. Микроорганизмы, входящие в состав биопрепарата-деструктора, являются не только продуцентами ферментов деструкции фосфонатов в почве, но они также формируют устойчивые трофические цепи с микроорганизмами почвенной (аборигенной) микрофлоры и за счёт синергидного эффекта биологически активных компонентов совместно участвуют в процессе биодеструкции экотоксикантов в загрязнённой почве. Наследственно закреплённая способность к биодеструкции экотоксикантов делает их ведущими в инициации процесса уничтожения природных и ксенобиотических фосфонатов, а также нефти и нефтепродуктов, находящихся в почве.

Таким образом, совокупность теоретических и экспериментальных данных свидетельствует о готовности внедрения апробированных научных разработок в практику микробной биотехнологии рекультивации почвы, которые обеспечат экологическую безопасность процесса биоразложения продуктов деструкции отравляющих веществ и восстановления экосистемы объекта «Марадыковский».

Литература

- Капашин В.П. Уничтожение запасов химического оружия на основе современных российских технологий // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 10–13.
- Ашихмина Т.Я., Тимонов А.С., Кантор Г.Я., Пантелева 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.
- Домнина Е. А., Огородникова С.Ю. Изучение протективного покрытия эпифитных лишайников и содержания общего фосфора в талломах в районе действия объекта уничтожения химического оружия в Кировской области // Механизмы устойчивости и адаптации биологических систем к природным и техногенным факторам: Материалы Всероссийской научной конференции. Киров, 2015. С. 41–45.
- Янковская А.А., Филимонов И.В., Завьялова Н.В., Голипад А.Н., Ковтун В.А. Экологически безопасная биоремедиация почвы и очистка воды *in situ* от продуктов деструкции отравляющих веществ // Теоретическая и прикладная экология. 2016. № 4. С. 89–95.
- Реймерс Н.Ф. Экология (теории, законы, правила, принципы и гипотезы). М.: Россия Молодая, 1994. 367 с.
- 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.
- Евдокимова Г.А. Почвенная микробиота как фактор устойчивости почв к загрязнению // Теоретическая и прикладная экология. 2014. № 2. С. 17–24.
- Heigerer H. Landwirtschaft und umweltbelastung // Schriften Agrar wiss, Fachbereichs Univ. Kill. 1979. No. 51. P. 290–304.
- ГОСТ 17.5.3.05-84. Охрана природы. Рекультивация земель. Общие требования к землеванию. М.: Каталог ГОСТ – ИПК Издательство стандартов, 2002. С. 56–59.
- 117.5.3.06-85. Охрана природы. Земли. Требования к определению норм снятия природного слоя почвы при производстве земляных работ. М.: Каталог ГОСТ – ИПК Издательство стандартов. 2015. С. 60–63.
- Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., Watrs L.C., Watson A.P., King J.F., Hauschidi V. The source, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // Research Reviews. 1999. V. 107. No. 12. P. 933–974.
- Ефременко Е.Н. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: Автореферат дис. ... докт. биол. наук. М.: Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. 2009. 51 с.
- Уткин А.Ю., Пыжьбянов И.В., Шелученко В.В., Петрунин В.А., Капашин В.П., Холстов В.И., Кондратьев В.В. Способ уничтожения химических боеприпасов, снаряженных фосфорорганическими отравляющими веществами и имеющих в корпусе технологические резьбовые отверстия // Патент RU № 2352375. Заявка 2006133269/02, 15.09.2006. Опубликовано 20.04.2009.
- Ефременко Е.Н., Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И., Янковская А.А. Разрыв С-Р связи в фос-

фонатах под действием ферментных биокатализаторов // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 3. С. 47–54.

15. Small M.J. Compounds formed from the chemical decontamination of HD, GB, and VX and their environmental fate. Fort Detric, MD: U.S. Army Medical Bioengineering research and Development Laboratory. Tech. rpt. 8304, 1984. DTIC accession no. AD-A149515.

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

17. La Nause J.M., Rosenberg H., Shaw D.S. The enzyme cleavage of the carbon-phosphorus bond: Purification and properties of phosphonate // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 212. P. 332–350.

18. Cordeiro M.L., Pompliano D.L., Frost J.W. Degradation and detoxification of organophosphonates: cleavage of the carbon-phosphorus bond // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 332–334.

19. Frost J.W., Loo S., Cordeiro M.L., Li D. Radical-based dephosphorylase and organophosphonate biodegradation // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 2166–2177.

20. Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-phosphorus bond cleavage by gram-positive and gram-negative soil bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. P. 283–287.

21. Schowanec D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 56. P. 895–903.

22. Avila L.Z., Draths K.M., Frost J.W. Metabolites associated with organophosphonate C-P bond cleavage: chemical synthesis and microbial degradation of [³²P]-ethylphosphonic acid // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991. V. 1. No. 1. P. 51–54.

23. McMullan G., Quinn J.P. In vitro characterization of a phosphate starvation-independent carbon-phosphorus bond cleavage activity in *Pseudomonas fluorescens* 23F // J. Bacteriol. 1994. V. 176. No. 2. P. 320–324.

24. Риклефс Р. Основы общей экологии / Под ред. Н.Н. Каргашева. М.: Мир. 1979. 424 с.

25. Ivanova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Oil biodegradation by microbial-plant associations // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. T. 51. № 2. С. 196–201.

26. Shinabarger D.L., Braymer H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982 // J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 702–703.

27. Daughton C.G., Cook A.M., Alexander M. Biodegradation of phosphonate toxicants yield methane or ethane on cleavage of C-P bound // FEMS Microbiol. Lett. 1979. V. 5. No. 2. P. 91–93.

28. Rosenberg M., Gutnic G.L., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // FEMS Microbiol. Lett. 1980. V. 9. P. 29–33.

29. Archana G. Engineering nodulation competitiveness of rhizobial bioinoculants in soil: Microbes for Legume Improvement / Eds. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi. Wien: Springer. 2010. P. 157–194.

30. Лазыкин А.Г., Лещенко А.А., Ашихмина Т.Я., Погорельский И.П., Дармов И.В., Лундовских И.А., Устюжанин И.А., Шаров С.А. Оценка возможности использования растительно-микробных ассоциаций при рекультивации почвы на объекте «Марадьковский» // Теоретическая и прикладная экология. 2016. № 4. С. 96–104.

31. Selvapandiyan A., Bhatnagar R.K. Isolation of glyphosate-metabolising *Pseudomonas*: detection, partial purification and localization of carbon-phosphorus lyase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 40. P. 876–882.

32. Квеситадзе Г.И., Хатисашвили Г.А., Садунишвили Т.А., Евстигнеева З.Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Под ред. В.О. Попова. М.: Наука. 2005. 199 с.

References

1. Kapashin V.P. Decommission of chemical weapons stores using contemporary techniques worked out in Russia // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2015. No. 3. P. 10–13 (in Russian).

2. Ashikhmina T.Ya., Timonov A.S., Kantor G.Ya., Panteleva O.G., Domnina E.V., Dabakh E.V., Ogorodnikova S.Yu., Novoidarskiy Yu.V., Titova V.A. Research of the impact of the chemical weapons decommission plant “Maradykovskiy” on the state of natural environment and its objects // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2015. No. 3. P. 88–95 (in Russian).

3. Domnina E.A., Ogorodnikova S.Yu. The study of the protective coating of epiphytic lichens and the content of total phosphorus in thalloms in the area of action of the chemical weapons destruction plant in the Kirov region // Mechanisms of stability and adaptation of biological systems to natural and technogenic factors: Materialy Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii. Kirov, 2015. P. 41–45 (in Russian).

4. Yankovskaya A.A., Filimonov I.V., Zavjalova N.V., Golipad A.N., Kovtun V.A. Ecologically safe bioremediation of soil and water purification in situ from chemical warfare agents destruction products // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2016. No. 4. P. 89–95 (in Russian).

5. Reymers N.F. Ecology (theories, laws, rules, principles, and hypotheses). М.: Rossiya Molodaya, 1994. 367 p. (in Russian).

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

7. Evdokimova G.A. Soil microbiota as a factor of soil resistance to contamination // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya. 2014. No. 2. P. 17–24 (in Russian).

8. Heigerer H. Landwirtschaft und umweltbelastung // Schriften Agrar wiss, Fachbereichs Univ. Kill. 1979. No. 51. P. 290–304.
9. GOST 17.5.3.05-84. Protection of Nature. Reclamation of lands. General requirements for land. Moskva: IPK Izdatelstvo standartov, 2002 (in Russian).
10. GOST 17.5.3.06-85. Protection of Nature of the Earth. Requirements for determining the norms for removing the natural layer of soil during excavation work. Moskva: IPK Izdatelstvo standartov. 2015 (in Russian).
11. Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., Wats L.C., Watson A.P., King J.F., Hauschidi V. The source, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // Research Reviews. 1999. V. 107. No. 12. P. 933–974.
12. Efremenko E.N. Heterogeneous biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms: fundamental and applied aspects: Avtoref. ... dokt. biol. nauk. Moskva: Chimicheskiiy facultet MGU im. M.V. Lomonosova. 2009. 51 p. (in Russian).
13. Utkin A.Yu., Pyzhyanov I.V., Sheluchenko V.V., Petrunin V.A., Kapashin V.P., Holstov V.I., Kondratyev V.V. The method of destruction of chemical munitions, equipped with organophosphorus poisonous substances and having in the body technological threaded holes // Patent RU № 2352375. Zayavka: 2006133269/02, 15.09.2006. Opublikovano: 20.04.2009 (in Russian).
14. Efremenko E.N., Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Holstov V.I., Yankovskaya A.A. Cleavage of C-P bond in phosphonates under the action of enzymatic biocatalysts // Teoreticheskaya i prikladnaya ecologiya. 2015. No. 3. P. 47–54 (in Russian).
15. Small M.J. Compounds formed from the chemical decontamination of HD, GB, and VX and their environmental fate. Fort Detric, MD: U.S. Army Medical Bioengineering research and Development Laboratory. Tech. rpt. 8304, 1984. DTIC accession no. AD-A149515.
16. Metcalf W.W., Wanner B.L. Mutational analysis of an Escherichia coli fourteen-gene operon for phosphonate degradation, using TnpA elements // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 3430–3442.
17. La Nause J.M., Rosenberg H., Shaw D.S. The enzyme cleavage of the carbon-phosphorus bond: Purification and properties of phosphonate // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 212. P. 332–350.
18. Cordeiro M.L., Pompliano D.L., Frost J.W. Degradation and detoxification of organophosphonates: cleavage of the carbon-phosphorus bond // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 332–334.
19. Frost J.W., Loo S., Cordeiro M.L., Li D. Radical-based dephosphorylase and organophosphonate biodegradation // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 2166–2177.
20. Quinn J.P., Peden J.M.M., Dick R.E. Carbon-phosphorus bond cleavage by gram-positive and gram-negative soil bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. P. 283–287.
21. Schowanec D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 56. P. 895–903.
22. Avila L.Z., Draths K.M., Frost J.W. Metabolites associated with organophosphonate C-P bond cleavage: chemical synthesis and microbial degradation of [32P]-ethylphosphonic acid // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991. V. 1. No. 1. P. 51–54.
23. McMullan G., Quinn J.P. In vitro characterization of a phosphate starvation-independent carbon-phosphorus bond cleavage activity in *Pseudomonas fluorescens* 23F // J. Bacteriol. 1994. V. 176. No. 2. P. 320–324.
24. Riklifs R. Fundamentals of general ecology / Ed. N.N. Kartashev. Moskva: Mir, 1979. 424 p. (in Russian).
25. Ivanova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Oil biodegradation by microbial-plant associations // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. T. 51. № 2. C. 196–201.
26. Shinabarger D.L., Braymer H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982 // J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 702–703.
27. Daughton C.G., Cook A.M., Alexander M. Biodegradation of phosphonate toxicants yield methane or ethane on cleavage of C-P bond // FEMS Microbiol. Lett. 1979. V. 5. № 2. P. 91–93.
28. Rosenberg M., Gutnic G.L., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // FEMS Microbiol. Lett. 1980. V. 9. P. 29–33.
29. Archana G. Engineering nodulation competitiveness of rhizobial bioinoculants in soil: Microbes for Legume Improvement / Eds. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi. – Wien: Springer. 2010. P. 157–194.
30. Lazykin A.G., Leshchenko A.A., Ashikhmina T.Ya., Pogorelsky I.P., Darmov I.V., Lundovskikh I.A., Ustyuzhanin I.A., Sharov S.A. Assessment of the possibility of using plant-microbial associations in biotechnology of soil remediation at the facility «Maradykovskiy» // Teoreticheskaya i prikladnaya ecologiya. 2016. No. 4. P. 96–104 (in Russian).
31. Selvapandiyam A., Bhatnagar R.K. Isolation of glyphosate-metabolising *Pseudomonas*: detection, partial purification and localization of carbon-phosphorus lyase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 40. P. 876–882.
32. Kvesitadze G.I., Hatisachvili G.A., Sadunishvili T.A., Evstigneeva Z.G. Metabolism of anthropogenic toxicants in higher plants / Ed. V.O. Popov. Moskva: Nauka, 2005. 199 p. (in Russian).