

Оценка эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами

А.И.Марченко, Г.А.Жариков, О.А.Крайнова, В.П.Дядищева, Л.В.Челпых

ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Российская Федерация

В лабораторных исследованиях изучена эффективность биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, микрокапсулированными и некапсулированными углеводородокисляющими микроорганизмами-деструкторами.

Показано, что присутствие дизельного топлива в дерново-подзолистой почве негативно влияло на ее биологическую активность. Углеводородокисляющие микроорганизмы, внесенные в почву, разлагали нефтепродукты до допустимых значений. В микрокапсулированной форме микроорганизмы размножались в 1,5–2 раза лучше, чем в некапсулированной.

В ходе микробной биоремедиации возрастала численность интродуцированных бактерий-деструкторов и сапрофитной микрофлоры, снижались концентрация углеводородов и интегральная токсичность почвы, улучшалась ее биологическая активность. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование для биоремедиации почв, загрязненных дизельным топливом, микроорганизмы-деструкторы, иммобилизованные на микрокапсулах из полимочевины.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы углеводородов, иммобилизация клеток, биodeградация, дизельное топливо, биоремедиация, биологическая активность почвы

Для цитирования: Марченко А.И., Жариков Г.А., Крайнова О.А., Дядищева В.П., Челпых Л.В. Оценка эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами. Бактериология. 2019; 4(1): 8–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-8-16

Evaluation of the diesel-contaminated sod-podzolic soil bioremediation efficiency by microorganism-destroyers immobilized on microcapsules

A.I.Marchenko, G.A.Zharikov, O.A.Krainova, V.P.Dyadisheva, L.V.Chelpykh

National Research Centre «Institute of Immunology» of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

The effectiveness of bioremediation of diesel contaminated sod-podzolic soil by microencapsulated and non-encapsulated hydrocarbon-oxidizing microorganisms-destroyers has been studied in model laboratory studies.

It was shown that the presence of diesel fuel in sod-podzolic soil adversely affected its biological activity. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms introduced into the soil, decomposed oil products to acceptable values. In the microencapsulated form, microorganisms multiplied 1.5 to 2 times better than in the non-encapsulated.

In the course of microbial bioremediation, the number of introduced bacteria-destroyers and saprophytic microflora increased, the concentration of hydrocarbons and the integral toxicity of the soil decreased, and its biological activity improved.

This results allow us to recommend the use of native microorganisms-destroyers immobilized on polyurea microcapsules for the bioremediation of soils contaminated with diesel fuel.

Keywords: hydrocarbon microorganisms-degraders, cell immobilization, diesel fuel, bioremediation

For citation: Marchenko A.I., Zharikov G.A., Krainova O.A., Dyadisheva V.P., Chelpykh L.V. Evaluation of the diesel-contaminated sod-podzolic soil bioremediation efficiency by microorganism-destroyers immobilized on microcapsules. Bacteriology. 2019; 4(1): 8–16. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-8-16

Для корреспонденции:

Марченко Анатолий Иванович, кандидат биологических наук, начальник лаборатории изучения токсичности *in vitro* отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиала ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А

Телефон: (4967) 705-238

E-mail: marchenko@toxicbio.ru

Статья поступила 20.01.2019 г., принята к печати 27.03.2019 г.

For correspondence:

Anatoliy I. Marchenko, PhD (Biol.), Head of the Laboratory for In Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research center for toxicology and hygienic regulation of biopreparations – affiliated institution at National Research Centre «Institute of Immunology» of the Federal Medical-Biological Agency of Russia

Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation

Phone: (4967) 705-238

E-mail: marchenko@toxicbio.ru

The article was received 20.01.2019, accepted for publication 27.03.2019

Нефть и нефтепродукты являются ключевыми загрязнителями биосферы, одним из важнейших компонентов которой является почва [1, 2]. При этом резко снижаются плодородие почв и качество получаемой продукции [3, 4]. Загрязненная углеводородами нефти почва оказывает существенное влияние на здоровье населения и имеет гигиеническое значение [5], так как формирует химический состав потребляемых человеком продуктов питания животного и растительного происхождения, а также питьевой воды. В аграрном секторе особая роль принадлежит дизельному топливу, которое чаще всего применяется в сельскохозяйственной технике.

В естественных условиях нефтепродукты подвергаются деградации аборигенной микрофлорой почвы. При этом процесс самовосстановления почв, загрязненных углеводородами нефти, является очень длительным и может продолжаться более 25 лет [6].

В настоящее время для интенсификации процесса очистки почвы от загрязнения углеводородами широко используют биологические методы биоремедиации (или биологической очистки), основанные на интродукции в загрязненную почву микроорганизмов-деструкторов [7, 8]. В то же время сами интродуцируемые микроорганизмы нуждаются в защите от неблагоприятных внешних условий. Имобилизация микроорганизмов повышает их толерантность к неблагоприятным условиям [9]. Практическое применение находит в настоящее время микрокапсулирование, основанное на иммобилизации микроорганизмов-деструкторов путем адсорбции на микрокапсулах – альтернативный вариант включения в гель [10].

Цель работы – изучение эффективности биоремедиации дерново-подзолистой почвы, загрязненной дизельным топливом, иммобилизованными на микрокапсулах из полимочевины микроорганизмами-деструкторами.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиала ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Московская область, Серпуховский район, п. Большевик).

Для проведения лабораторных исследований по изучению биодеградации дизельного топлива из коллекции нефтеокисляющих микроорганизмов НИЦ ТБП были подобраны 2 штамма бактерий (*Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2), обладающих рядом полезных свойств (высокая углеводородокисляющая активность, нетоксичность, непатогенность).

Оценку безопасности штаммов проводили на базе виварного комплекса на лабораторных линиях беспородных белых мышей и крыс по общепринятым методикам. Изучение патогенных свойств выделенных штаммов было осуществлено в соответствии с международными требованиями по 4 показателям. По показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности отобранные штаммы не патогенны для теплокровных животных и могут быть отнесены к 4-му классу опасности. Следовательно, эти штаммы пригодны для использования в процессах биоремедиации без ограничений.

Исследование количественных показателей процесса биодеструкции углеводородов под действием микрокапсулированных штаммов *Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2 проводили в почвенных микрокосмах посредством моделирования условий загрязнения дерново-подзолистой почвы дизельным топливом [11].

Для приготовления модельных почвенных систем использовали дерново-подзолистую почву Серпуховского района Московской области. Для эксперимента использовали смешанные образцы почвы, отобранные из пахотного горизонта 0–20 см. Образцы почв массой 1500 г, просеянные через сито 3 мм (для максимального сохранения их природной структуры), помещали в герметически закрытые пластиковые цилиндры. Опыт в контейнерах позволил исключить поверхностную миграцию загрязнителей, дал возможность точно рассчитать дозу дизтоплива на определенную массу почвы.

Начальную влажность почвы доводили до 60% путем увлажнения водой. Дизтопливо вносили в количестве 1% от абсолютно сухой почвы. Полученную массу перемешивали до однородности. Эксперимент вели в контейнерах при температуре 20–24°C в течение 30 сут. Образцы почвы для исследований отбирали в начале опыта, через 14 и 30 сут. Определение всех параметров проводили в 3–5-кратной повторности.

Схема лабораторного эксперимента:

1. Почва + дизтопливо + *Rhodococcus sp.* шт. N1;
2. Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы *Rhodococcus sp.* шт. N1;
3. Почва + дизтопливо + *Pseudomonas sp.* шт. N2;
4. Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы *Pseudomonas sp.* шт. N2;
5. Почва + дизтопливо (контроль);
6. Чистая почва (контроль).

Культивирование микроорганизмов-деструкторов для лабораторных экспериментов проводили в жидкой питательной среде, используя «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон)» ТУ 9398-021-78095326-2006, изготовленной ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск. Выращивание микроорганизмов проводили на термостатируемой качалке до выхода культур *Rhodococcus sp.* шт. N1 и *Pseudomonas sp.* шт. N2 на стационарную фазу роста через 48 и 24 ч соответственно, при температуре 28°C и 180 об./мин. Конечная концентрация – $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл питательной среды. Используя стандарт мутности, суспензию бактерий разводили фосфатным буфером.

Для иммобилизации микроорганизмов-деструкторов использовали пористые полимочевинные микрокапсулы производства ЗАО «ПироХимика». Размер диаметра микрокапсул составлял 43–60 мкм. Методом оптической световой микроскопии было установлено, что при иммобилизации бактериальные клетки локализуются на внутренних и внешних поверхностях микрокапсул. Микрокапсулирование микробных клеток проводили путем смешивания и бактериальной суспензии с концентрацией $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мл в сбалансированном растворе минеральных солей (2,5 масс.% микрокапсул и 97,5 масс.%), в течение 20 минут непосредственно перед внесением в почву методом полива. Концентрация и объем вносимых микрокапсулированных и чистых

бактериальных суспензий были рассчитаны так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов была $1,0 \times 10^7$ клеток на 1 г абсолютно сухой почвы.

Нефтепродукты из почвы экстрагировали четыреххлористым углеродом, хроматографически отделяли сопутствующие органические соединения других классов и количественно определяли нефтепродукты по интенсивности поглощения в ИК-области спектра на концентратометре КН-2М («Сибэкоприбор», г. Новосибирск) согласно методике ПНДФ 16.1:2.2.22–98 [12].

В ходе эксперимента изучали динамику размножения микроорганизмов-деструкторов в загрязненной почве (при внесении в обычном и микрокапсулированном виде), концентрацию сапрофитной микрофлоры, биологическую активность почвы (целлюлозолитическую, гидролазную, дегидрогеназную и дыхательную активность), интегральную токсичность.

Численность микроорганизмов-деструкторов в почве определяли путем посева десятикратных разведений почвенной суспензии на чашки Петри с агаризованной питательной средой из гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар) и маркерами, характерными для каждого штамма. Чашки Петри экспонировали в термостате при температуре 28°C в течение 4 сут до появления четко различимых колоний микробной культуры.

Численность сапрофитных микроорганизмов в почве определяли путем посева десятикратных разведений почвенной суспензии на чашки Петри с агаризованной питательной средой из гидролизата рыбной муки. Посевы инкубировали при 26°C. Учет выросших на агаровой питательной среде колоний проводили на 5–6-е сутки после посева. Численность сапрофитных микроорганизмов выражали в тысячах на 1 г абсолютно сухой почвы.

Интегральную (суммарную) токсичность водных вытяжек из почвы оценивали на лабораторной культуре *Daphnia magna Straus*, культивируемой в НИЦ ТБП. Биотестирование проводили в соответствии с ФР.1.39.2007.03222 [13]. Метод основан на определении изменений выживаемости дафний при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой воде, по сравнению с контролем. Критерием токсичности является достоверное отличие от контроля выживаемости дафний. При гибели 50% и более дафний водная вытяжка считается токсичной. Биотестирование проводили в климатостате, в помещении, не содержащем токсических паров или газов, при оптимальных температурном и световом режимах. Результаты биотестирования считали правильными, если гибель дафний в контроле не превышала 10% за весь период наблюдений.

При определении дегидрогеназной активности почвы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый (ТТХ), который в анаэробных условиях в присутствии дегидрогеназы, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную окраску. Интенсивность окраски определяли фотоколориметрически [14]. Активность дегидрогеназы рассчитывали в миллиграммах ТФФ на 10 г почвы за сутки.

Гидролазную активность почвы определяли по реакции гидролиза флуоресцеина диацетата (ФДА) [15]. Навески

почвы по 1 г помещали в пробирки, приливали по 0,1 мл раствора ФДА в ацетоне (2 г/л) и 10 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,6). Время инкубации – 1 ч при 30°C. Оптическую плотность растворов определяли после центрифугирования (2000 об./мин., 3 мин.) колориметрированием при длине волны 490 нм. Показания прибора пересчитывали по калибровочной кривой в мкг ФДА $\times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$.

Для определения целлюлозоразлагающей способности почвы применяли аппликационный метод [16]: целлюлозный материал (фильтровальную бумагу), заложенный в почву в полистироловой сети, выдерживали в ней в течение 30 сут. По разнице в массе (в %) фильтровальной бумаги до и после инкубации образцов судили об интенсивности целлюлозоразлагающей активности почвы.

Эмиссия CO_2 почвой является одним из наиболее важных показателей ее биологической активности [17]. Определение скорости базального дыхания (БД) проводили в пенициллиновых флаконах, куда помещали по 2 г почвы и инкубировали при 25°C в течение 2 ч, а затем проветривали 30 мин. Во флаконы добавляли 0,4 мл воды, герметично закрывали и инкубировали при 25°C. Продолжительность инкубации – 24 ч. Концентрацию CO_2 определяли газохроматографическим методом.

Для определения субстрат-индуцированного дыхания (СИД) во флаконы помещали навеску почвы (2 г) и инкубировали в течение 2 ч при 25°C. После проветривания в течение 30 мин при комнатной температуре во флаконы добавляли по 4,0% раствор глюкозы (10 мг/г почвы) и инкубировали при 25°C в течение 3 ч. Концентрацию CO_2 определяли на газовом хроматографе. Скорость дыхания $V_{\text{СИД}}$ выражали в мкг CO_2 – С/г сухой почвы в час. Содержание углерода микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$) рассчитывали по величине субстрат-индуцированного дыхания по формуле: $C_{\text{мик}} (\text{мкг/г}) = V_{\text{СИД}} (\text{мкл } \text{CO}_2/\text{г час}) \times 40,04 + 0,37$.

Определение всех параметров проводили не менее чем в пятикратной повторности. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel 16.0 и Statistica 10.0.

При сравнении средних величин использовали критерий Стьюдента и критерий Уилкоксона (Манна-Уитни). Для оценки соответствия имеющихся экспериментальных данных нормальному закону распределения применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Критерий Стьюдента (t-критерий) применяли для сравнения друг с другом двух независимых выборок, взятых из нормально распределяющихся совокупностей. При несоответствии распределения нормальному закону использовали непараметрический критерий Манна-Уитни программы STATISTICA 10.0. Экспериментальные данные представляли в виде средних арифметических величин и их доверительных интервалов, рассчитанных с вероятностью 95%.

Результаты и обсуждение

Результаты химико-аналитического определения содержания дизельного топлива в почве в вариантах опыта и показатели эффективности биодеструкции (доля разложившегося нефтепродукта от его исходного содержания в почве, в %) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оценка результатов эффективности биодеструкции дизельного топлива

Вариант опыта	Концентрация углеводородов дизтоплива, г/кг почвы			Эффективность биодеструкции, %
	начало опыта	14 сут	30 сут	
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1		8,4 ± 0,4*	4,1 ± 0,2*	59,0 ± 2,8*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1		5,2 ± 0,3*	1,9 ± 0,1*	81,0 ± 3,9*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	10,0 ± 0,4	7,6 ± 0,4*	3,2 ± 0,2*	68,0 ± 3,2*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2		4,3 ± 0,2*	0,8 ± 0,1*	92,0 ± 4,5*
Почва + дизтопливо (контроль)		9,7 ± 0,5*	9,4 ± 0,4*	6,0 ± 0,4*

* $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2. Динамика численности сапрофитной микрофлоры в ходе процесса биоремедиации почвы, загрязненной дизтопливом, КОЕ/г почвы

Варианты опыта	Численность сапрофитной микрофлоры $M \pm n$, КОЕ/г почвы		
	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + диз. топливо + шт. N1	$(3,3 \pm 0,46) \times 10^6$	$(7,5 \pm 0,64) \times 10^7$	$(4,1 \pm 0,53) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	$(4,1 \pm 0,85) \times 10^6$	$(9,3 \pm 0,23) \times 10^7$	$(9,5 \pm 0,38) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + шт. N2	$(2,9 \pm 0,51) \times 10^6$	$(4,5 \pm 0,81) \times 10^7$	$(3,3 \pm 0,24) \times 10^7$
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	$(3,5 \pm 0,46) \times 10^6$	$(4,6 \pm 0,75) \times 10^7$	$(4,3 \pm 0,64) \times 10^7$
Почва + дизтопливо (контроль)	$(4,1 \pm 0,83) \times 10^6$	$(8,7 \pm 0,75) \times 10^7$	$(5,9 \pm 0,85) \times 10^7$
Чистая почва (контроль)	$(3,3 \pm 0,75) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,48) \times 10^7$	$(2,5 \pm 0,34) \times 10^7$

M – среднее пяти измерений; n – доверительный интервал, рассчитан с вероятностью 95%.

По всем вариантам опыта в процессе биоремедиации наблюдается уменьшение содержания нефтепродукта. В контрольном варианте в ходе опыта наблюдалось естественное снижение содержания углеводородов (6% в течение 30 дней), что можно объяснить деятельностью почвенного микробного сообщества. В вариантах с интродуцированными бактериями-деструкторами снижение содержания нефтепродукта выражено сильнее. При внесении в почву микрокапсулированных и свободных клеток бактерий *Pseudomonas sp.* шт. N2 интенсивность деградации дизтоплива превышала таковую по отношению к контролю в 15,3 и 11,3 раза соответственно. При внесении в почву микрокапсулированных клеток *Rhodococcus sp.* шт. N1 деградация дизтоплива была больше, чем в контроле, в 13,5 раза, а в случае применения чистой суспензии клеток – в 9,8 раза.

Результаты исследований показали (рис. 1, 2), что микрокапсулированные микроорганизмы при внесении в почву

активнее размножаются в 1,5–2 раза, чем некапсулированные, разлагают нефтепродукты до допустимых значений.

В связи с тем, что концентрация загрязнителя в почве в результате деятельности микроорганизмов-деструкторов значительно снижается, происходит размножение сапрофитной микрофлоры (табл. 2). Судя по числу выросших колоний, наибольшая численность микроорганизмов в каждом варианте эксперимента обнаружена на 14-е сутки культивирования. Последующее уменьшение числа выросших колоний, вероятно, связано с истощением питания и накоплением продуктов метаболизма.

Наряду с ускорением деструкции дизельного топлива в почве микробная биоремедиация способствовала и снижению токсичности. Биотестирование на дафниях показало, что интегральная токсичность почвы в течение биоремедиации постепенно снижается. При этом почва, обработанная

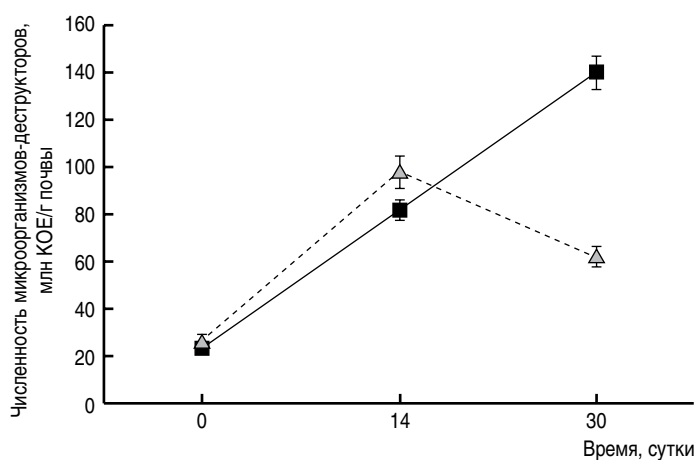


Рис. 1. Динамика численности интродуцированных в почву микроорганизмов-деструкторов *Rhodococcus sp.* шт. N1.

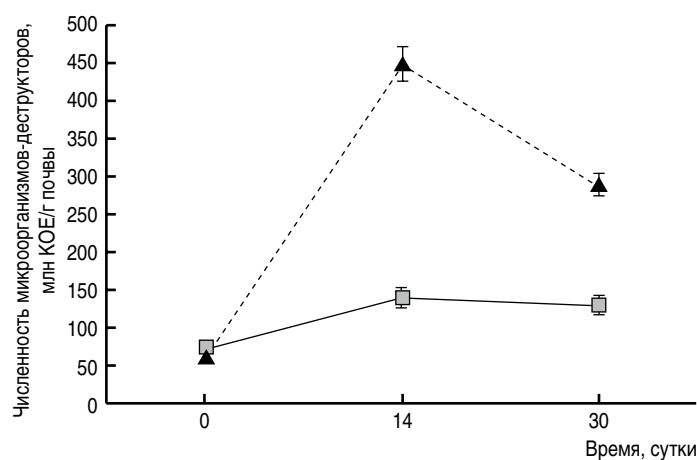


Рис. 2. Динамика численности интродуцированных в почву микроорганизмов-деструкторов *Pseudomonas sp.* шт. N2.

Таблица 3. Интегральная токсичность почвы при обработке микроорганизмами-деструкторами

Вариант опыта	Количество выживших дафний из 30 шт.		Гибель дафний к контролю, в %	Оказывает (не оказывает) острое токсическое действие
	в контроле	в опыте		
<i>В день внесения микроорганизмов</i>				
Чистая почва (контроль)	30	30	0	не оказывает
Почва + дизтопливо 1%	30	0	100	оказывает
<i>На 14-е сутки</i>				
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	30	12	60	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	30	15	50	оказывает
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	30	11	63	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	30	14	53	оказывает
Почва + дизтопливо (контроль)		5	83	оказывает
Почва чистая (контроль)	30	30	0	не оказывает
<i>На 30-е сутки</i>				
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	30	16	47	не оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	30	19	37	не оказывает
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	30	15	50	оказывает
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	30	21	30	не оказывает
Почва + дизтопливо (контроль)	30	9	70	оказывает
Почва чистая (контроль)	30	30	0	не оказывает

микроорганизмами-деструкторами, к 30-м суткам становится нетоксичной (табл. 3).

Объективным показателем, позволяющим оперативно оценить биологическое состояние и токсичность почвы при разных уровнях содержания в ней нефтяных загрязнений, является активность почвенного микробиоценоза.

Проведена серия экспериментов по изучению влияния внесения микроорганизмов-деструкторов на активность ряда ферментов дерново-подзолистой почвы.

Результаты оценки дегидрогеназной активности почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1, *Pseudomonas sp.* шт. N2 представлены на рис. 3, 4.

После внесения дизельного топлива в чистую почву (контроль) в лабораторном исследовании дегидрогеназная активность снизилась с 41,8 до 14,1 мг ТФФ/10 г почвы × 24 ч⁻¹.

Спустя 30 сут этот показатель в варианте без внесения микроорганизмов-деструкторов увеличился в 1,5 раза, в то время как присутствие микрокапсулированных микроорганизмов-деструкторов в почве увеличило дегидрогеназную активность в 2,5–2,7 раза, а в опытах со свободными микроорганизмами – в 2,1–2,2 раза.

Гидролазы, участвуя в реакциях гидролитического распада высокомолекулярных соединений почвы, играют важную роль в снабжении микроорганизмов легкоусвояемыми продуктами гидролиза.

При оценке гидролазной активности почвы в процессе микробной биоремедиации были получены следующие результаты (рис. 5, 6).

Загрязнение почвы дизельным топливом по отношению к чистой контрольной почве снизило ее гидролазную активность. Общая активность гидролаз, оцененная методом

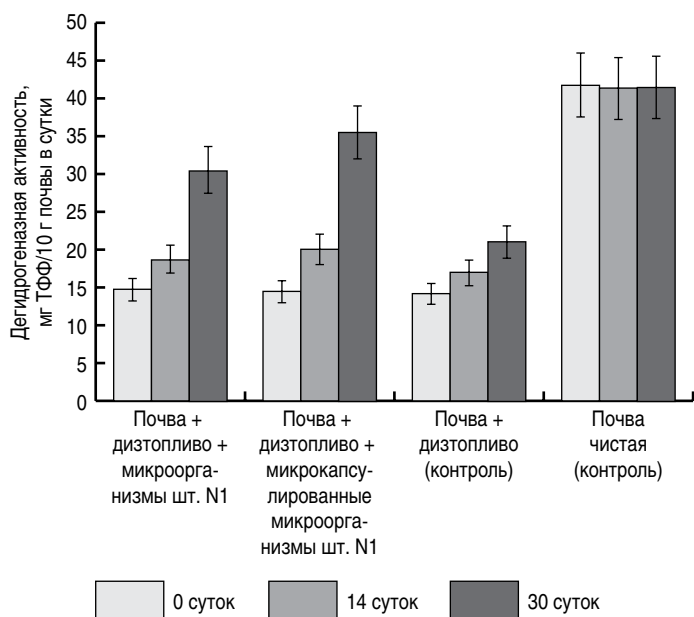


Рис. 3. Дегидрогеназная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

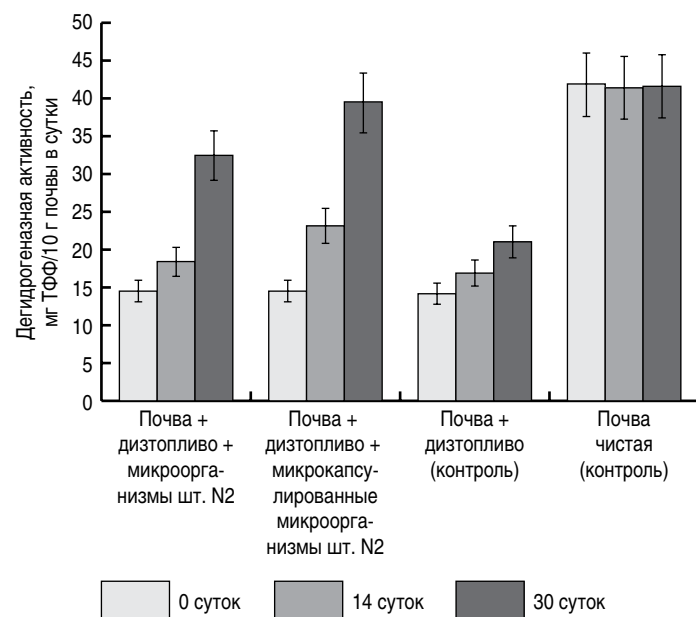


Рис. 4. Дегидрогеназная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

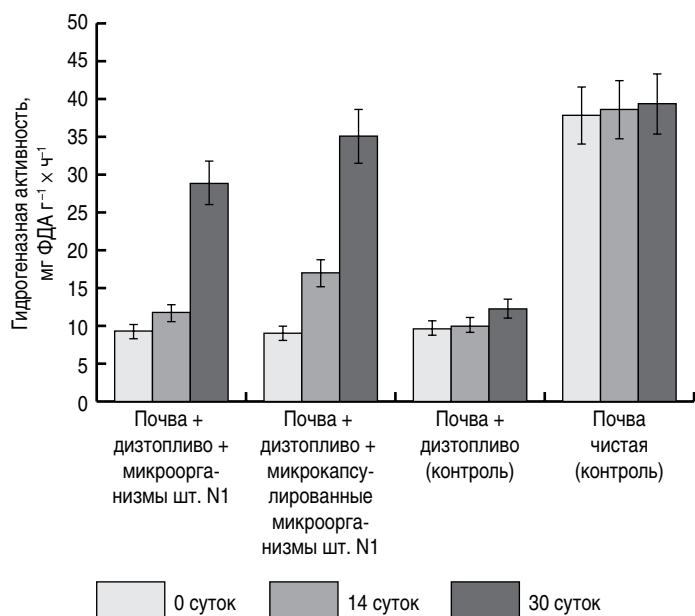


Рис. 5. Гидролазная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

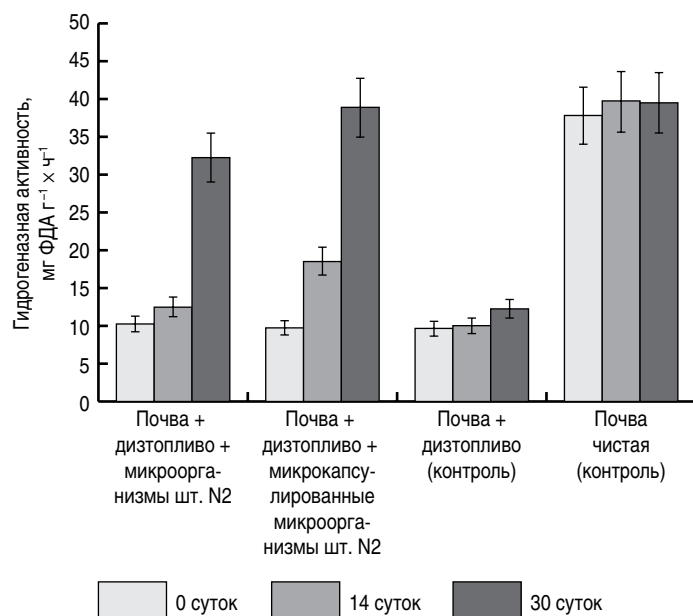


Рис. 6. Гидролазная активность почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

гидролиза ФДА, после внесения в чистую почву дизтоплива снизилась с $37,8 \pm 0,9$ до $9,6 \pm 1,2$ мг ФДА \times г⁻¹ \times ч⁻¹. После 30 сут очистки почвы этот показатель в варианте без внесения микроорганизмов-деструкторов увеличился в 1,3 раза, в то время как присутствие микрокапсулированных и свободных микроорганизмов-деструкторов в почве увеличило гидролазную активность в 3,9–4,1 и 3,1 раза соответственно.

Загрязнение чистой почвы дизельным топливом приводит также к снижению ее целлюлозоразлагающей активности (рис. 7, 8).

Спустя 30 сут проведение биоремедиационных мероприятий способствовало увеличению целлюлозоразлагающей активности почвы. При этом в вариантах с внесением микрокапсулированных бактерий-деструкторов интенсивность разложения целлюлозы (50%) соответствовала уровню чистой почвы.

Интенсивность дыхания почвы является одним из основных показателей, определяющих биологическую активность почвы. Под дыханием почвы понимают интенсивность эмиссии углекислого газа из почвы, которая определяется скоростью процессов биодеструкции органическо-

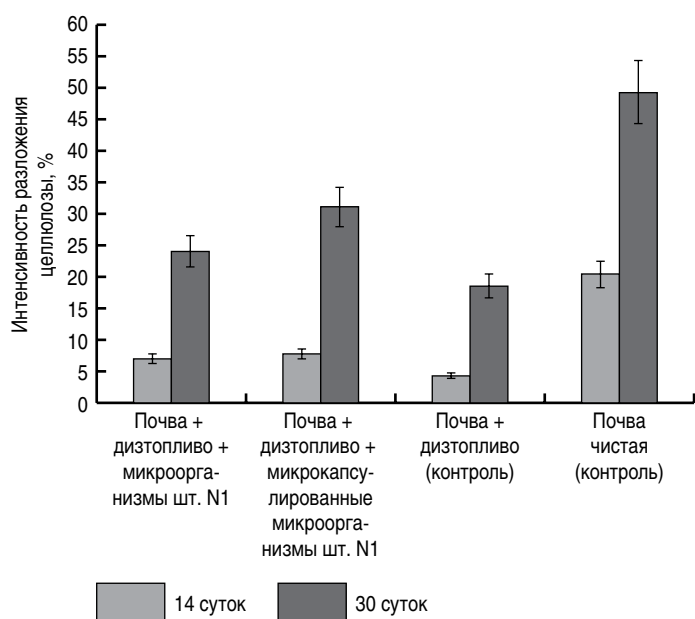


Рис. 7. Интенсивность разложения целлюлозы в почве, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus sp.* шт. N1.

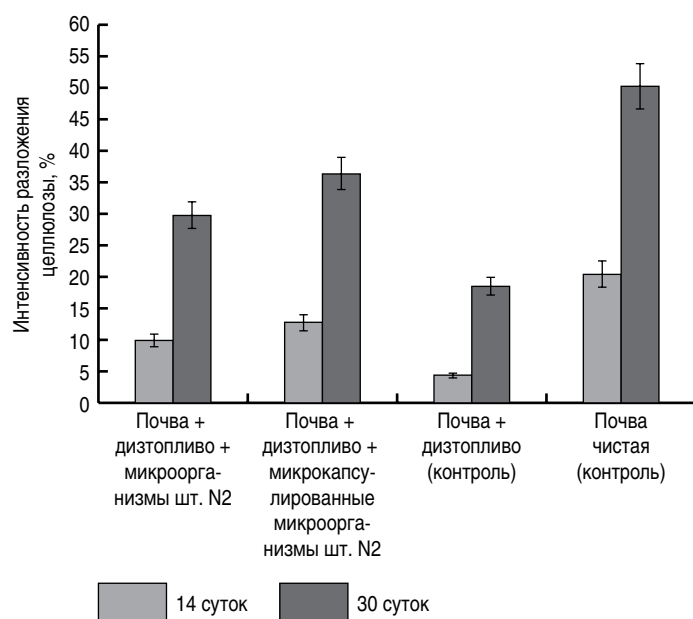


Рис. 8. Интенсивность разложения целлюлозы в почве, загрязненной дизтопливом, в ходе биоремедиации микроорганизмами-деструкторами *Pseudomonas sp.* шт. N2.

Таблица 4. Базальное (БД) и субстрат-индуцированное (СИД) дыхание почвы, загрязненной дизтопливом, в ходе микробной биоремедиации

Варианты опыта	V _{БД} , мкг CO ₂ – С/г почвы в час			V _{СИД} , мкг CO ₂ – С/г почвы в час		
	начало опыта	14 сут	30 сут	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	3,42 ± 0,12*	3,59 ± 0,16*	3,76 ± 0,18*	8,96 ± 0,24*	11,38 ± 0,37*	18,98 ± 0,12*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	3,36 ± 0,12*	3,41 ± 0,08*	3,98 ± 0,21*	8,95 ± 0,58*	14,75 ± 0,40*	23,58 ± 1,01*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	3,04 ± 0,11*	3,48 ± 0,09*	3,51 ± 0,13*	8,94 ± 0,21*	11,25 ± 0,44*	19,60 ± 0,29*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	3,13 ± 0,08*	3,54 ± 0,11*	4,3 ± 0,16*	8,73 ± 0,43*	15,84 ± 0,65*	24,37 ± 0,18*
Почва + дизтопливо (контроль)	3,03 ± 0,09*	2,39 ± 0,08*	2,60 ± 0,09*	8,91 ± 0,20*	10,41 ± 0,51*	12,97 ± 0,77*
Почва чистая (контроль)	5,37 ± 0,10	4,46 ± 0,17	4,71 ± 0,09	26,91 ± 0,14	27,58 ± 0,72	27,82 ± 1,10

*p < 0,05 – в сравнении с контролем (чистая почва).

Таблица 5. Содержание углерода микробной биомассы (С_{мик}) и значения коэффициента микробного дыхания почвы (Q_R), загрязненной дизтопливом, в ходе микробной биоремедиации

Вариант опыта	Q _R , БД/СИД			С _{мик} , мкг CO ₂ – С/г почвы		
	начало опыта	14 сут	30 сут	начало опыта	14 сут	30 сут
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N1	0,38 ± 0,02*	0,31 ± 0,01*	0,20 ± 0,02	359 ± 10*	456 ± 12*	760 ± 5*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N1	0,37 ± 0,02*	0,23 ± 0,01*	0,17 ± 0,01	359 ± 23*	590 ± 16*	944 ± 40*
Почва + дизтопливо + микроорганизмы шт. N2	0,39 ± 0,02*	0,31 ± 0,01*	0,18 ± 0,01	359 ± 8*	470 ± 18*	785 ± 12*
Почва + дизтопливо + микрокапсулированные микроорганизмы шт. N2	0,36 ± 0,02*	0,22 ± 0,01*	0,18 ± 0,01	350 ± 17*	634 ± 26*	976 ± 37*
Почва + дизтопливо (контроль)	0,34 ± 0,01*	0,23 ± 0,02*	0,22 ± 0,02*	357 ± 27*	417 ± 20*	519 ± 31*
Почва чистая (контроль)	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	1077 ± 29	1104 ± 29	1114 ± 44

*p < 0,05 – в сравнении с контрольной группой.

го вещества. В процессе лабораторных исследований было установлено, что при загрязнении дизельным топливом (10 г/кг) достоверно снижается интенсивность почвенного дыхания с 5,37 ± 0,10 до 3,03 ± 0,09 мкг CO₂ – С/г почвы в час.

В процессе микробной биоремедиации базальное дыхание спустя 30 сут достоверно увеличилось только в вариантах с интродукцией микрокапсулированных бактерий-деструкторов в 1,2–1,4 раза. Убыль углеводов в вариантах почвы способствовала интенсификации субстрат-индуцированной активности микрокапсулированными и свободными микроорганизмами-деструкторами в 2,6–2,8 и 2,1–2,2 раза соответственно по сравнению с началом эксперимента (табл. 4).

Коэффициент дыхательной активности микроорганизмов Q_R – важный индикатор состояния и развития микробного сообщества почвы. Согласно литературным данным [18], величина Q_R почв естественных биоценозов при оптимальных условиях варьирует в пределах 0,1–0,2. Величины Q_R, превышающие 0,2–0,3, указывают на неблагоприятные антропогенные или климатические воздействия. В вариантах опыта по микробной биоремедиации, где применялись микрокапсулированные штаммы, а также в контроле (чистая почва) значения Q_R равнялись 0,17, 0,18, 0,17 соответственно (табл. 5).

К числу значимых эколого-физиологических показателей, характеризующих микробное сообщество почвы, относится содержание углерода микробной биомассы С_{мик}. Загрязнение дерново-подзолистой почвы дизельным топливом в начале эксперимента привело к снижению содержания микробного углерода в почве (см. табл. 5) в 3,0 раза.

Через 30 сут инкубации значения С_{мик} увеличились во всех вариантах, содержащих дизельное топливо, причем в наи-

большей степени в опыте с микрокапсулированными микроорганизмами-деструкторами – в 2,6–2,8 раза.

Таким образом, в экспериментах по микробной биоремедиации почвы, загрязненной дизельным топливом, выявлено увеличение численности и биоремедиационного потенциала микробного почвенного сообщества.

Заключение

Внесение в дерново-подзолистую почву дизельного топлива негативно повлияло на биологическую активность почвы. В начале эксперимента в вариантах почвы с дизтопливом, по сравнению с контролем, установлено снижение дегидрогеназной активности, активности гидролаз (по реакции гидролиза ФДА), целлюлозоразлагающей активности, базального и субстрат-индуцированного дыхания почвы, содержания углерода микробной биомассы, а также численности сапрофитных микроорганизмов.

В ходе микробной биоремедиации рост биологической активности, увеличение численности интродуцированных бактерий-деструкторов и сапрофитной микрофлоры на фоне снижения концентрации углеводов и интегральной токсичности загрязненной почвы делает возможным успешное проведение биоремедиации. Применение микрокапсулированных бактерий – деструкторов *Pseudomonas sp.* шт. N2 и *Rhodococcus sp.* шт. N1 в концентрации 10⁷ КОЕ/г почвы для деструкции углеводов дизельного топлива в 1,4 раза эффективнее, чем внесение суспензии микроорганизмов в той же концентрации. Микрокапсулы из полимочевины способствуют увеличению биологической активности и приживаемости бактерий-деструкторов в загрязненной почве.

Таким образом, использование микрокапсулированных микроорганизмов-деструкторов способствует повышению

эффективности биоремедиации загрязненных почв. Полученные результаты позволяют рекомендовать использовать для биоремедиации почв, загрязненных дизельным топливом, микроорганизмы-деструкторы, иммобилизованные на микрокапсулах из полимочевины.

Литература

1. Куранов ПН, Алексахина ВВ, Новикова ТМ. Загрязнение градопромышленных территорий нефтепродуктами и значение этого процесса для биосферы земли. Биосферная совместимость: человек, регион, технологии. 2016; 3(15):3-17.
2. Филатов ДА, Овсянникова ВС. Загрязнения окружающей среды нефтяными углеводородами: проблемы и решения. Экологический вестник России. 2017;6:8-12.
3. Gennadiev AN, Pikovskii YI, Tsi bart AS, Smirnova MA. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). Eurasian Soil Science. 2015;48(10): 1076-1089. DOI: 10.1134/S1064229315100026.
4. Ким СЛ, Самигуллина ГЗ. Негативное воздействие нефтяных углеводородов на почву. Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2015; 9:8-11.
5. Шевченко АА, Кулагин АА, Григоренко ЛВ. Гигиеническая оценка влияния дизельного топлива на микробиоценоз чернозема обыкновенного. Гигиена и санитария. 2016;95(10):942-945. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-10-942-945
6. Баландина АВ, Кузнецов ДБ, Бурдова ЛВ. Самовосстановление нефтезагрязненных почв. Успехи современного естествознания. 2014;4:85-8.
7. Янкевич МИ, Хадеева ВВ, Мурыгина ВП. Биоремедиация почв: вчера, сегодня, завтра. Биосфера. 2015;7(2):199-208.
8. Kis A, Laczi K, Zsíros S, Kos P, Tengolics R, Boundedjoun N, et al. Characterization of the *Rhodococcus sp.* MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017 Dec 1;64(4): 463-482. DOI: 10.1556/030.64.2017.037.
9. Демаков ВА, Максимова ЮГ, Максимов АЮ. Иммобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты. Биотехнология. 2008;2:30-45.
10. Третьякова СЭ. Создание биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов пестицидов прометрина и паратион-метила и испытание технологии ремедиации загрязненных почв. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06. Саратов, 2013, 21 с.
11. Vidican R, Sandor V. Microcosm Experiments as a Tool in Soil Ecology Studies. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture. 2015;72(1):319-320. DOI: 10.15835/buasvmcn-agr: 10618
12. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНДФ 16.1:2.2.22-98. М., 1998, 15 с.
13. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости дафний: Федер. реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03222. М.: Акварос; 2007, 41 с.
14. Хазиев ФХ. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука; 2005, 252 с.
15. Якушев АВ, Бызова БА. Гидролазная активность как показатель состояния микробного сообщества вермикомпоста. Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2009;2:41-6.
16. Звягинцев ДГ. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ; 1991, 231 с.
17. Ананьева НД, Сусьян ЕА, Гавриленко ЕГ. Особенности определения углерода микробной биомассы почвы методом субстрат-индуцированного дыхания. Почвоведение. 2011;11:1327-33.

18. Вершинин АА, Петров АМ, Игнатьев ЮА, Шагидуллин РР. Дыхательная активность дерново-карбонатной почвы, загрязненной дизельным топливом. Вестник Казанского технологического университета. 2011;7:168-74.

References

1. Kuranov PN, Aleksashina VV, Novikova TM. Pollution industrial areas and oil products the value of this process the earth's biosphere. Biospheric compatibility: human, region, technologies. 2016;3(15):3-17. (In Russian).
2. Filatov DA, Ovsyannikova VS. Zagryazneniya okruzhayushchei sredy neftyanymi uglevodorodami: problemy i resheniya. Ekologicheskii vestnik Rossii. 2017;6: 8-12. (In Russian).
3. Gennadiev AN, Pikovskii YI, Tsi bart AS, Smirnova MA. Hydrocarbons in soils: Origin, composition, and behavior (Review). Eurasian Soil Science. 2015; 48(10):1076-1089. DOI: 10.1134/S1064229315100026.
4. Kim SL, Samigullina GZ. The negative impact of petroleum hydrocarbons on soil. Environmental protection in oil and gas complex. 2015;9:8-11. (In Russian).
5. Shevchenko AA, Kulagin AA, Grigorenko LV. Hygienic assessment of the impact of diesel fuel on the ordinary black soil microbiocenosis. Hygiene and sanitation. 2016; 95(10):942-945. DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-10-942-945 (In Russian).
6. Balandina AV, Kuznecov DB, Burdova LV. Self-healing contaminated soil. Advances in Current Natural Sciences. 2014;4:85-8. (In Russian).
7. Yankevich MI, Khadeyeva VV, Murygina VP. Bioremediation of soils: yesterday, today and tomorrow. Biosfera. 2015;7(2):199-208. (In Russian).
8. Kis A, Laczi K, Zsíros S, Kos P, Tengolics R, Boundedjoun N, et al. Characterization of the *Rhodococcus sp.* MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Acta Microbiol Immunol Hung. 2017 Dec 1; 64(4): 463-482. DOI: 10.1556/030.64.2017.037.
9. Demakov VA, Maksimova YuG, Maksimov AYU. Immobilization of Microbial cells: Biotechnological Aspects. Applied Biochemistry and Microbiology Biotechnology in Russia. 2008;2:40-62. (In Russian).
10. Tret'yakova SE. Sozdanie biopreparatov na osnove shtammov-destruktorov pestitsidov prometrina i paration-metila i ispytanie tekhnologii remediatsii zagryaznennykh pochv. Diss. Saratov, 2013, 21 p. (In Russian).
11. Vidican R, Sandor V. Microcosm Experiments as a Tool in Soil Ecology Studies. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture. 2015;72(1):319-320. DOI: 10.15835/buasvmcn-agr: 10618
12. Methods of measuring the mass fraction of petroleum products in mineral, organogenic, organomineral soils and bottom sediments by IR spectroscopy. PNDP 16.1:2.2.22-98. Moscow, 1998, 15 p. (In Russian).
13. Methods of determining the toxicity of water and water extracts from soils, sewage sludge, waste mortality. Federal register 1.39.2007.03222. Moscow: "Akvaros" Publ.; 2007, 41 p. (In Russian).
14. Khaziev FKh. Metody pochvennoi enzimologii. Moscow: "Nauka" Publ.; 2005, 252 p. (In Russian).
15. Yakushev AV, Byzov BA. Hydrolases as a measure of microbial activities of vermicomposting substrates. Moscow University Soil Science Bulletin. 2009;2: 41-6. (In Russian).
16. Zvyagintsev DG. Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhimii. Moscow: Publishing of Moscow State University; 1991, 231 p. (In Russian).
17. Ananyeva ND, Susyan EA, Gavrilenko EG. Determination of the soil microbial biomass carbon using the method of substrate-induced respiration. Eurasian Soil Science. 2011;44(11):1215-21. (In Russian).
18. Vershinin AA, Petrov AM, Ignat'ev YuA, Shagidullin RR. Dykhatel'naya aktivnost' dernovo-karbonatnoi pochvy, zagryaznennoi dizel'nym toplivom. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta. 2011;7:168-74. (In Russian).

Информация об авторах:

Жариков Геннадий Алексеевич, доктор биологических наук, начальник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Крайнова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения токсичности in vitro отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Дядищева Валентина Петровна, научный сотрудник лаборатории изучения токсичности in vitro отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Челпых Людмила Васильевна, младший научный сотрудник отдела экологической биотехнологии Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России
 Адрес: 142253, Московская область, Серпуховский район, п. Большевик, ул. Ленина, 102А
 Телефон: (4967) 705-238

Information about authors:

Gennady A. Zharikov, Dr.Sc. (Biology), Head of the Department of Ecological Biotechnology at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Olga A. Krainova, PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory for in Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Valentina P. Dyadishcheva, researcher of Laboratory for in Vitro Toxicity Studies in the Ecological Biotechnology Department at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

Lyudmila V. Chelpykh, junior researcher of Ecological Biotechnology at Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations – affiliated institution at National Research Center – Institute of immunology of Federal Medical-Biological Agency of Russia
 Address: 102A Lenina str., village Bolshevik, Serpukhov district, Moscow region, 142253, Russian Federation
 Phone: (4967) 705-238

НОВОСТИ НАУКИ

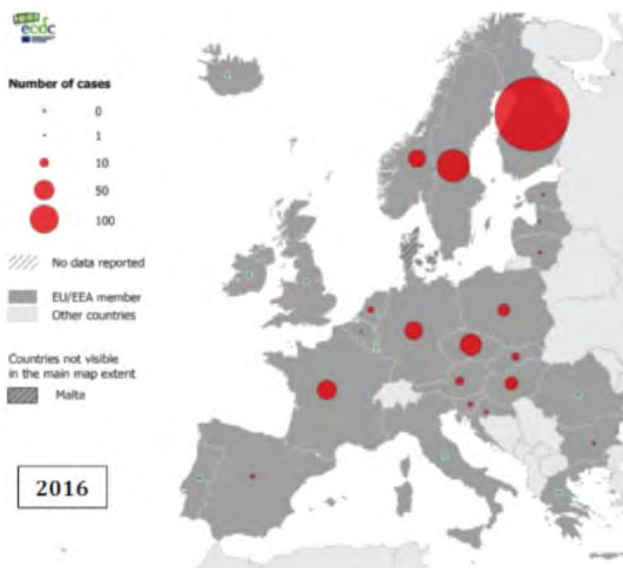
Новые данные о возбудителе туляремии

Недавно опубликована диссертация, посвященная изучению вспышек туляремии в европейских странах.

Исследованы пространственно-временные аспекты генетического разнообразия *F. tularensis*. В результате анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) 205 геномов *F. tularensis* установлено, что туляремия распространялась с востока на запад по Европейскому континенту. В период с 1947 по 2012 гг. темпы эволюции возбудителя не поддавались определению. Однако в очагах свежих вспышек скорость была заметно выше: 0,4 SNPs/геном/год.

Обнаружена способность возбудителя *F. tularensis* выживать в физиологическом растворе в течение четырех лет без питательных веществ.

Представлены данные, дающие новое понимание закономерностей распространения и локальной персистенции туляремии. Это важно для интерпретации молекулярно-эпидемиологических исследований заболевания. В более широком контексте результаты демонстрируют, как пространственное рассредоточение и влияние микробного семенного банка могут способствовать разнообразию возбудителя болезни. Описана концепция для определения источника образцов *F. tularensis*.



Francisella tularensis: persistence, dissemination and source attribution: a theoretical and computational approach. CK Dwibedi. Umeå University, 2019