



Октябрь-декабрь 2024, № 1

ПУШКИНСКИЙ  
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
биологических  
исследований

# *BIOLOGIA et BIOTECHNOLOGIA*



*Современные биотехнологии в растениеводстве: достижения и тренды развития*

*Тенденции в экологической биотехнологии*

*Полифосфаты, полифосфатазная активность и устойчивость к стрессам нокаут-мутантов Ppn1 и Ppn2 *Saccharomyces cerevisiae**

Главный редактор  
А.М. Боронин  
Пушино, Россия



Доступно на  
<http://biolbiotechnol.com>



**Редакционная коллегия:**

**Главный редактор:**

Боронин А.М., д.б.н., чл.-корр. РАН

**Заместитель главного редактора:**

Фесенко Е.Е., к.б.н.

**Ответственный секретарь**

**редакционной коллегии:**

Леонтьевская Н.В., к.б.н.

**Члены редакционной коллегии:**

Авхачева Н.В., к.б.н.

Алексеев А.О., д.б.н., чл.корр. РАН

Башкин В.Н., д.б.н.

Ветрова А.А., к.б.н.

Винокуров М.Г., д.б.н.

Леонтьевский А.А., д.б.н.

Моренков О.С., д.б.н.

Семенов В.М., д.б.н.

Темралеева А.Д., к.б.н.

Шавкунов К.С., к.б.н.

Шитов А.В., к.б.н.

Сайт журнала

*Biologia et Biotechnologia*

<http://biolbiotechnol.com>

является средством массовой информации, зарегистрированным в установленном законодательством Российской Федерации порядке.

**Свидетельство о регистрации**

СМИ серия Эл № ФС77-86313

от 10 ноября 2023 года выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

**Адрес:** 142290, Московская обл., г. Пушкино, пр-т Науки, д. 3

**Адрес электронной почты**

**редакции:** [biolbiotechnol@pbcras.ru](mailto:biolbiotechnol@pbcras.ru),  
[biolbiotechnol@mail.ru](mailto:biolbiotechnol@mail.ru)

Учредитель журнала:

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

## Содержание

### Обзоры:

Темралеева А.Д.

**Современные биотехнологии в растениеводстве: достижения и тренды развития**

.....<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.1>.

Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Ветрова А.А., Иванова А.А., Сазонова О.И., Пунтус И.Ф., Чайка Н.Я., Боронин А.М.

**Современное состояние и тенденции в экологической биотехнологии**

.....<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.2>.

### Статьи:

Васильева Г.К., Михедова Е.Е., Стрижакова Е.Р., Ахметов Л.И.

**Разработка метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных минеральных почв Северо-Западной Сибири на примере подзола иллювиально-железистого**

.....<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.3>.

Трилисенко Л.В., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаковская Е.В., Томашевский А.А., Кулаковская Т.В.

**Полифосфаты, полифосфатазная активность и устойчивость к стрессам нокаут-мутантов Ppn1 и Ppn2 *Saccharomyces cerevisiae***

.....<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.4>.

Пеньков Н. В., Крассова Н.Е., Швирст Н.Э., Фесенко Е.Е. (мл.).

**Вязкость витрифицирующего раствора этиленгликоля в присутствии клатратообразующих газов Хе и Кг, измеренная методом динамического светорассеяния**

.....<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.5>.



УДК 581.6, 632, 631.8

Обзор

## Современные биотехнологии в растениеводстве: достижения и тренды развития

Темралеева А. Д.<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН;

\* Ответственный за переписку: temraleeva.anna@gmail.com

### Цитирование:

Темралеева А.Д.  
Современные  
биотехнологии  
в растениеводстве:  
достижения и тренды  
развития. *Biologia et  
Biotechnologia* 2024, 1, 1.  
[https://doi.org/10.61847/pbc  
ras.bbt.2024.1.1](https://doi.org/10.61847/pbc<br/>ras.bbt.2024.1.1).

Получено: 12.08.2024

Принято: 16.10.2024

Опубликовано: 07.11.2024

Авторские права: © 2024

год от авторов.

Представлено для  
публикации в открытом  
доступе на условиях  
открытой лицензии.

**Реферат:** Обзор посвящен основным современным технологиям растениеводства, направленным на получение высококачественных и экологически безопасных продуктов, а также на снижение потерь урожая и продуктивности, связанных с воздействием различных патогенов и вредителей. Обсуждаются преимущества и недостатки классической селекции, направленной на создание новых и улучшения существующих сортов растений преимущественно путем отбора и гибридизации, и генетическая модификация растений с конкретными примерами. Рассмотрены вопросы генетической паспортизации сельскохозяйственных культур, применения биоудобрений и биопестицидов, а также разработки эффективных тест-систем для диагностики их заболеваний.

**Ключевые слова:** агробиотехнологии; селекция; генномодифицированные растения; биоудобрения; биопестициды.

## Введение

Рост численности мирового населения большинство экспертов считают неизбежным: по состоянию на май 2024 года население Земли составляет 8.108 миллиарда человек [1], по прогнозу к 2030 году население вырастет до 8.5 млрд человек и к 2050 — почти до 10 млрд [2]. Параллельно с ростом народонаселения происходит и повышение среднего уровня благосостояния, а вместе оба фактора являются мощными двигателями увеличения спроса на продукты питания, который сильно неоднороден. По данным ООН в то время как 30% населения Земли лишены доступа к достаточному питанию и около 9 млн человек ежегодно гибнет от голода, 30% всей еды в мире выбрасывается [3-4]. В тоже время, по существующим оценкам, при сохранении текущей интенсивности выбросов углерода в течение ближайших 25 лет произойдет глобальное снижение производительности сельского хозяйства [5], что грозит значимыми изменениями агроклиматических условий и санитарно-эпидемиологической ситуации, включая распространение эпифитотий на новые территории. Повлиять на подобные вызовы развитию и даже существованию человечества призван научно-технический прогресс и шестой технологический уклад, основу которого составляют нанотехнологии. На стыке биологии и нанотехнологии возникла новая область наук — нанобиотехнология, объектами которой являются нанообъекты биогенной природы: ДНК, РНК, антигены, антитела, ферменты и другие биологические макромолекулы. Разработки в области нанобиотехнологии находят практическое применение в медицине, пищевой промышленности, энергетике, охране окружающей среды и сельском хозяйстве. В настоящее время основной вызов для сельскохозяйственной биотехнологии заключается в снижении потерь урожая и продуктивности, связанные с воздействием различных патогенов и вредителей, и получение экологически безопасных продуктов [6]. Есть четыре основных способа решения этой проблемы:

1. Применение химических препаратов (удобрения, пестициды, лекарства, добавки), приводящее к загрязнению окружающей среды, а за счет биомагнификации может происходить повышение концентрации токсичных веществ на каждом трофическом уровне в сети питания.

2. Применение биологических средств защиты растений и животных.

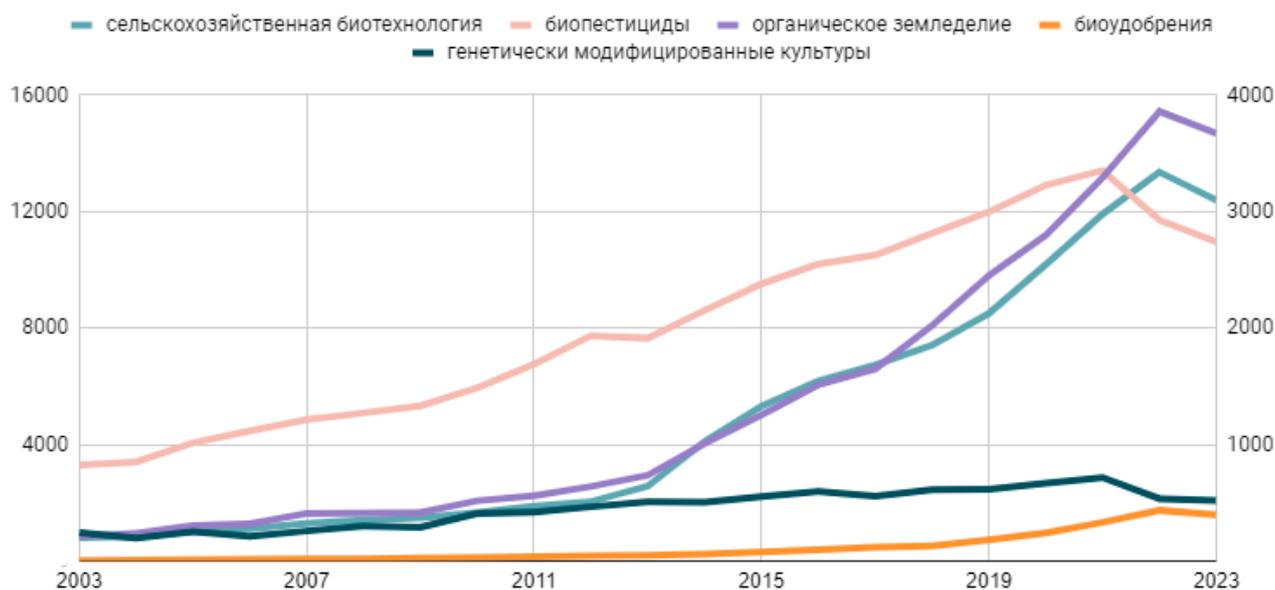
3. Селекция, направленная на создание новых и улучшения существующих сортов растений преимущественно путем отбора и гибридизации. Это длительный процесс, который может занимать годы и десятилетия.

4. Генетическая модификация, которая является целенаправленным изменением генотипа организма, включающим трансгенез, цисгенез, субгенез и интрагенез.

Кроме того, с этой целью разработаны и активно внедряются технологии микрклонального размножения растений, бессубстратные технологии их культивирования (гидро- и аэропоника), сити-фермерство, использование в сельском хозяйстве беспилотных летательных средств для посева семян, внесения удобрений и средств защиты растений, а также дистанционного мониторинга состояния растений и почвы.

Не вызывает сомнения, что как сельскохозяйственная биотехнология в целом, так и ее отдельные направления в последние годы вызывают значительный интерес научного общества (Рисунок 1), который формируется под влиянием глобальных вызовов современности и стремлению человечества к устойчивому развитию.

Россия занимает лидирующую позицию в мире по площади земель сельскохозяйственного назначения и входит в первую пятерку стран по площади пашни и запасам природных ресурсов, таким образом, обладая уникальными природными условиями для обеспечения собственной продовольственной безопасности. Поэтому практические и теоретические направления развития сельскохозяйственной биотехнологии ориентированы на стабильное развитие агропромышленного комплекса (АПК), получение высококачественных, экологически чистых продуктов питания, переработку отходов сельскохозяйственного производства и восстановление плодородия почв. В растениеводстве – это выведение новых сортов растений с улучшенными пищевыми свойствами, устойчивых к неблагоприятным факторам среды (засухе, засоленности, загрязнению и др.); генетическая паспортизация; разработка биологических средств борьбы с сорняками, фитопатогенами и вредителями; производство биоудобрений; переработка отходов и побочных продуктов растениеводства.



**Рисунок 1.** Количество опубликованных статей за период с 2003 по 2023 гг. по запросам ключевых слов «agricultural biotechnology» (левая вертикальная ось), «biopesticides», «biofertilizers», «genetically modified crops» и «organic agriculture» (правая вертикальная ось) по данным базы PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (по состоянию на 8.05.2024 г.).

### Генетико-селекционные технологии для повышения урожайности, качества, устойчивости и безопасности сельскохозяйственных культур

#### *Селекция и геномное редактирование*

С давних времен люди стремились улучшить качественные и количественные свойства используемых сельскохозяйственных культур. Для этого они последовательно отбирали лучшие плоды, самые крупные семена и зерна, постепенно изменяя растения в нужном направлении и осуществляя искусственный отбор. В основе такой фенотипической селекции лежала широкая изменчивость исходного материала и многократная сортировка форм в соответствии с визуальными и органолептическими предпочтениями человека. С открытием фундамента генетики — принципов передачи наследственных признаков от родительских организмов к их потомкам, известных как законы Менделя, появилась возможность сознательно и на научной основе управлять передачей целевых признаков. Стало понятно, что с помощью простого отбора невозможно получить принципиально новые свойства у выращиваемых растений, поэтому для получения новых сортов растений стали использовать скрещивание организмов с необходимыми признаками (гибридизацию). Несмотря на то, что селекция растений успешно применяется с самого начала человеческой цивилизации и по сей день, процесс создания новых сортов остается очень трудоемким и требует многих лет напряженной работы. Основными методами селекции в растениеводстве являются массовый и индивидуальный отбор, внутривидовая и отдаленная гибридная, инцухт (близкородственное скрещивание растений), полиплоидия и экспериментальный мутагенез с помощью радиации или химических веществ [7]. Для перекрестноопыляемых растений наиболее распространен массовый отбор особей с необходимыми свойствами. В результате получают новые сорта, которые не являются генетически однородными. Если необходимо получить генетически однородный сорт (чистую линию), то применяют индивидуальный отбор, при котором получают потомство от одной единственной особи с необходимыми признаками с помощью самоопыления. В самоопыляемых популяциях поддерживается определенный уровень генетической изменчивости. В селекции растений также широко применяется экспериментальная полиплоидия, т.е. кратное увеличение количества хромосом в эукариотической клетке. Полиплоиды отличаются быстрым

ростом, крупными размерами и высокой урожайностью, успешными примерами этого метода являются триплоидные сахарная свекла и безсеменной арбуз, тетраплоидные клевер, гречиха, рожь, кукуруза и твердая пшеница, а также шестиплоидная мягкая пшеница. Получают полиплоиды с помощью искусственного мутагенеза, применяя химические вещества, например колхицин, которые разрушают веретено деления, в результате чего удвоившиеся хромосомы не расходятся и остаются в одном ядре. На базе фенотипической селекции были созданы два новых направления биотехнологии растений — клеточная и гаметно-зиготная селекция [8]. В **клеточной селекции** отбор линий и растений с ценными наследственными признаками происходит на уровне клеток, культивируемых *in vitro*. Неоспоримое достоинство такого подхода заключается в возможности работы с миллионами растительных клеток при проведении направленного отбора в чашках Петри с последующей регенерацией растений, что облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых сортов растений. Основными инструментами являются технологии микрклонального размножения отдаленных гибридов, оплодотворения *in vitro*, культивирования семян и незрелых гибридных зародышей, соматической гибридизации и др. Основная цель **гаметно-зиготной селекции** — отбор искомым рекомбинантов на постмейотических этапах развития организма путем культивирования пыльников и микроспор.

Однако современное сельское хозяйство испытывает острую необходимость в оперативном получении новых сортов сельскохозяйственных культур, отличающихся устойчивостью к воздействию стрессовых биотических и абиотических факторов окружающей среды, высокой продуктивностью, продолжительными сроками хранения урожая и другими характеристиками. Многими необходимыми качествами обладают дикие предки культивируемых растений. Для того чтобы передать их целевые гены современным сортам, необходимо проведение межвидового скрещивания, которое технологически сложнее и даже не всегда возможно ввиду генетической несовместимости. Развитие генетической инженерии, которая сделала возможным перенос генов из одного организма в другой и дало начало развитию **геномной селекции**, став решением данной проблемы. Основными способами биотехнологического изменения генома растений, кроме физического или химического искусственного мутагенеза, являются трансгенез, цисгенез, интрагенез и субгенез [8]. **Трансгенез** — это введение чужеродного гена, называемого трансгеном, от неродственного организма. **Цисгенез** — это введение гена близкородственного вида, с которым потенциально возможен половой процесс в природе. Результат этого метода абсолютно аналогичен классической селекционной работе, но происходит существенно быстрее и исключается попадание в геном реципиента нежелательных сцепленных генов растения-донора [9]. **Интрагенез** — это введение гена того же организма, например улучшение свойств растения путем внедрения в его геном дополнительной копии собственного гена, чтобы добиться сверх-экспрессии, или его «выключения». При **субгенезе** геномодифицированные (ГМ) растения могут быть созданы с использованием нокада генов, который позволяет снизить экспрессию одного или нескольких генов при помощи изменения соответствующей последовательности нуклеотидов либо при помощи короткого олигонуклеотида, комплементарного соответствующей молекуле мРНК, или нокаута генов (инактивация/удаление гена).

Для получения геномодифицированных организмов (ГМО) используют такие биоинженерные технологии как генные пушки, электропорация, микроинъекции, агробактерии и более точные инструменты редактирования геномов. **Генная пушка** реализует технологию биобаллистики и сконструирована как пневматический пистолет, стреляющий частицами вольфрама, серебра или золота, покрытыми репортерными генами. Частицы проникают через клеточную стенку и мембраны органелл, ДНК отделяется от металла и встраивается в ДНК клеток-мишеней, например каллус. Этот метод успешно применялся для многих культур растений, особенно для однодольных, таких как пшеница или кукуруза, для которых трансформация с использованием *Agrobacterium tumefaciens* (= *Rhizobium radiobacter*) оказалась менее успешной. Кроме того, метод используется для доставки ДНК-вакцин. К основным недостаткам этого метода относится высокая доля поврежденных клеток-мишеней. Альтернативой являются методы **микроинъекции**, когда чужеродная ДНК напрямую вводится в клетки-мишени, и **электропорации**, когда чужеродная ДНК проникает в растительные клетки через миниатюрные поры, которые временно создаются электрическими импульсами [10].

Однако наиболее распространенный ранее метод трансформации сельскохозяйственных растений (трансфекции) был опосредован фитопатогенной бактерией *A. tumefaciens*, которая способна к горизонтальному переносу генов, приводящему к пролиферации модифицированных растительных клеток вблизи уровня почвы (коронковый галл). Генетическая информация, необходимая для роста опухоли, закодирована в мобильном кольцевом фрагменте ДНК – Ti-плазмиде [11]. Когда агробактерия заражает растение, она переносит участок Ti-плазмиды, известный как T-ДНК, в случайный участок генома растения. Именно эта способность и используется в генетической инженерии с целью улучшения свойств растений. Сначала бактериальную T-ДНК удаляют из бактериальной плазмиды, оставляя только два маленьких (25 пар оснований) краевых повтора. Гены, которые будут введены в растительную клетку клонируют в специальный вектор для трансформации растений, который состоит из участка T-ДНК обезвреженной плазмиды и селективного маркера, например, гена устойчивости к антибиотику. Последний позволяет отобрать растения, в которых произошла трансфекция: те из них, кто включил в геном T-ДНК и ген устойчивости вырастают на среде с антибиотиком, остальные погибают. Этот метод особенно хорошо работает для двудольных растений, таких как картофель, помидоры и табак, но менее успешен для однодольных. Главный недостаток агробактериальной трансформации — невозможность контролировать, в какое именно место растительной ДНК встроится новая конструкция. Для преодоления этой проблемы используются новейшие методы редактирования генома с помощью особых ферментативных систем – программируемых нуклеазных платформ или «молекулярных ножниц». Эти ферменты создают сайт-специфичные двухцепочечные разрывы в ДНК в определенном участке генома, которые репарируются в процессе рекомбинации, что позволяет получать направленные мутации. В настоящее время используются 4 типа эндонуклеаз: мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (zinc fingers), нуклеазы TALEN и система CRISPR-Cas [12].

**Мегануклеазы** — это наиболее специфические встречающиеся в природе рестрикционные ферменты, характеризующиеся большим сайтом узнавания от 12 до 40 п.н., который обычно встречается только один раз в геноме. Преимуществом мегануклеаз, помимо высокой точности, считают образование при разрезе высокорекомбиногенных 3'-ОН-выступающих концов. Кроме того, генетические рекомбинации, индуцированные мегануклеазами, ограничены их конечным доступным количеством. Несмотря на существование в природе сотен мегануклеаз в про- и эукариотических клетках и тот факт, что каждая из них способна переносить незначительные вариации в своем сайте узнавания, вероятность обнаружения мегануклеазы, способной разрезать данный ген в конкретном месте, достаточно низка. Исправляя малое природное разнообразие этих ферментов, биологи искусственно конструируют инженерные аналоги с гибридной или измененной специфичностью.

**ZFN (Zink Finger Nucleases)** или нуклеазы на основе белков с доменом «цинковые пальцы» — это искусственные рестрикционные ферменты, которые получают сшиванием двух разнородных доменов — ДНК-связывающего домена цинкового пальца, который распознает от 9 до 18 п.н., и нуклеазного, отвечающего за расщепление ДНК. Первый состоит из tandemных микродоменов, структуру которых стабилизируют ионы цинка. Эти «пальцы» широко распространены у эукариот и обеспечивают специфическое взаимодействие несущих их белков с ДНК и другими молекулами, чаще всего регулируя транскрипцию. Каждый из «пальцев» сшит с неспецифически режущим нуклеазным доменом рестриктазы FokI. Такие белки конструировать легче, чем мегануклеазы, но сложно подобрать «пальцы» для всех нужных комбинаций нуклеотидов и обеспечить правильное взаимное расположение двух ZFN. Кроме того, если домены цинковых пальцев недостаточно специфичны для своего сайта-мишени или они не нацелены на уникальный сайт в интересующем геноме, может произойти расщепление вне мишени. В этом случае образуется достаточное количество двухцепочечных разрывов, что угнетает механизм репарации и, как следствие, приводит к хромосомным перестройкам или гибели клеток.

**TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)** — это искусственные нуклеазы на основе эффекторов, подобных активаторам транскрипции, работающие в паре и состоящие из нуклеазного домена FokI и ДНК-связывающего домена TALE. Природные ДНК-связывающие домены TALE тоже участвуют в регуляции экспрессии генов, но только относятся к факторам вирулентности фитопатогенов из рода *Xanthomonas*. Они связываются с промоторами растительных

клетках и меняют работу генов таким образом, чтобы подавить сопротивляемость инфекции. TALE состоят из тандемных повторов аминокислотных модулей, каждый из которых распознает 1 п.н. Эти эндонуклеазы легко конструируются, являются достаточно точными и менее цитотоксичны, чем ZFN.

**Система CRISPR-Cas** — это система адаптивного иммунитета бактерий и архей, в основе которой лежат короткие палиндромные повторы (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats), регулярно расположенные группами и разделенные уникальными последовательностями (спейсерами). Спейсеры заимствуются из чужеродных генетических элементов, с которыми сталкивалась клетка в прошлом. РНК, транскрибирующиеся с локусов CRISPR, совместно с ассоциированными белками Cas обеспечивают адаптивный иммунитет за счет комплементарного связывания РНК с нуклеиновыми кислотами чужеродных элементов и последующего обнаружения их белками Cas. Если фрагмент вируса «записан» в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают чужеродную ДНК и разрушают. Методики CRISPR-Cas используются для направленного редактирования геномов разными научно-исследовательскими группами с 2013 года. И в 2020 году за достижения в этом перспективном направлении генной инженерии была присуждена Нобелевская премия по химии ученым Э. Шарпантье и Д. Дудне за разработку метода геномного редактирования. Более подробно о системах CRISPR/Cas для геномного редактирования растений описано в обзоре Михайловой с соавт. [13].

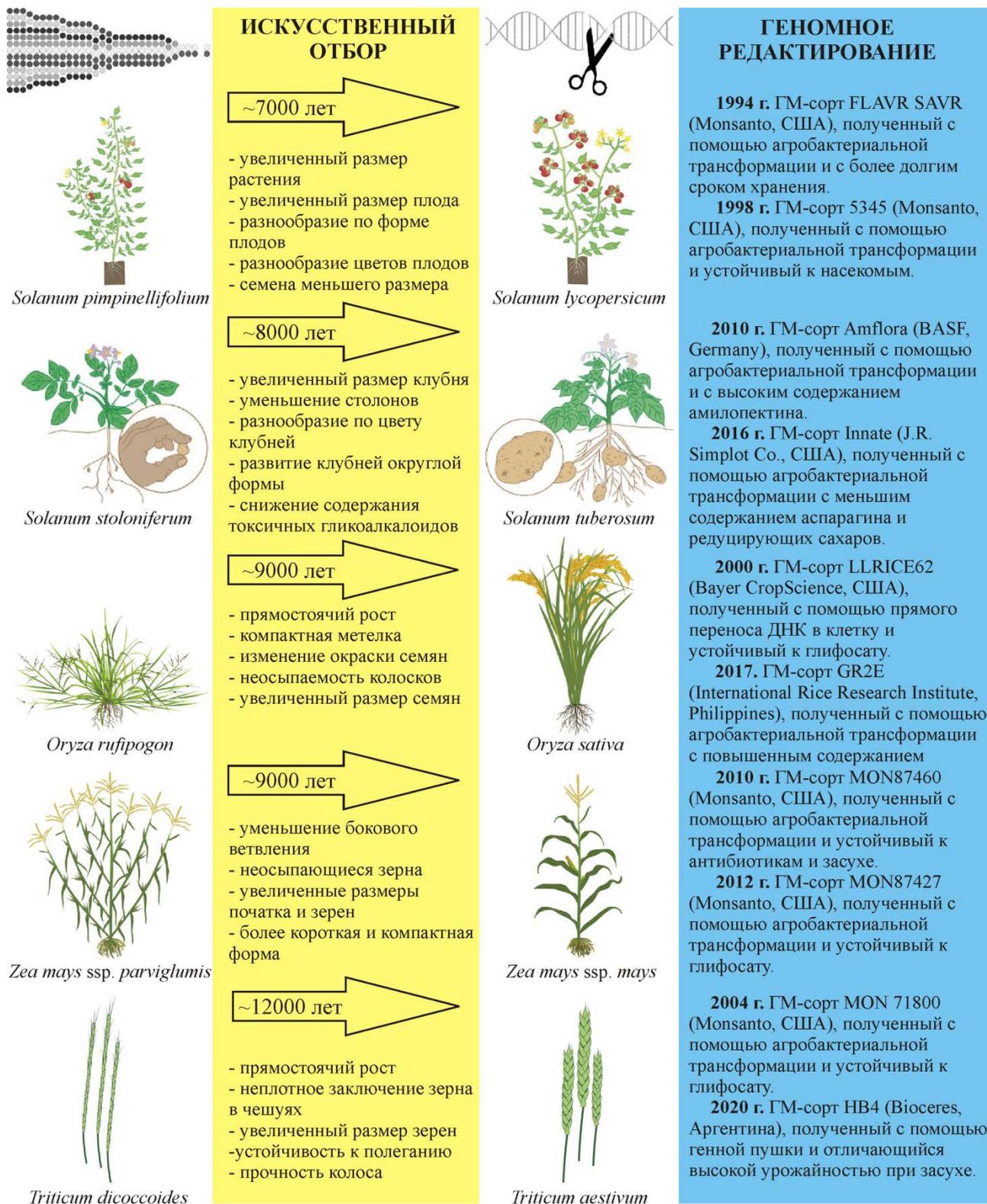
На рисунке 2 обобщены результаты генетико-селекционных технологий доместификации некоторых важнейших сельскохозяйственных культур (томата, картофеля, риса, кукурузы и пшеницы) путем искусственного отбора и далее их геномного редактирования с примерами конкретных ГМ-сортов [14].

#### *Генномодифицированные культуры: примеры, преимущества и риски*

Геномное редактирование является самым современным инструментом для селекции организмов с заданными свойствами. Экономическая ценность ГМ-продуктов для АПК является одним из их основных преимуществ. Например, по данным исследования PG Economics ГМ-культуры увеличили доходы фермеров во всем мире на 14 миллиардов долларов в 2010 году, причем более половины этой суммы приходится на сельское хозяйство в развивающихся странах [15]. Учитывая что 80% площадей сельскохозяйственных угодий в мире отводятся для производства корма животным, а большая часть ежегодно выращиваемых ГМ-культур используется именно на корм скоту и птице, то растущий спрос на мясо приводит к увеличению спроса на ГМ-кормовые культуры [16]. Мета-анализ агрономических и экономических показателей при использовании трех основных сельскохозяйственных ГМ-культур (сои, кукурузы и хлопка) почти за 20-летний период показал, что устойчивые к гербицидам культуры имеют более низкие производственные затраты, в то время как для культур, устойчивых к насекомым, сокращение использования пестицидов было нивелировано более высокими ценами на их семена, в результате чего общие производственные затраты остались приблизительно на том же уровне [17]. При применении ГМ-культур фермеры получили на 69% больше прибыли при увеличении урожайности на 9% для сортов, устойчивых к гербицидам, и на 25% для сортов, устойчивых к насекомым [17]. Еще одно исследование показало, что нокаут генов KRN2 в кукурузе и OsKRN2 в рисе с помощью технологии геномного редактирования CRISPR увеличил урожайность зерна на ~10% и ~8%, соответственно, без каких-либо выявленных негативных последствий [18].

Комбинация таких преимуществ использования ГМО в сельском хозяйстве как повышение урожайности, сокращение использования земельных ресурсов, снижение применения удобрений и пестицидов, уменьшение использования сельскохозяйственной техники создает не только экономический, но и экологический эффект, выраженный в снижении выбросов углерода, связанных с АПК. По оценкам, это сокращение составляет 7.5% от общего объема сельскохозяйственных выбросов в ЕС или 33 миллиона тонн CO<sub>2</sub> [19].

В настоящее время существует научный консенсус о том, что доступные на сегодняшний день продукты питания, полученные из ГМ-культур, не представляют большего риска для здоровья человека, чем обычные продукты питания, полученные традиционными способами [20-21]. Однако любой ГМ-продукт перед внедрением необходимо проверять в каждом конкретном случае [22].



**Рисунок 2.** Характеристики томата, картофеля, риса, кукурузы и пшеницы, полученные путем искусственного отбора и геномного редактирования.

По всему миру проводятся генетические эксперименты, в результате которых получают улучшенные сорта сельскохозяйственных растений, а именно:

1. ГМ-растения с улучшенными пищевыми свойствами — биофортификация или биообогащение. Например, пшеница, рис, бобовые, батат, кукуруза и микрозелень, обогащенные цинком; рис, бобовые и овощи, обогащенные железом; сорго и маниок, обогащенные аминокислотами и протеинами; соя, обогащенная полиненасыщенными жирными кислотами [23]; батат, кукуруза и маниок, обогащенные каротиноидами; ГМ-«золотой рис» с увеличенным содержанием бета-каротина [24]; томаты с высоким содержанием ликопина [25]. Эти сельскохозяйственные культуры могут использоваться как напрямую человеком в пищу, так и в качестве кормов животным. Например, питательная ценность масличной и кормовой культуры рыжика посевного была увеличена за счет генетической модификации, позволяющей накапливать высокие уровни длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот омега-3 [26]. Кроме того, ведутся разработки улучшения вкусовых качеств ГМ-растений, например помидоры без семян [27]. Еще одним аспектом данного направления является безопасность сельскохозяйственных культур, т.е. генетическая модификация растений, которая приводит к снижению содержания природных токсинов в продукции. Например, ГМ-маниок, пищевое клубнеплодное тропическое растение, содержит меньше цианогенных гликозидов и повышенное содержание белка и других питательных веществ [28]. Еще одним примером может служить ГМ-картофель с более низким содержанием аминокислоты аспарагин, которая превращается в канцерогенный акриламид во время его жарки.

2. Растения с более долгим сроком хранения, улучшенным товарным видом или с другими требованиями к выращиванию. Например, были разработаны методы геномного редактирования томата для увеличения лежкости их плодов [29-30]. В коммерческих сортах яблок Arctic подавлена экспрессия гена, ответственного за синтез фермента полифенолоксидазы, благодаря которому плод темнеет на срезе [31]. Были предложены генетические модификации картофеля для его более привлекательного товарного вида при производстве чипсов [32]. Также существуют генетические модификации некоторых сельскохозяйственных культур, например томатов [33], для создания их более компактной формы с целью выращивания их в городских условиях (вертикальные фермы).

3. Культуры, устойчивые к засухе, засолению, загрязнению и другим неблагоприятным стрессовым факторам. Примерами успешной разработки таких культур может стать создание устойчивой к засолению культуры арахиса, генномодифицированной за счет введения посредством агробактериальной трансформации гена ионного транспортера AtNHX1, который связывает избыток ионов натрия в большую внутриклеточную вакуоль [34]. Другой пример связан с биоинженерными исследованиями устойчивости растений к засухе, которая достигается путем модификации генов, ответственных за метаболизм красуловой кислоты или САМ-фотосинтез [35]. Этот механизм возник как адаптация к засушливым условиям у многих растений-ксерофитов и к недостатку воды — у тропических эпифитов. Особенно эти работы актуальны для таких требовательных к содержанию воды сельскохозяйственных культур как рис, пшеница, соевые бобы. У солеустойчивых культур было выявлено несколько механизмов толерантности к засолению.

4. Культуры со множественной устойчивостью к фитопатогенам и вредителям. Один из популярных путей создания устойчивых к насекомым ГМ-растений заключается в использовании энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt) в качестве источника генов эндотоксинов [36]. Внедрение Bt культур в США в период с 1996 по 2005 год сократило общий объем использования инсектицидов почти на 20% [37]. Были созданы устойчивые к вирусам ГМ-сорта папайи, картофеля, кукурузы, кабачков и тыквы.

5. ГМ-растения, устойчивые к пестицидам. Разработка культур, устойчивых к таким гербицидам как глифосат [38-39] и дикамба [40] значительно повысила эффективность сельского хозяйства во всем мире.

6. Высокоурожайные ГМ-культуры с управляемым фотосинтезом. Модификация некоторых генов, участвующих в фотозащитных механизмах, увеличила урожайность табака на 15% [41]. При этом растения отличались от контрольных более высоким ростом, крупными листьями и массивной корневой системой. Еще одно улучшение процесса фотосинтеза касается фотодыхания у С3-растений, которые фиксируют углекислый газ напрямую из воздуха, а не после высвобождения из

малата как у C4- и САМ-растений. Встраивая путь C4 в C3-растения, урожайность зерновых культур, например риса, может увеличиться до 50% [42-43].

7. Культуры, выращиваемые для производства фармацевтических препаратов и кормов для нужд промышленной биотехнологии (вакцины, антитела, биодобавки для улучшения качества кормов, аминокислоты, кормовой белок, ферменты, витамины, пробиотики, ветеринарные биопрепараты), для пищевой биотехнологии (крахмалы и глюкозно-фруктовые сиропы, ферменты и микроорганизмы для молочных, масложировых, мясоперерабатывающих производств, органические кислоты – лимонная, молочная, уксусная и другие, продукты глубокой переработки пищевого сырья, биопластик), для получения биотоплива из отходов в биоэнергетической промышленности.

8. ГМ-растения, улучшающие экологическую ситуацию в мире. Например, применение в сельском хозяйстве генетически модифицированных растений с улучшенными возможностями биосеквестрации углерода. Примером последнего случая служит инициатива Harnessing Plants Initiative (HPI) Института биологических исследований Солка (США) по созданию ГМ-растений с увеличенной корневой массой, глубиной проникновения корней и большим содержанием труднорастворимого биополимера суберина, входящего в состав клеточных стенок, которые будут связывать атмосферный углерод (<https://www.salk.edu/harnessing-plants-initiative/>).

#### *Генетическая паспортизация сельскохозяйственных культур*

Генетическая паспортизация сельскохозяйственных культур подразумевает создание официальных документов о его таксономической принадлежности, ближайшем родстве и характерных отличиях, устойчиво передающихся из поколения в поколение [44]. Для сохранения разнообразия сортов сельскохозяйственных культур рекомендуется развивать подходы к их документированию в соответствии с Международным кодексом номенклатуры культурных растений [45]. В соответствии с Кодексом, номенклатурный стандарт сорта, представленный гербарным образцом, закрепляет его название и помогает избежать их дублирования. Согласно установленной процедуре, автор сорта или представитель учреждения, где сорт был выведен, передает в научный гербарий растительный материал с соответствующей документацией для оформления и сохранения номенклатурных стандартов [45]. Для генотипирования сортов растений используются различные ДНК-маркеры, т. е. полиморфные признаки, выявляемые методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК для определенного гена или для любого другого участка хромосомы при сравнении генотипов различных особей, популяций, сортов, подвидов, видов. Для идентификации и оценки генетических ресурсов культурных растений используют следующие технологии [46]:

- ДНК-маркеры на основе зондов. Например, метод изучения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) с использованием блот-гибридизации. Этот метод включает в себя выделение ДНК из целевого объекта, разрезание ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции, электрофоретическое разделение образовавшихся фрагментов (рестриктов) и гибридизацию специфических ДНК-зондов с полученными рестриктами. Комбинации рестриктаз и ДНК-зондов дают высокоспецифичные полиморфные спектры фрагментов ДНК. Анализ эффективен при картировании генома, маркировании генов селекционно ценных признаков.

- ПЦР-маркеры, основанные на анализе полиморфизма с помощью ПЦР. Например, **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) — ПЦР с использованием единичного короткого праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью; **ISSR** (Inter Simple Sequence Repeats) — специализированный вариант метода RAPD, в котором праймер состоит из микросателлитной последовательности; **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) — метод, совмещающий RFLP и ПЦР; **SSR** (Simple Sequence Repeats) — ПЦР с флангирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору; **IRAP** (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) — анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами; однонуклеотидный полиморфизм **SNP** (Single Nucleotide Polymorphism) — анализ отличий последовательности ДНК размером в один нуклеотид в геноме или его фрагменте у представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом. Для детекции SNPs используют гибридизационные методы, например детекция с помощью ДНК-чипов; ферментативные методы

(RFLP, TaqMan-пробы, капиллярный электрофорез); методы, основанные на физических свойствах ДНК, например, масс-спектрометрия, электрофорез по градиенту температур TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), высокоэффективная жидкостная хроматография в денатурирующих условиях; секвенирование ДНК, включая современные методы высокопроизводительного секвенирования для картирования SNPs на протяжении всего генома. Последний метод является наиболее перспективным благодаря высокой точности, воспроизводимости и автоматизации процесса.

### **Биоудобрения для сельскохозяйственных культур: биостимуляторы и полифункциональные продукты**

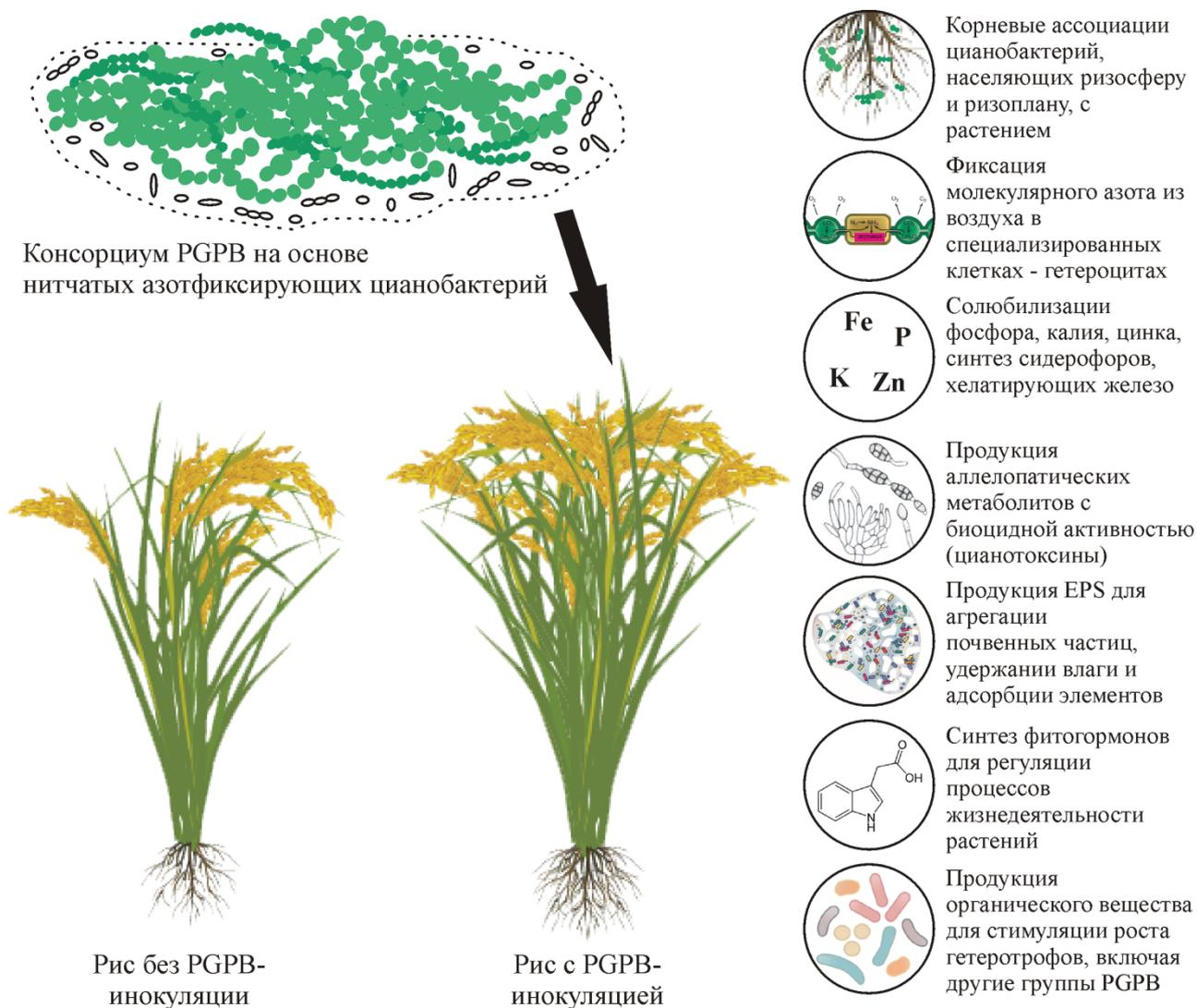
Использование современных агробиотехнологий позволяет заметно увеличить показатели эффективности работы АПК и минимизировать экологический ущерб от производства агропродукции. По оценкам межведомственной рабочей группы по контролю над внедрением биотехнологий при Правительстве РФ, общий экономический эффект от применения биопрепаратов в растениеводстве и животноводстве России может составить более 100 млрд руб. в год при затратах в размере 10,5 млрд рублей [47].

Новым направлением в сельскохозяйственной биотехнологии является разработка и использование биопрепаратов на основе живых организмов и(или) их метаболитов, стимулирующих метаболизм растений и индуцирующих их защитные реакции, например регуляторы роста растений. Многоуровневая система индуцированного фитоиммунитета с большим количеством соединений, участвующих на разных этапах его проявления, обеспечивает возможность изучения большого набора веществ, которые могут быть применены для управления защитными реакциями растений, усилении устойчивости к фитопатогенам. Например, биопрепарат Бион активизирует салициловый путь с сигнальной молекулой салициловой кислотой; биостимулятор Новосил состоит из тритерпеновых кислот, выделенных из древесной зелени сибирской пихты; циркон Р — из гидроксикоричных кислот; Эпин — из брассиностероидов, Иммуноцитифит — на основе арахидоновой кислоты, Рибав-Экстра — L-аланин + L-глутаминовая кислота и др. В целом, биопрепараты, индуцирующие защитные реакции, как правило, уступают по биологической эффективности химическим препаратам и требуют определенных условий использования (особенно температурных). В то же время при низком и среднем уровнях распространения и опасности фитопатогенов они практически не уступают химическим пестицидам по экономической эффективности и превосходят их по безопасности [48].

Одной из разновидностью биоудобрений являются биопрепараты, содержащие бактерии, способствующие росту растений (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB). При нанесении их на семена, поверхность растений или почву они колонизируют ризосферу и способствуют росту за счет увеличения поступления и доступности основных питательных веществ для растения-хозяина [49]. PGPB фиксируют молекулярный азот, растворяют недоступный фосфор и стимулируют рост растений за счет синтеза специфических веществ, например фитогормонов, витаминов, сидерофоров, аминокислот, ферментов, полиаминов, свободных летучих жирных кислот, биоцидных соединений, ингибирующих развитие фитопатогенов и вредителей. Инокулянты таких азотфиксаторов как *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* и гетероцидных цианобактерий применяют для злаковых, бобовых, овощных культур [50-52], и они оказываются эффективнее азотных удобрений, около половины которых не поглощается сельскохозяйственными культурами, а выбрасывается в окружающую среду [53]. Другие представители PGPB, так называемые фосфат-солюбилизующие бактерии, например *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas putida* и многие цианобактерии [54], способны растворять нерастворимый фосфат из органических и неорганических источников фосфата, включая и вносимые фосфорные удобрения. Уровень поглощения последних растением не достигает и 20%, а значительная часть их часть теряется в результате эрозии и выщелачивания [55], загрязняя грунтовые воды и вызывая эвтрофикацию поверхностных вод [56]. Широкий спектр микроорганизмов продуцирует внеклеточные полимерные вещества (Extracellular Polymeric Substances, EPS) — высокогидратированные полимеры, состоящие в основном из полисахаридов, белков и ДНК. EPS имеют основополагающее значение для микробной жизни и обеспечивают идеальную среду для химических реакций, адсорбции питательных веществ и защиты от стрессов

окружающей среды таких как засоление и засуха. Микробные EPS могут усиливать агрегацию почвенных частиц и приносят пользу растениям, поддерживая влажность окружающей среды и адсорбируя питательные вещества [57]. Таким образом, преимущества бактерий, способствующих росту растений, сводятся к следующим их возможностям:

- переводить необходимые биофильные элементы из недоступных или труднодоступных форм в доступные для усвоения растениями, например азот, фосфор, калий, железо, цинк и др. Показано, что инокуляция RGPB способна заменить до 30% химических азотных и фосфорных удобрений, увеличивая урожайность сельскохозяйственных культур на 20-30% [58].
- синтезировать напрямую рост-стимулирующие вещества (фитогормоны, аминокислоты, витамины и пр.);
- продуцировать EPS, от которых зависит агрегация почвенных частиц, влагоудерживающая способность почв и адсорбция питательных веществ;
- контролировать численность фитопатогенов и вредителей за счет биоцидной активности;
- улучшать состояние почвы благодаря способности к детоксикации ксенобиотиков, например, разложение остатков химических пестицидов.



**Рисунок 3.** Механизмы стимулирования роста риса с помощью инокуляции полифункционального препарата на основе цианобактерий.

На рисунке 3 представлена концептуальная схема влияния RGPB на рост растения на примере риса и цианобактерий [50]. Предполагается, что в будущем для ускоренной коммерциализации и повышенной востребованности аграрным сектором будут способствовать новые подходы к разработке полифункциональных биопрепаратов, составов с более длительным сроком хранения (микроинкапсулирование), поиску и(или) созданию эффективных штаммов с помощью методов генной инженерии [59].

### Биологические средства защиты растений

Согласно оценкам ФАО до 40% продовольственных культур в мире ежегодно теряется из-за вредителей и болезней растений. Из порядка 70 тыс. видов известных вредных организмов серьезную опасность представляют только 10%, и для их подавления ежегодно используют более 2.5 млн т химических пестицидов [48]. Химическая и биологическая защита растений не противопоставляются и не взаимоисключаются в интегрированной системе защиты растений, а взаимодействуют для решения задачи повышения продуктивности агроэкосистем, безопасности агропродукции и снижения негативного влияния на окружающую среду.

Биологическая система защиты и питания растений сегодня предоставляет научно обоснованные решения, не уступающие по эффективности химической, а в некоторых аспектах ее превосходит. Биопестициды — это вещества, используемые для уничтожения вредителей и возбудителей болезней растений, а также различных паразитов и сорняков, получаемые в основном с помощью микроорганизмов. В России согласно ГОСТ Р 56694-2015 «Возобновляемые источники сырья. Сельскохозяйственные ресурсы. Термины и определения» это биологические средства защиты растений, которые используют для борьбы с вредителями культурных растений, представляющие собой живые объекты или естественные биологически высокоактивные химические соединения, синтезируемые живыми организмами. Их можно разделить на три категории [60]:

1. Биопрепараты на основе микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов и простейших) и продуктов их жизнедеятельности.

2. Биопрепараты из растений, растительных экстрактов (хвои, роз, барбариса, женьшеня и др.) и прочих природных субстратов, включая ГМО. Например, хитозан вызывает повышение системной устойчивости растения, что позволяет защититься от болезней, патогенов и вредителей [61]. Чесночное масло обладает инсектицидными свойствами [62].

3. Феромоны — препараты на основе природных соединений, не оказывающих токсического действия на вредные организмы, а влияющих только на их поведение. Эту категорию обычно применяют в виде приманок и ловушек для вредных насекомых.

Основными движущими силами рынка биопестицидов в мире являются развитие органического земледелия и устанавливаемые на государственном уровне более жесткие экологические требования к агропродукции.

К преимуществам использования биопестицидов можно отнести следующее:

1. полный или частичный отказ от использования химических средств защиты растений, сокращение общей пестицидной нагрузки на агроэкосистемы и, как следствие, улучшение состояния и плодородия почв;

2. безопасность и высокая скорость биоразложения;

3. снижение риска появления резистентности у фитопатогенов и вредителей;

4. селективность действия в отношении широкого спектра вредных насекомых и фитопатогенов;

5. применение в любую фазу вегетации и короткий период ожидания для сбора урожая после обработки;

6. использование в интегрированных системах защиты сельскохозяйственных культур;

7. высокая рентабельность за счет более низкой цены препарата, его пролонгированного действия и высокой эффективности при правильном применении;

8. возможность переориентации ряда хозяйств на производство органической продукции.

Недостатки заключаются в профилактическом характере действия, когда биопестициды должны применяться до того, как болезнь сельскохозяйственных культур масштабно

распространится в поле и до того, как популяции насекомых-вредителей станут слишком многочисленными.

В России рынок биопестицидов находится на начальном этапе развития. Так, в настоящее время в России только 9% посевной площади зерновых и 4% сахарной свеклы обрабатываются биопестицидами [63]. По данным Союза органического земледелия в реальную практику биологическая система защиты растений внедрена на 2% сельхозугодий РФ [64]. Тем не менее, сегмент биопестицидов за последние 5 лет увеличился в 2 раза [65], а до 2030 года прогнозируется его ежегодный рост на 5-10%. Наиболее популярна предпосевная обработка семян и посевного материала биопестицидами, которая позволяет не только уничтожить инфекции семян, но и обезопасить проростки от почвенной патогенной микрофлоры, что позволяет увеличить всхожесть и качество посадок. В таблице приведены данные по некоторым отечественным биопрепаратам с биоцидной активностью, представленным на рынке. При регистрации биопестицидов учитывают токсичность, патогенность, инфекционность, экотоксикологию, разложение биопестицида в природной среде и другие показатели.

**Таблица.** Примеры российских биопестицидов [66]

Действующий агент	Фитопатогены/вредители	Коммерческое название биопрепарата
СрGV вирус гранулеза яблонной плодовой жорки	Насекомые	Карповирусин, Мадекс Твин
Бактерии <i>Bacillus subtilis</i>	Грибы	Алирин-Б, Гамаир, Фитолек
Бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i>	Чешуекрылые насекомые, паутинный клещ и личинки колорадского жука	Лепидоцид, Бикол, Битоксибациллин, Инсетим
Бактерии <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Flavobacterium</i>	Нематоды семейства Steinernematidae	Немабакт, Энтонем-Ф
Бактерии <i>Salmonella enteritidis</i> , var. <i>Issatschenko</i>	Грызуны	Бактороденцид
Бактерии <i>Streptomyces avermitilis</i>	Галовые нематоды, насекомые	Акарин, Фитоверм
Грибы <i>Arthrobotrys oligospora</i>	Нематоды	Нематофагин-Микопро
Грибы <i>Beauveria bassiana</i>	Насекомые	Биослип БВ
Грибы <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> и <i>Metarhizium anisopliae</i> subsp. <i>atis</i>	Насекомые	Пециломицин, Кордицепс-Микопро почвенный
Грибы <i>Trichoderma</i>	Грибы	Триходерма Вериде, Трихоцин, Трихофлор

Еще одним препятствием для ускоренного производства биопестицидов является недостаточное количество научных исследований о токсин-продуцирующих возможностях разных групп микроорганизмов для создания новых биопестицидов и биологических контролируемых агентов. Другими сдерживающими факторами развития рынка биопестицидов являются недостаточная осведомленность и понимание их пользы агрономами, производителями, консультантами по выращиванию культур. Кроме того, аграрные предприятия в большинстве своем существуют в условиях низкой рентабельности и их многолетний опыт применения химических средств защиты растений соответствует коммерческими интересами, ориентированным на увеличение выхода продукции растениеводства с единицы посевной площади, ее сохранности и устойчивости к транспортировке. Вопросы безопасности и экологичности при этом часто отходят

на второй план. В России отмечается слабый уровень культуры земледелия в целом и осведомленности о современных тенденциях аграрной практики. Органическое земледелие, получившее широкое распространение в Европе, только начинает развиваться в нашей стране. Тем не менее, невысокий уровень использования биопестицидов в России не отражает их важную социально-экономическую роль в обществе. Биологическая защита растений остается недооцененной в ситуациях, когда химические средства являются неэффективными, недоступными или запрещенными. Примерами могут служить территории выращивания продукции для детского и диетического питания, территории с особым природоохранным статусом, например, рекреационные, курортные, лесопарковые, водоохранные зоны и заповедники, а также зоны с уже неблагоприятной экологической обстановкой, загрязненные тяжелыми металлами, органическими веществами и радионуклидами.

### **Тест-системы для диагностики заболеваний сельскохозяйственных культур**

Успешное развитие растениеводства неразрывно связано с обеспечением эффективной защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов — патогенных организмов, вызывающих инфекционные болезни растений.

Основными фитопатогенами являются:

1. вирусы и виroidы, вызывающие вирус табачной мозаики, вирус кустистой карликовости малины, виroid веретеновидности клубня картофеля и др.;
2. бактерии, включая фитоплазмы, вызывающие корончатый галл, столбур пасленовых, паршу, бактериальный ожог плодовых культур и др.;
3. грибы и грибоподобные организмы, вызывающие фитофтороз, антракноз, мучнистую росу, альтернариоз, головню, пузырчатую ржавчину и др.;

Кроме того, заболевания растений могут иметь неинфекционную природу и быть связаны с абиотическими факторами среды, например с экстремальными режимами температуры, влажности и освещенности, дефицитом или избытком биоэлементов и др.

Фитопатогены характеризуются такими свойствами как:

- патогенность, т.е. способность вызывать заболевание;
- агрессивность, т.е. способность к интенсивному размножению внутри инфицированного растения;
- вирулентность, т.е. способность инфекционного агента вызывать заболевание или гибель организма.

Фитопатогены могут распространяться с помощью вредителей-переносчиков, например трипсы и вирус бронзовости томата, белокрылка и вирус желтой курчавости листьев томата, тли и вирус мозаики огурца и др. [67].

Ежегодные потери урожая, вызванные инфекционными заболеваниями составляют не менее 10-16% [68], а при возникновении эпифитотий потери достигают 80% [69]. Несомненно эффективность борьбы с инфекциями растений многократно выше на первых стадиях их развития, поэтому своевременная, быстрая и точная диагностика заболевания является важной задачей сельскохозяйственной фитопатологии. Идентификация возбудителей заболеваний также проводится при сертификации семян и посадочных растений, фитосанитарном мониторинге посевов, селекции и карантинной проверке импортируемого семенного материала. Существует несколько основных способов идентификации фитопатогенов:

1. Морфологическая диагностика, т.е. идентификация по внешним признакам заболевания (симптомам), например, задержка роста, изменение окраски, формы и размеров различных органов, поражения некротического типа. Визуальный осмотр — наиболее простой и традиционный способ, но и наименее надежный: симптомы бывают универсальные и не всегда быстро проявляются после инфицирования.

2. Тестирование на растениях-индикаторах — специальных индикаторных видах, которые дают четкую и типичную реакцию на заражение конкретным возбудителем, например марь степная, дурман, лебеда садовая и др.

3. Метод включений, основанный на выявлении с помощью световой или электронной

микроскопии характерных внутриклеточных вирусных включений аморфной и кристаллической формы.

4. Иммуноферментный анализ (ИФА) состоит из двух основных этапов: иммунной и ферментативной реакций. Иммунная реакция заключается в специфическом связывании характерного для данного патогена антигена с диагностическим антителом. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала (ферментативная реакция). Одним из наиболее распространенных вариантов ИФА является ELISA-тест (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Основанные на ИФА методы широко применяются для обнаружения вирусов, но значительно реже — для идентификации грибов и бактерий, что связано со сложностью получения антител с необходимой специфичностью. Для оперативного выявления болезней растений разработаны иммунострипы — тест-полоски для экспресс-диагностики в полевых условиях, например ImmunoStrip® Tests (Agdia, США).

5. Молекулярно-генетическая диагностика заключается в накоплении большого количества копий целевой ДНК патогена в культивируемом состоянии или из образца пораженного растения. Среди разновидностей различают прямую полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (для РНК-вирусов), вложенную ПЦР и ПЦР с регистрацией в режиме реального времени (для количественного определения целевой ДНК), изотермическую амплификацию (LAMP), ДНК-микрочипы с возможностью идентифицировать целый спектр патогенов, цифровую ПЦР и технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS). Достоинствами этой группы методов является специфичность, чувствительность и надежность определения фитосанитарного состояния сельскохозяйственных растений. В настоящее время разработан спектр коммерческих диагностических наборов отечественных компаний «Синтол», «Генбит», «ДНК-технология» и др.

Эффективная защита сельскохозяйственных культур от фитопатогенов и их переносчиков должна включать в себя не только раннюю и эффективную диагностику заболевания, но и комбинацию биологических, агротехнических, химических, физических и других приемов, направленных на профилактику комплекса болезней, например, пространственную изоляцию культивируемых растений от источников инфекции, использование для посадки здорового семенного материала, уничтожение сорняков-резервуаров инфекций, соблюдение оптимальных сроков, норм посева и густоты посадок, применение химических и биологических средств в борьбе с фитопатогенами и переносчиками заболеваний, а также использование устойчивых сортов. Такая система управления фитосанитарным состоянием агроэкосистем называется интегрированная защита растений и предназначена для обеспечения их фитосанитарного благополучия [70].

### Заключение

Изменение климата, истощаемость природных ресурсов, рост народонаселения, деградация земель оказывают дополнительное давление на снабжение сельскохозяйственным продовольствием. В настоящее время активно обсуждается взаимосвязь между микробиомами почвы, растений, животных и человека в рамках концепции «единого здоровья» — «healthy roots - healthy plants - healthy people» [71]. Почвы являются краеугольным камнем здоровья и служат источником и резервуаром патогенов, и полезных микроорганизмов, и общего микробного разнообразия. По данным ФАО ООН производство 95% продуктов питания напрямую или косвенно связано с почвой [72], в то время как треть почв во всем мире деградировала из-за эрозии, засоления, подкисления, загрязнения и других негативных процессов [73]. Соблюдая баланс между использованием природоподобных технологий и новейших достижений биоинженерии, включающий частичный отказ от химических пестицидов и удобрений в пользу биопрепаратов, стимулирующих рост растений и ингибирующих вредителей и фитопатогенов; разработку генномодифицированных сортов растений и пород животных при условии их высокой продуктивности, безопасности и устойчивости; создание тест-систем с целью диагностики заболеваний сельскохозяйственных растений и животных, а также препаратов для их лечения и профилактики, мы вносим вклад в необходимое удовлетворение текущих потребностей человека при сохранении окружающей среды и рациональном использовании ресурсов без ущерба для будущих поколений.

## Финансирование

Работа выполнена в рамках реализации госзадания Министерства образования и науки РФ.

## Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

1. World Population Clock: 8.1 Billion People. 2024. Worldometers. Доступен по ссылке: <https://www.worldometers.info/world-population> (дата посещения: 07.05.2024).
2. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. *World Population Prospects* (New York, 2022).
3. Треть продуктов питания в мире выбрасывается. В ООН запустили глобальную кампанию по борьбе с потерей продовольствия. Доступен по ссылке: <https://news.un.org/ru/story/2019/10/1364302> (дата посещения: 07.05.2024).
4. In world of wealth, 9 million people die every year from hunger, WFP Chief tells Food System Summit. Доступен по ссылке: <https://www.wfp.org/news/world-wealth-9-million-people-die-every-year-hunger-wfp-chief-tells-food-system-summit> (дата посещения: 07.05.2024).
5. АПК будущего. Взгляд на сельское хозяйство сквозь призму анализа больших данных Доступен по ссылке: <https://www.agroinvestor.ru/analytics/article/31304-apk-budushchego> (дата посещения: 07.05.2024).
6. Maхmen A. Crop pests: under attack. *Nature*, **501**, 15–17 (2013). DOI: 10.1038/501S15a
7. Инге-Вечтомов С.Г. *Генетика с основами селекции* (Н-Л, СПб, 2015).
8. Косолапов В.М., Козлов Н.Н. и Клименко И.А. Геномная селекция: этапы развития. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*, **1**, 8–12 (2018).
9. Telem R.S., Wani S.H., Singh N.B., Nandini R., Sadhukhan R., Bhattacharya S. and Mandal N. Cisgenics - a sustainable approach for crop improvement. *Curr. Genomics*, **14**(7), 468–476 (2013). DOI: 10.2174/13892029113146660013
10. Maghari V.M. and Ardekani A.M. Genetically modified foods and social concerns. *Avicenna J Med Biotechnol.*, **3**(3), 109–117 (2011).
11. Шевелуха В.С. и др. *Сельскохозяйственная биотехнология* (Высшая школа, М., 2003).
12. Esvelt K.M. and Wang H.Y. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular Systems Biology*, **9**, 641 (2013). DOI: 10.1038/msb.2012.66
13. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Чемерис А.В. и Кулуев Б.Р. Доступный арсенал систем CRISPR/Cas для геномного редактирования растений. *Физиология растений*, **69**(1), 38–53 (2022). DOI: 10.31857/S0015330322010134
14. Luo G., Najafi J., Correia P.M.P., Trinh M.D.L., Chapman E.A., Østerberg J.T., Thomsen H.C., Pedas P.R., Larson S., Gao C., Poland J., Knudsen S., DeHaan L. and Palmgren M. Accelerated domestication of new crops: yield is key. *Plant Cell Physiol.*, **63**(11), 1624–1640 (2022). DOI: 10.1093/pcp/pcac065
15. Brookes G. and Barfoot P. *GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2014*. (PG Economics Ltd., Dorchester, 2016). DOI: 10.1080/21645698.2022.2118497
16. Tilling T., Neeta L., Vikuolie M. and Rajib D. Genetically modified (GM) crops lifeline for livestock review. *Agricultural Reviews*, **31**(4), 279–285 (2010).
17. Klümper W. and Qaim M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLOS ONE*, **9**(11), e111629 (2014). DOI 10.1371/journal.pone.0111629
18. Chen W., Chen L., Zhang X., Yang N., Guo J., Wang M., Ji S., Zhao X., Yin P., Cai L., Xu J., Zhang L., Han Y., Xiao Y., Xu G., Wang Y., Wang S., Wu S., Yang F., Jackson D., Cheng J., Chen S., Sun C., Qin F., Tian F., Fernie A.R., Li J., Yan J. and Yang X. Convergent selection of a WD40 protein that enhances grain yield in maize and rice. *Science*, **375**(6587), eabg7985 (2022). DOI: 10.1126/science.abg7985

19. Kovak E., Blaustein-Rejto D. and Qaim M. Genetically modified crops support climate change mitigation. *Trends in Plant Science*, **27**(7), 627–629 (2022). DOI: 10.1016/j.tplants.2022.01.004
20. Andersson H.C., Arpaia S., Bartsch D., Casacuberta J., Davies H., du Jardin P., Flachowsky G., Herman L., Jones H., Kärenlampi S., Kiss J., Kleter G., Kuiper H., Messéan A., Nielsen K.M., Perry J., Pötting A., Sweet J., Tebbe C., Johannes von Wright A. and Wal J.-M. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*, **10**, 2561 (2012). DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2561
21. Nicolìa A., Manzo A., Veronesi F. and Rosellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Critical Reviews in Biotechnology*, **34**(1), 77–88 (2014). DOI: 10.3109/07388551.2013.823595
22. Haslberger A.G. Codex guidelines for GM foods include the analysis of unintended effects. *Nature Biotechnology*, **21**(7), 739–741 (2003). DOI:10.1038/nbt0703-739
23. Clemente T.E. and Cahoon E.B. Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. *Plant Physiology*, **151**(3), 1030–1040 (2009). DOI: 10.1104/pp.109.146282
24. Nayar A. Grants aim to fight malnutrition. *Nature*, (2011). DOI: 10.1038/news.2011.233
25. Li X., Wang Y., Chen S., Tian H., Fu D., Zhu B., Luo Y. and Zhu H. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front. Plant Sci.*, **9**, 559 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.00559
26. Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Napier J.A. and Sayanova O. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *The Plant Journal*, **77**(2), 198–208 (2014). DOI:10.1111/tpj.12378
27. Ueta R., Abe C., Watanabe T., Sugano S.S., Ishihara R., Ezura H., Osakabe Y. and Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, **7**, 507 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-00501-4
28. Sayre R., Beeching J.R., Cahoon E.B., Egesi C., Fauquet C., Fellman J., Fregene M., Gruissem W., Mallowa S., Manary M., Maziya-Dixon B., Mbanaso A., Schachtman D.P., Siritunga D., Taylor N., Vanderschuren H. and Zhang P. The BioCassava plus program: biofortification of cassava for sub-Saharan Africa. *Annual Review of Plant Biology*, **62**, 251–272 (2011). DOI:10.1146/annurev-arplant-042110-103751
29. Meli V., Ghosh S., Prabha T., Chakraborty N., Chakraborty S. and Datta A. Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *PNAS*, **107**(6), 2413–2418 (2010). DOI: 10.1073/pnas.0909329107
30. Кузьмина Ю.В. Методы редактирования генома для увеличения лежкости плодов томата. *Биотехнология и селекция растений*, **3**(1), 31–39 (2020). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-06
31. Waltz E. Nonbrowning GM apple cleared for market. *Nature biotechnology*, **33**(4), 326–327 (2015). DOI: 10.1038/nbt0415-326c
32. Halterman D., Guenther J., Collinge S., Butler N. and Douches D. Biotech Potatoes in the 21st Century: 20 Years Since the First Biotech Potato. *Am. J. Potato Res.*, **93**, 1–20 (2016). DOI: 10.1007/s12230-015-9485-1
33. Kwon C.T., Heo J., Lemmon Z.H., Capua Y., Hutton S.F., Van Eck J., Park S.J. and Lippman Z.B. Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture. *Nat. Biotechnol.*, **38**, 182–188 (2020). DOI: 10.1038/s41587-019-0361-2
34. Banjara M., Zhu L., Shen G., Payton P. and Zhang H. Expression of an Arabidopsis sodium/proton antiporter gene (AtNHX1) in peanut to improve salt tolerance. *Plant Biotechnol. Rep.*, **6**, 59–67 (2012). DOI: 10.1007/s11816-011-0200-5
35. Liang C. Genetically Modified Crops with Drought Tolerance: Achievements, Challenges, and Perspectives. In *Drought Stress Tolerance in Plants*, Eds by M. Hossain, S. Wani, S. Bhattacharjee, D. Burritt, L.S. Tran (Springer, Cham, 2016). pp. 531–547. DOI: 10.1007/978-3-319-32423-4\_19
36. Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M. and Leemans J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328**, 33–37 (1987). DOI: 10.1038/328033a0
37. Naranjo S. *The Present and Future Role of Insect-Resistant Genetically Modified Cotton in IPMF*

- (USDA. gov. United States department of agriculture, 2008). DOI: 10.1007/978-1-4020-8373-0\_6
38. Heck G.R., Armstrong C.L., Astwood J.D., Behr C.F., Bookout J.T., Brown S.M., Cavato T.A., DeBoer D.L., Deng M.Y., George C., Hillyard J.R., Hironaka C.M., Howe A.R., Jakse E.H., Ledesma B.E., Lee T.C., Lirette R.P., Mangano M.L., Mutz J.N., Qi Y., Rodriguez R.E., Sidhu S.R., Silvanovich A., Stoecker M.A., Yingling R.A., You J. Development and Characterization of a CP4 EPSPS-Based, Glyphosate-Tolerant Corn Event. *Crop Sci.*, **45**(1), 329–339 (2005). DOI:10.2135/cropsci2005.0329
  39. Funke T., Han H., Healy-Fried M.L., Fischer M., Schönbrunn E. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *PNAS*, **103**(35), 13010-13015 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0603638103
  40. Widespread crop damage from dicamba herbicide fuels controversy. Доступен по ссылке: <https://cen.acs.org/articles/95/i33/Widespread-crop-damage-dicamba-herbicide.html> (дата посещения: 07.05.2024).
  41. Kromdijk J., Głowacka K., Leonelli L., Gabilly S.T., Iwai M., Niyogi K.K. and Long S.P. Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection. *Science*, **354**(6314), 857–861 (2016). DOI:10.1126/science.aai887
  42. Evans J.R. Improving photosynthesis. *Plant Physiology*, **162**(4), 1780–1793 (2013). DOI: 10.1104/pp.113.219006
  43. Karki S., Rizal G. and Quick W.P. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. *Rice*, **6**(1), 28 (2013). DOI: 10.1186/1939-8433-6-28
  44. Косолапов В.М., Козлов Н.Н., Клименко И.А. и Золотарев В.Н. Генетическая паспортизация селекционных достижений кормовых культур. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*, **5**, 40–46 (2020). DOI: 10.30850/vrsn/2020/5/40-46
  45. Brickell C.D., Alexander C., Cubey J.J., David J.C., Hoffman M.H.A., Leslie A.C., Malécot V. and Xiaobai J. *International code of nomenclature for cultivated plants* (Scripta Horticulturae, Leuven, 2016).
  46. Сухарева А.С. и Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*, **10**(1), 69-84 (2018).
  47. Распоряжение Правительства РФ от 04.07.2023 N 1788-р «Об утверждении Стратегии развития производства органической продукции в Российской Федерации до 2030 года». Доступен по ссылке: <https://soz.bio/strategiyu-razvitiya-organicheskogo-pr/> (дата посещения: 07.05.2024).
  48. Захаренко В.А. Биопестициды и средства защиты растений с небioцидной активностью в интегрированном управлении фитосанитарным состоянием зерновых агроэкосистем. *Агрoхимия*, **6**, 64-76 (2015).
  49. Kevin V.J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**(2), 571–586 (2003). DOI:10.1023/A:1026037216893
  50. Alvarez A.L., Weyers S.L., Goemann H.M., Peyton B.M. and Gardner R.D. Microalgae, soil and plants: A critical review of microalgae as renewable resources for agriculture. *Algal Res.*, **54**, 102200 (2021). DOI:10.1016/j.algal.2021.102200
  51. Song X., Bo Y., Feng Y., Tan Y., Zhou C., Yan X., Ruan R., Xu Q. and Cheng P. Potential applications for multifunctional microalgae in soil improvement. *Front. Environ. Sci.*, **10** (2022) DOI: 10.3389/fenvs.2022.1035332
  52. Solomon W., Mutum L., Janda T. and Molnár Z. Potential benefit of microalgae and their interaction with bacteria to sustainable crop production. *Plant Growth Regul.*, **101**, 53–65 (2023). DOI: 10.1007/s10725-023-01019-8
  53. Bouwman A.F., Beusen A.H.W. and Billen G. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970–2050. *Glob. Biogeochem. Cycles*, **23**, (2009). DOI: 10.1029/2009GB003576
  54. Rawat P., Das S., Shankhdhar D. and Shankhdhar S.C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, **21**, (2021). DOI: 10.1007/s42729-020-00342-7
  55. Elser J.J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Curr Opin Biotechnol.*, **23**(6), 833–838 (2012). DOI: 10.1016/j.copbio.2012.03.001

- 
56. Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Front Microbiol.*, **8**, 971 (2017). DOI: 10.3389/fmicb.2017.00971
57. Costa O.Y.A., Raaijmakers J.M. and Kuramae E.E. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front Microbiol.* **9**, 1636 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636
58. Ghumare V., Rana M., Gavka O. and Khachi B. Bio-fertilizers-increasing soil fertility and crop productivity. *J. Indust. Pollution Control.*, **30**(2), 196–201 (2014).
59. Aloo B.N., Tripathi V., Makumba B.A. and Mbega E.R. Plant growth-promoting rhizobacterial biofertilizers for crop production: The past, present, and future. *Front. Plant Sci.*, **13**, 1002448 (2022). DOI: 10.3389/fpls.2022.1002448
60. Хамидулина Х.Х., Рабикова Д.Н. Зеленые пестициды (преимущества и проблемы внедрения). *Токсикологический вестник*, **3**, 53–56 (2020). DOI: 10.36946/0869-7922-2020-3-53-56
61. Benhamou N., Lafontaine P.J. and Nicole M. Induction of Systemic Resistance to Fusarium Crown and Root Rot in Tomato Plants by Seed Treatment with Chitosan. *Phytopathology. American Phytopathological Society*, **84**(12), 1432–1444 (2012). DOI: 10.1094/Phyto-84-1432
62. Plata-Rueda A., Martínez L., Santos M., Fernandes F.L., Wilcken C.F., Soares M.A., Serrão J.E. and Zanuncio J.C. Insecticidal activity of garlic essential oil and their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci Rep.*, **7**, 46406 (2017). DOI: 10.1038/srep46406
63. Биозащита захватывает умы и территории. Доступен по ссылке: <https://www.agroxxi.ru/gazeta-zaschita-rastenii/zrast/biozaschita-zahvatyvaet-umy-i-territorii.html> (дата посещения: 07.05.2024).
64. Уровень внедрения агrobiотехнологий в России лишь 2%. Доступен по ссылке: <https://www.agroxxi.ru/zhurnal-agromir-xxi/stati-rastenievodstvo/uroven-vnedrenija-agrobiotekhnologii-v-rossii-lish-2.html> (дата посещения: 07.05.2024).
65. Сколково: через пять лет Россия выйдет на международные рынки с собственными агrobiотехнологиями. Доступен по ссылке: <https://old.sk.ru/news/b/press/archive/2017/02/09/skolkovo-cherez-pyat-let-rossiya-vyydet-na-mezhdunarodnye-rynki-s-sobstvennymi-agrobiotekhnologiyami.aspx> (дата посещения: 07.05.2024).
66. Перечень средств производства для применения в системе органического и биологизированного земледелия на основе ГОСТ 33080-2016 и международных стандартов органического сельского хозяйства. Доступен по ссылке: <https://soz.bio/perechen-biopreparatov-i-bioudobren-2/> (дата посещения: 07.05.2024).
67. Богоутдинов Д.З., Фоминых Т.С., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Мишуров Н.П., Неменуцкая Л.А. и Пискунова Н.А. *Методы диагностики возбудителей заболеваний овощных культур: анализ. обзор* (ФГБНУ «Росинформагротех», М., 2020).
68. Chakraborty S. и Newton A.C. Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*, **60**, 2–14 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02411.x
69. Bebbler D.P., Holmes T., Smith D. and Gurr S.J. Economic and physical determinants of the global distributions of crop pests and pathogens. *New Phytologist*, **202**(3), 901-910 (2014). DOI: doi.org/10.1111/nph.12722
70. *ГОСТ 21507-2013. Защита растений. Термины и определения.* (Стандартинформ, М., 2014)
71. Vanerjee S. and van der Heijden M.G.A. Soil microbiomes and one health. *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 6–20 (2023). DOI: 10.1038/s41579-022-00779-w
72. Здоровые почвы – основа для производства здоровых пищевых продуктов. Доступен по ссылке: <https://openknowledge.fao.org/items/b56b85d3-9082-4512-8906-c31f2ff3f391> (дата посещения: 07.05.2024).
73. Утрата питательных веществ в почвах снижает качество фруктов и овощей. Доступен по ссылке: <https://news.un.org/ru/story/2022/12/1435497> (дата посещения: 07.05.2024).



УДК 504.05, 504.3.054, 504.4.054, 504.53, 579.66, 579.68, 628.3, 631.4

Обзор

## Современное состояние и тенденции в экологической биотехнологии

Филонов А. Е.<sup>1,\*</sup>, Ахметов Л. И.<sup>1</sup>, Ветрова А. А.<sup>1</sup>, Иванова А. А.<sup>1</sup>, Сазонова О. И.<sup>1</sup>,  
Пунтус И. Ф.<sup>1</sup>, Чайка Н. Я.<sup>1,2</sup> и Боронин А. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино, Россия; info@pbcras.ru

<sup>2</sup> Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», 142290, Пушкино, Россия; pushgu@mgupp.ru

\* Ответственный за переписку: filonov.andrey@rambler.ru

### Цитирование:

Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Ветрова А.А., Иванова А.А., Сазонова О.И., Пунтус И.Ф., Чайка Н.Я., Боронин А.М.  
Современное состояние и тенденции в экологической биотехнологии. *Biologia et Biotechnologia* 2024, 1, 2.  
<https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.2>

Получено: 20.08.2024

Принято: 17.10.2024

Опубликовано: 07.11.2024

**Авторские права:** © 2024

год от авторов.

Представлено для публикации в открытом доступе на условиях открытой лицензии.

**Реферат:** Для достижения целей устойчивого развития мирового сообщества необходимо обеспечить защиту, восстановление экосистем и содействие их рациональному использованию, прекращение процесса деградации земель и предотвращение сокращения биологического разнообразия. В обзоре проанализирован большой объем научных публикаций и рассмотрены современные тенденции развития биотехнологических подходов для очистки почвы, воды и воздуха от различных, в том числе устойчивых и опасных, поллютантов. Отдельная глава посвящена утилизации и очистке водных и наземных экосистем от синтетических материалов, включая микропластик. Уделено внимание природоохранным технологиям, применяемым для рекультивации загрязненных военных объектов. Целью данного обзора были анализ и обобщение современных методов, а также характеристика основных направлений современной экологической биотехнологии.

**Ключевые слова:** экологическая биотехнология, загрязнение окружающей среды, очистка почвы, воздуха, воды, микропластик, биоремедиация

## Оглавление

Введение	2
1. Очистка почвы и почвогрунтов от различных поллютантов	4
1.1 Биотехнологии очистки почвы от углеводов нефти и других органических поллютантов	5
1.2 Биотехнологии очистки почвы от неорганических соединений	6
1.3. Перспективы применения ремедиации (включая микробную) для очистки почв от загрязнения веществами военной промышленности	7
1.3.1 Загрязнители окружающей среды в результате военной деятельности	7
1.3.2. Природоохранные технологии, применимые для рекультивации загрязненных военных объектов	8
1.4. Очистка почв и почвогрунтов от загрязнения пестицидами	9
1.4.1 Биоремедиация почв с участием микроорганизмов	9
1.4.2 Фиторемедиация	10
1.4.3 Вермиремедиация	10
2. Очистка водных сред	11
2.1 Очистка сточных вод	11
2.2. Очистка природных водоемов	12
2.2.1 Очистка и восстановление водохранилищ	12
2.2.2 Восстановление загрязненной речной воды	12
2.2.3 Восстановление искусственно созданных водно–болотных систем	13
3. Очистка воздуха	15
3.1 Очистка воздуха в жилых помещениях	15
3.2. Перспективы применения микроорганизмов для сокращения объемов газовых выбросов промышленных предприятий и станций по выработке тепла и электроэнергии	16
4. Микропластик как загрязнитель окружающей среды	17
Заключение	18
Список литературы	18

## Введение

Население нашей планеты росло до 2000 г. со все увеличивающейся скоростью. К настоящему времени численность населения перешагнула рубеж в 8 миллиардов человек. По прогнозу ООН население Земли к 2150 г. выйдет на постоянный предел 11-12 млрд человек. С процессами урбанизации, индустриализации, освоения недр и новых земель возникают проблемы сохранения окружающей среды для будущих поколений. В XX веке человечество всерьез задумалось о масштабах ущерба, причиняемого окружающей среде. Требования к защите окружающей среды существенно изменились, став важной частью не только межгосударственных отношений, но и основополагающим элементом стратегий ведущих мировых корпораций.

В 2015 году Генеральной ассамблеей ООН была принята Концепция устойчивого развития ООН (Sustainable Development Goals) – комплекс мер, нацеленных на удовлетворение текущих потребностей человека при сохранении окружающей среды и ресурсов, то есть без ущерба для будущих поколений, в качестве «плана достижения лучшего и более устойчивого будущего для всех» (A/RES/71/313, 2017). Эти цели были названы в резолюции Генассамблеи «Повесткой дня на период до 2030 года» [1]. Концепция устойчивого развития предусматривает защиту, восстановление экосистем суши и содействие их рациональному использованию, рациональное управление лесами, борьбу с опустыниванием, прекращение и обращение вспять процесса деградации земель и предотвращение утраты биологического разнообразия.

В настоящее время существенные усилия в глобальном масштабе направлены на разработку и распространение природоохранных стратегий, с особым вниманием к биотехнологическим методам. Эти современные подходы делятся на два ключевых направления: переработку отходов – их биотехнологическую трансформацию и утилизацию и биоремедиацию, означающую восстановление и очищение почвы, водных ресурсов и атмосферы.

Экологическая биотехнология – использование биологических процессов и систем для улучшения качества окружающей среды и обеспечения рационального природопользования, которое позволяет эффективно решать проблемы, такие как очистка почвы, воды, воздуха от загрязнений и переработка различных отходов. Технологические инновации, применяемые в области очистки сточных вод, борьбы с атмосферными загрязнениями, рекультивации земель и получения альтернативных источников энергии, являются ключевыми элементами развития экологических биотехнологий. Интеграция биологически обоснованных методик в различные промышленные процессы способствует созданию экологически чистого производства.

Экобиотехнология может сыграть значительную роль в разработке устойчивых энергетических решений. Одним из примеров является использование анаэробного сбраживания — биотехнологического процесса, позволяющего превращать органические отходы в биогаз. Этот биогаз затем можно использовать для выработки электроэнергии или в качестве возобновляемого природного газа. В сотрудничестве с компаниями, занимающимися возобновляемыми источниками энергии, экологическая биотехнология может помочь повысить эффективность и масштабируемость этих процессов.

Экологическая биотехнология также может способствовать устойчивому сельскому хозяйству. Одним из подходов является биоремедиация, которая может помочь очистить загрязненную почву и сделать ее пригодной для сельского хозяйства. Кроме того, биотехнологические процессы могут улучшить круговорот питательных веществ и плодородие почвы, что приведет к более здоровому и продуктивному росту сельскохозяйственных культур.

В настоящее время повышенный интерес к экобиотехнологиям наблюдается в различных регионах мира. Так, в странах Азиатско–Тихоокеанского бассейна особое внимание уделяется такой насущной проблеме, как нехватка водных ресурсов. На североамериканском континенте в приоритете находятся технологические разработки для очистки загрязнённых вод, утилизации отходов и генерации энергии из возобновляемых источников. При этом ключевую роль играют крупные компании и научно-исследовательские центры, находящиеся под покровительством государственных программ по поддержке экологически чистых технологий. Европейский рынок экобиотехнологий демонстрирует значительный рост, обусловленный в основном системной государственной поддержкой научных исследований и разработок и строгим соблюдением экостандартов. Здесь пристальное внимание уделяется развитию биоремедиации, контролю атмосферных загрязнений и оптимизации использования возобновляемых источников энергии. Прогресс экобиотехнологий в Латинской Америке достигается за счет оптимизации управления водными ресурсами, утилизации отходов и применения органических методов ведения сельского хозяйства. Страны Ближнего Востока и Африки проявляют растущий интерес к экобиотехнологиям, уделяя первоочередное внимание рациональному управлению водным потенциалом, переработке отходов и активному внедрению возобновляемых источников энергии.

Ключевыми зарубежными компаниями, работающими в области экологических биотехнологий, являются: Thermo Fisher Scientific Inc., Danaher Corporation, Merck KGaA, Suez SA, Ecolab Inc., Genomatica, Novozymes, LanzaTech, Alken–Murray, Agilent Technologies Inc. К крупнейшим мировым достижениям можно отнести разработку в 2022 году компании Enzytech в области биоремедиации, направленную на расщепление пер- и полифтормалкильных соединений (ПФАС) в почве и воде. В 2023 году компания BioCollection объявила о разработке новой технологии очистки сточных вод с удалением до 95% азота и фосфора с применением бактерий. Очевидна её перспективность, поскольку азот и фосфор являются основными загрязнителями сточных вод и могут способствовать эвтрофикации – состоянию, при котором избыток питательных веществ в водоемах приводит к цветению водорослей и гибели рыбы.

В России отрасль биотехнологической переработки отходов находится на начальном этапе своего развития. Исследования Росстата показывают, что в области сельскохозяйственной и лесной деятельности до 85% отходов обрабатываются и обезвреживаются, в то время как альтернативные оценки свидетельствуют о значительно более низком показателе, достигающем всего около 30%. Следует отметить, что агропромышленный сектор выступает в качестве одного из главных

производителей отходов. При этом действующие стандарты по утилизации, особенно касающиеся животноводческих отходов, зачастую игнорируются.

Конкуренция в сфере сельского хозяйства стимулирует применение инновационных биотехнологий в переработке агропромышленных отходов. Разработанные недорогие методы позволяют трансформировать отходы (такие как шроты и отжимки, полученные в результате экстракции масел из семян подсолнечника, сои, тыквы, льна и других масличных культур) в питательные добавки для корма. В свою очередь, отходы животноводства могут быть успешно использованы для получения удобрений и биогаза.

В России технологии биоремедиации (комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов – микроорганизмов, растений, грибов, насекомых, червей и других организмов) преимущественно используются для очистки загрязненных территорий от нефти и нефтепродуктов. По экспертным оценкам, на нефтепромыслах теряется от 3 до 7% всего объема добываемой нефти. Ежегодно в России происходит порядка 25–40 тысяч аварий, связанных с разливами нефти и нефтепродуктов, а общая площадь загрязненной таким образом территории только в Западной Сибири превышает 800 тысяч гектаров. Для биоремедиации загрязненных нефтью и нефтепродуктами водоемов и почв используются несколько десятков препаратов, разработанных в России и бывших республиках Советского Союза. Однако, объем продаж препаратов биодеструкторов крайне мал – не превышает двух миллионов долларов [2].

Биотехнологические методы будут всё более активно применяться для очищения антропогенно загрязнённых сточных вод, переработки отходов различных отраслей промышленности, включая переработку резиновых изделий, химических субстанций, строительных материалов, а также материалов, содержащих радиоактивные элементы, бытовой мусор, стекло, пластмассы, и множество других. Внедрение эковиотехнологий в промышленной и социально-экономической сферах весьма актуально на сегодняшний день, поскольку экологическое оздоровление биосферы считается важнейшим приоритетом, учитывая обострение проблем, возникающих в результате негативного влияния человеческой деятельности на природу.

Появление новых материалов и производств требует развития и совершенствования классических методов эковиотехнологии с использованием инновационных решений (ферменты, сорбенты, наночастицы, биотопливо, биоудобрения, биоразлагаемые пластики).

В обзоре представлен большой объем научных публикаций, направленных на поиск новых биологических объектов и развитие новых методов эковиотехнологии, который свидетельствует о востребованности биотехнологических подходов для решения проблем утилизации антропогенных отходов и восстановления загрязненной окружающей среды. Целью данного обзора – анализ и обобщение современных методов и подходов, применяемых для очистки почвы, воды и воздуха от различных загрязнителей, а также характеристика основных направлений развития современной экологической биотехнологии.

## 1. Очистка почвы и почвогрунтов от различных поллютантов

Для реабилитации загрязненных территорий применяют механические, термические, физические, химические и биологические методы. Однако, при уровне загрязнения менее 5%, физические, химические и термические методы очистки дорогостоящие, не решают вопрос полной очистки и могут наносить дополнительный вред окружающей среде. Поэтому применение экологически безвредных биологических методов является очевидной альтернативой. Показано, что биоремедиация имеет огромный потенциал и конкурентные преимущества, прежде всего, вследствие экологической безопасности и низкой стоимости [3].

Температура, соленость, показатели pH, доступность метаболически активных субстратов и питательных компонентов, влажность, а также акцепторы электронов существенно влияют на процесс биоремедиации [4]. Немаловажную роль в биодеградации поллютантов играют минеральные вещества, такие как азот, кислород, сера, фосфор [5].

*Фиторемедиация* основывается на интеграции метаболизма растений и почвенных микроорганизмов [6], экологически безопасна и экономична по сравнению с традиционными подходами к утилизации промышленных отходов и ликвидации загрязнений; позволяет растениям

исполнять роль биологических барьеров, изолирующих и нейтрализующих поллютанты через комплекс метаболических и физических процессов: фитоэкстракцию (поглощение и накопление), фитодеградацию (разложение), фитостабилизацию (препятствие миграции), а также преобразование и испарение вредных компонентов – фитотрансформацию и фитоиспарение, соответственно.

Механизмы фиторемедиации превращают загрязняющие вещества в менее токсичные и менее стойкие в окружающей среде [7]. Биодоступность загрязнителей, химические и физические характеристики почвы являются доминирующими факторами, определяющими активность и эффективность фиторемедиационных механизмов, которые влияют на мобильность и токсичность загрязняющих веществ в окружающей среде [8,9]. В синергии с растительными корнями и побегами ризосферные микробы участвуют в процессах поглощения, экссудации и фильтрации, расширяя поверхность для колонизации микроорганизмами и усиливая разложение загрязнителей [10].

В настоящее время существуют и применяются различные модификации технологии биоремедиации:

*Биовентинг* — это технология биоремедиации *in situ*, в которой активизируются аборигенные микроорганизмы деструкторы посредством продувания почвы воздухом (кислородом) с минимизацией выбросов летучих загрязняющих веществ [11].

*Вермиремедиация* — это технология, в которой дождевые черви используются для стимуляции биоразложения токсичных загрязнителей в почве [12] вследствие повышения её аэрации и интенсификации окислительных процессов.

*Микоремедиация* предполагает использование грибов для биоразложения опасных загрязнителей, таких как нефтяные углеводороды, до менее токсичных или нетоксичных форм [13]. Продуцирование ферментов, таких как пероксидазы для расщепления целлюлозы и лигнина, является одним из основных механизмов, позволяющих различным видам грибов утилизировать устойчивые загрязнители [14].

*Фикоремедиация* — метод, в котором используются различные виды водорослей (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Botryococcus* и *Phormidium*, а также макрофиты) для биотрансформации, разрушения и удаления загрязнителей (нефтяные углеводороды, фенолы, бифенилы, пестициды, а также фенольные смолы) из загрязненной водной среды [15] при относительно низких затратах [16]. Миксотрофные водоросли сочетают способность связывания углекислого газа с высокой эффективностью биоремедиации [17]. Водоросли также синтезируют кислород и удаляют излишки биогенных веществ [18]. Тяжелые металлы могут связываться в полифосфатных включениях в клетках водорослей, что способствует детоксикации водных экосистем [19].

Отличительная особенность *нанобиоремедиации* – использование наночастиц, включая такие их разновидности как биосинтетические наноструктуры, нанокомпозиты, а также разработанные и синтезированные на микроскопическом уровне кластеры и наноэлементы [20]. Эти наноматериалы или частицы, сформированные растениями или микроорганизмами, имеют размер от 1 до 100 нм [21]. Роль ~~также~~ наночастиц сводится к их способности преобразовывать и обезвреживать токсины с помощью ферментативных процессов благодаря уникальным качествам, проявляемым на биохимическом, химическом и физическом уровнях [22].

В *трихоремедиации* применяют кератинолитические и кератинофильные микроорганизмы с кометаболической деградацией субстратов [6].

### 1.1 Биотехнологии очистки почвы от углеводородов нефти и других органических поллютантов

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами в настоящее время является глобальной проблемой [23]. По величине вредного влияния на экосистемы нефтепродукты и нефть находятся на втором месте после радиоактивного загрязнения [24].

Известно, что микроорганизмы быстрее разлагают более простые, линейные и насыщенные алканы, в то время как полиароматические углеводороды (ПАУ) менее подвержены микробному разрушению. Ряд микроорганизмов обладают уникальными ферментативными системами, осуществляющими реакции диоксигенирования, монооксигенирования, дегидратации, O- и N-деалкилирования и сульфоокисления. Некоторые микроорганизмы обладают ферментами, которые катализируют разложение не только специфических, но и сложных смесей углеводородов; другие

микроорганизмы имеют возможность атаковать только определенные линейные углеводородные структуры [4]. Таким образом, взаимодействие микроорганизмов в экосистеме ведет к более качественному уничтожению загрязнителей [25]. Существенное влияние на процесс биodeградации оказывает возраст загрязнений, что связано со снижением биодоступности углеводородов [26].

В ряде исследований также отмечается возможное отрицательное воздействие концентрации и состава углеводов на процессы их биodeградации. В работе [5] продемонстрировано ингибирование роста микробных культур высокими концентрациями сырой нефти.

Большинство биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных территорий представляют собой смешанные микробные консорциумы, которые могут подавлять аборигенную микрофлору. Поэтому очевидна важность изучения метаболических путей микробных сообществ [27], тем более что методическая база на основе современных омиксных подходов активно развивается.

Использование растений совместно с добавлением органических отходов и удобрений для усиления процесса биоразложения обеспечило эффективную фиторемедиацию почвы, загрязненной углеводородами нефти [28,29].

Успешному удалению углеводородов нефти с использованием трихоремедиации (применение кератинсодержащих субстратов – перьев и волос) способствуют дополнительные процессы, такие как абсорбция и адсорбция [30-32].

### *1.2 Биотехнологии очистки почвы от неорганических соединений*

Неорганические загрязнители, стойкие по своей природе, могут встречаться в различных формах, таких как соли, оксиды, сульфиды или металлоорганические комплексы.

Загрязнение радиоактивными изотопами может иметь как естественное происхождение – в результате эрозии горных пород и вулканической активности, так и антропогенное.

Многие элементы играют ключевую роль в поддержании биологических процессов. Железо, медь, цинк, марганец, никель, бор, селен и молибден рассматриваются как существенные микроэлементы для здоровья флоры и фауны, а также почвенных микроорганизмов. Совокупность этих элементов формирует биогеохимические циклы, фундаментальные для экосистем [33].

Содержание металлов на конкретных территориях зависит от горных пород, местоположения, почвообразовательных процессов и антропогенных источников, таких как удобрения, сточные воды, промышленные выбросы, твердые отходы, дорожная пыль и атмосферные выпадения [34-35].

Мышьяк, кадмий, хром, медь, ртуть, свинец, марганец, никель и цинк имеют токсический эффект для живых организмов уже при низких концентрациях [36,37].

Металлы могут связываться с поверхностью микробных клеток или осаждаться на ней в результате взаимодействия с белками или клеточно-ассоциированными полисахаридами [38]. Такая внеклеточная адсорбция может снизить биодоступность металлов для достижения цели микробной ремедиации. Металлы могут подвергаться биотрансформации в микробных клетках, вследствие окислительно-восстановительных реакций, метилирования и деметилирования [39], переходя в менее токсичные формы. Микроорганизмы также могут использовать цитоплазматические белки для связывания металлов, что снижает их токсичность [40]. Когда металлы связываются с функциональными белками и нарушают их работу, некоторые микроорганизмы могут запускать параллельные метаболические пути, где работают альтернативные белки с каталитическими ядрами, которые не связываются с токсичным лигандом металла [41]. Кроме того, ряд микроорганизмов могут эффективно выводить из клеток или хранить металлы в вакуолях, тем самым снижая токсичность металла [42]. Некоторые микроорганизмы увеличивают экспрессию внеклеточных веществ в ответ на воздействие металлов: эти вещества содержат функциональные группы, способные связывать металлы [43].

*Асбест* – общий термин для широкого спектра встречающихся в природе гидратированных минеральных силикатных волокон, принадлежащих к серпентиновой и амфиболовой группам порообразующих минералов. Материалы, содержащие асбест, часто попадают в почву из нелегальных захоронений строительных отходов [44]. Объекты по добыче и переработке асбеста также являются потенциально значительными источниками загрязнения почвы [45].

Вопрос биоразрушения асбеста остается открытым. Известно, что термофильная бактерия *Deferrisoma palaeochoriense* может использоваться для удаления железа из асбестовых минералов посредством анаэробного дыхания [46], при этом их токсические свойства снижаются.

### *1.3. Перспективы применения ремедиации (включая микробную) для очистки почв от загрязнения веществами военной промышленности*

#### *1.3.1 Загрязнители окружающей среды в результате военной деятельности*

Органические загрязнители, попадающие в почву в результате военной деятельности, обычно подразделяются на потенциально токсичные соединения (ПТС), энергоносители (топливо, масла), боевые отравляющие вещества (БОВ) и военно-химические соединения (ВХС: дымовые и горючие материалы, слезоточивые газы, гербициды). Их концентрация в почве на военных территориях может быть неприемлемо высокой, что наряду с высокой токсичностью и стойкостью, может приводить к возникновению экологических рисков [47,48]. Загрязнение ПТС (топливом, маслами, смазками, красками, растворителями) в основном обусловлено деятельностью военных баз.

Пестициды часто применяются в качестве репеллента в различных видах военных материалов, таких как стеновой геотекстиль или камуфляжная сетка [49]. Одним из соединений этой группы ПТС является галогенорганическое соединение трансфлутрин. Это полужидкое органическое соединение находится в основном в газовой фазе воздуха и в очень незначительных пропорциях в твердой фазе. Особой группой ПТС, обнаруженных в местах проведения военных огневых тренировок, являются пер- и полифторалкильные соединения (ПФАС). В своей структуре они могут иметь длинные цепи, включая перфторгексансульфоокислоту, перфтороктансульфоокислоту и перфторнонановую кислоту, или короткие цепи, включая перфторбутансульфоокислоту и перфторгептановую кислоту [50]. ПФАС представляют собой группу синтетических химических веществ, которые стабильны, аккумулируются в живых организмах и токсичны при низких концентрациях. Вследствие относительно высокой растворимости они легко попадают в грунтовые воды и достигают подпочвенного слоя [51].

Военная деятельность (учения и боевые действия, производство, уничтожение и утилизация ПТС) является источником загрязнения почвы органическими веществами, в том числе взрывчатыми и метательными веществами. Органические загрязнители можно классифицировать как нитроароматические (например, тринитротолуол (ТНТ)) и нитроаминовые (например, гексоген (RDX) и октоген (HMX)), которые являются вторичными взрывчатыми веществами (т.е. детонируют от первичных взрывчатых веществ), наиболее используемыми в военной деятельности [52]. ДНТ (2,4-динитротолуол), который может появляться в качестве примеси при производстве тротила, также считается приоритетным загрязнителем по классификации Агентства по охране окружающей среды США, имеет низкую растворимость в воде и обнаруживается в почве военных полигонов.

Другую группу отравляющих веществ (ОВ) составляют пропелленты – химические вещества, используемые для производства энергии или газа под давлением, которые впоследствии используются для создания движения жидкости или приведения в движение снарядов. Они образуются из одного или нескольких взрывчатых веществ, смешанных с различными добавками, где основным компонентом является нитроцеллюлоза. Другими твердыми метательными веществами, используемыми в огнестрельном и артиллерийском оружии, являются нитроглицерин, нитрогуанидин и динитротолуолы. В отличие от тротила, гексогена и октогена нитроглицерин редко встречается в почвах, и исследования по этому соединению в почвах малочисленны. Все перечисленные выше вещества не сорбируются в почве и не улетучиваются, что приводит к их миграции в биосфере [52-54].

БОВ представляют собой очень токсичные соединения, используемые для убийства, нанесения тяжелых травм или выведения из строя людей. Основными БОВ являются нервно-паралитические и кожно-нарывные вещества. В группе нервнопаралитических веществ выделяют две подгруппы: G-агенты (производные фосфорорганических эфиров фосфора) и V-агенты (химический состав которых такой же, как у G-агентов, но в них также содержится сера). V-агенты обладают низкой летучестью, медленнее распространяются и поэтому более устойчивы в окружающей среде [55]. Процесс

гидролиза часто рассматривается как основной путь разложения БОВ. Промежуточные продукты гидролиза могут быть более устойчивыми и более токсичными [56,57].

### 1.3.2. Природоохранные технологии, применимые для рекультивации загрязненных военных объектов

Существующие методы рекультивации почв могут применяться как *in situ*, так и *ex situ*, и могут включать различные биологические, физико-химические и термические процессы. Биотехнологические методы обычно дешевле по сравнению с другими методами очистки. Почва при этом сохраняет многие из своих ключевых функций [58].

Фосфорорганические соединения (в том числе ПФАС) имеют в своей структуре прочные C≡F – связи, поэтому они почти не поддаются биодеградации [51], но могут поглощаться растениями в процессе фиторемедиации [59,60]. Ферменты, разлагающие фосфорорганические соединения, были изучены благодаря их способности разрушать нервно-паралитические вещества, такие как табун [61] и зарин [62]. Биодеградация сернистого иприта микроорганизмами считается все более реальной, хотя требуются дальнейшие разработки для повышения солубилизации застарелых форм этого агента в загрязненных почвах с целью облегчения его микробной трансформации в безвредные продукты [63]. Было показано, что галоалкандегалогеназа DhaA на поверхности спор *Bacillus subtilis* способна разлагать сернистый иприт [64]. Изучалось также возможное участие микроорганизмов в высвобождении растворимых мышьяковистых соединений из арсенаторганических веществ [65]. В 2013 г. Лоренц с соавт. [66] исследовали способность *Pseudomonas fluorescens*, сконструированной для экспрессии цитохрома P450 Xp1A, разлагать гексоген в ризосфере.

Для стимулирования жизнедеятельности микроорганизмов в почву могут вноситься различные почвенные добавки, например, органические отходы. Компостирование также может быть использовано при биоремедиации участков, загрязненных в результате военной деятельности.

Деградацию военных энергетических веществ в загрязненной почве в процессе биоремедиации также исследовали с целью определения подходящих условий для их биодеградации [67,68]. Показано [67], что повышение активности анаэробных микроорганизмов тесно связано с исчезновением гексогена из почвы при внесении побочного глицерина (отход производства биодизеля) на территории бывшего военного полигона. Для удаления тротила из почвы был использован сульфатредуцирующий консорциум [69]. В другом исследовании скорость деградации гексогена определялась после внесения биодобавки – штамма *Gordonia* sp. KTR9, для оценки эффективности биостимуляции в загрязненном гексогеном водоносном горизонте на бывшем военном объекте [70].

Фиторемедиация является благоприятным методом для удаления гидрофильных органических соединений [71]. Для фиторемедиации почвы с ТНТ использовали такие растения, как ежовник обыкновенный (*Echinochloa crus galli*), подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*), канатник Теофраста (*Abutilon avicennae*), ветиверия цизаниевидная (*Vetiveria zizanioides*) [72] и тростник южный (*Phragmites australis*) [69], для гексогена и октогена – гвинейскую траву (*Panicum maximum*) [73,74]. Некоторые трансгенные растения экспрессировали нитроредуктазу и демонстрировали значительное увеличение способности поглощать и детоксицировать тротил [75]. Райлотт с соавт. [76] разработали устойчивые к ТНТ растения арабидопсиса (*Arabidopsis*) для биодеградации гексогена. Для уничтожения гексогена в почве было использовано просо прутьевидное (*Panicum virgatum*) [77]. Клен платановидный (*Acer pseudoplatanus*) – еще одно растение, которое было оценено для фиторемедиации почв, загрязненных взрывчатыми веществами [78].

Результаты лабораторного эксперимента показали эффективное удаление дифениларсиновой кислоты – гидролитического или окислительного органического продукта отравляющих средств и восстановление экологических функций почвы при использовании папоротника птериса ленточного (*Pteris vittata*) и бактерии-симбионта *Phyllobacterium myrsinacearum* [79]. В полевом исследовании на пожарном полигоне в аэропорту Стокгольм-Арланда (Швеция) смешанные посадки серебристой березы и норвежской ели [59,60] показали хороший результат при очистке почвы от ПФАС.

#### 1.4. Очистка почв и почвогрунтов от загрязнения пестицидами

Применение пестицидов связано с ростом мирового спроса на продукты питания и вопросами продовольственной безопасности [80]. За последние 30 лет применение пестицидов на 1 га почвы возросло почти в 2 раза [81].

Пестициды наряду с ПАУ и тяжелыми металлами являются распространенными загрязнителями окружающей среды, обладают высокой биологической стабильностью и представляют серьезную опасность для здоровья человека и животных [82,80,83]. Пестициды не только могут быть причиной нейротоксичности, онкологических заболеваний, но и приводить к смерти [84-86].

Полное удаление пестицидов из почв и почвогрунтов является трудоемкой задачей, поскольку физические и химические методы ремедиации провоцируют появление вторичных загрязнителей и дороги [87]. Поэтому разработка и применение биологических методов очистки загрязненных пестицидами почв весьма актуальны.

##### 1.4.1 Биоремедиация почв с участием микроорганизмов

Микроорганизмы способны полностью разрушать (деградировать) или частично трансформировать пестициды в нетоксичные метаболиты [88,89]. Использование микроорганизмов для очистки почв от пестицидов является доминирующим методом ремедиации. Бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinobacter*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Streptomyces* и *Achromobacter* известны своей способностью разрушать пестициды как в составе консорциумов, так и при индивидуальном использовании [90-93]. Среди грибов эта способность отмечена для *Phanerochaete*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Ganoderma*, *Trametes versicolor*, *Cunninghamella* и др. [94-98]. Микроводоросли и цианобактерии могут использовать пестициды в качестве единственного источника углерода [99-101]. Способность к фотоавтотрофии и азотфиксации дает им преимущество перед другими микроорганизмами. Для микроводорослей *Spirulina*, *Anabaena*, *Arthrospira*, *Nostoc*, *Phormidium* и др. показана возможность окислять различные хлорорганические и фосфорорганические пестициды [102]. В настоящее время используют не только консорциумы на основе какой-либо одной группы микроорганизмов (бактерии, микроводоросли или грибы), но и консорциумы, представленные смешанными группами [103,101].

Из *Agrobacterium radiobacter* выделили фосфорорганическую гидролазу OpdA, которая является одним из наиболее эффективных ферментов, разлагающих фосфорорганические соединения [104]. Позднее были проведены успешные полевые испытания OpdA [105] в качестве коммерческого продукта LandGuard™ австралийской компании Orica Watercare [106].

При культивировании в биореакторе штамма *Pseudomonas* sp. S2 была получена внеклеточная лакказа S2LAC, способная к деградации фосфорорганических пестицидов (дихлорофос, хлорпирифос, монокротофос и профеновос) [107]. Еще одна внеклеточная лакказа из гриба *Trametes versicolor* в сочетании с различными медиаторами показала активность в отношении изопротурона, метаболитов процимедона, глифосата [108-110].

Немаловажным фактором, влияющим на разложение пестицида в природных условиях, является его молекулярная структура. Добавление некоторых групп/боковых цепей к молекуле пестицида может, как усиливать механизм расщепления кольца, так и делать субстрат более устойчивым к биодеградации [111].

Для стимуляции биоремедиации в загрязненный участок можно добавлять азот, фосфор, микроэлементы, вторичные источники углерода и другие соединения, изменять pH почвы. Показано увеличение потребления ДДТ (1,1,1-трихлор-2,2-бис(п-хлорфенил)этан) и его основных метаболитов с 23% в контроле (без косубстрата) до 67% при добавлении следовых количеств фенола, гексана или толуола [112]. Добавление лактата и/или антрахинон-2,6-дисульфата в качестве доноров электронов приводило к ускорению трансформации пентахлорфенола (ПХФ) в почвах, богатых железом. Электрохимические исследования подтвердили высокий восстановительный потенциал и большое количество электронов, генерируемых в условиях биостимуляции, которые и были

ответственны за более высокие скорости трансформации ПХФ; показано увеличение количества дехлорирующих и железовосстанавливающих бактерий [113].

Один из способов повысить биодоступность пестицидов и ускорить процесс биоремедиации – это использование биосурфактантов и микроорганизмов – продуцентов биоПАВ [114,115]. Биосурфактанты уменьшают площадь поверхности и межфазное натяжение несмешивающихся жидкостей и повышают растворимость и сорбцию гидрофобных пестицидов.

Биоаугментацию применили при обработке бактериальной культурой *Gulosibacter molinativorax* рисовых полей, загрязненных тиокарбаматным пестицидом молинатом [116]: структура бактериального сообщества почвы при этом не изменилась. Биоаугментация загрязненных инсектицидом фенпропатрином почв штаммом *Bacillus* sp. DG-02 значительно увеличила скорость деградации фенпропатрина, а также сократила период его полураспада в почвах [117]. Инокуляция почвы, загрязненной гербицидом 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (200 мг/кг) штаммом *Novosphingobium* sp. DY4 за 3-4 и 5-7 дней привела к снижению концентрации этого поллютанта на 50% и 95%, соответственно [118]. Значительных изменений в структуре микробного сообщества замечено не было.

Штамм гриба *Aspergillus terreus* JAS1 полностью разлагал хлорпирифос в концентрации 300 мг/кг почвы и его основной метаболит 3,5,6-трихлор-2-пиридиол за 24 и 48 часов соответственно [119]. В некоторых случаях биоаугментация применяется совместно с биостимуляцией. Так при очистке почвы, загрязненной гербицидом атразином почву инокулировали штаммом *Pseudomonas* sp. ADP, а для биостимуляции добавляли цитрат и сукцинат [120]. Штаммы *Aspergillus oryzae* и *Trichoderma longibrachiatum* усиливали деградацию эндосульфана и имидоклоприда (до 99%) в почвах, обогащенных навозом [121,122].

#### 1.4.2 Фиторемедиация

Этот подход сочетает использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для очистки почв. Пестициды через клеточные мембраны попадают из почвы в растения [123] и могут подвергаться эвапотранспирации, фитодеградации, фитоэкстракции или ризодеградации [124]. Высоким объемом транспирации (движение воды через растение и её испарение через наружные органы растения), большой надземной биомассой и составом корневых выделений объясняют успешную транслокацию и биоаккумуляцию ДДТ и его метаболитов тыквой *Cucurbita pepo* [125]. Еще одним кандидатом для очищения почв от ДДТ являются томаты [126]. Подсолнечник обладает наибольшей способностью к фитоэкстракции хлорорганического пестицида эндосульфана по сравнению с томатами, соей или люцерной [127]. Хорошим выбором могут быть естественно растущие на загрязненной пестицидами территории виды растений.

Скорость накопления хлорорганических пестицидов является специфической характеристикой видов растений и зависит от степени загрязнения почвы [128]. Способность аккумулировать хлорорганические пестициды была продемонстрирована на примере эндосульфана и двух злаковых растений – ветиверии цицаниевидной (*Vetiveria zizanioides*) и наперстянки длинной (*Digitaria longiflora*) [129].

Ризоремедиация продемонстрирована на примере стимулирующего действия ризосферы озимой пшеницы на штамм-деструктор пентахлорфенола *Sphingomonas chlorophenolica* [130]; а также при детоксикации загрязненных циперметрином почв травянистым многолетним растением *Pennisetum pedicellatum* [131].

#### 1.4.3 Вермиремедиация

Проведенные в почвенных микрокосмах исследования показали, что добавление дождевых червей приводило к образованию неэкстрагируемых остатков атразина, более глубокому и неоднородному распределению атразина в почве, способствовали сорбции атразина, что в свою очередь увеличивало стойкость атразина [132]. Дождевые черви (*Lumbricus terrestris* и *Aporrectodea caliginosa*) значительно влияли на структуру бактериальных сообществ, загрязненных атразином почв, и уменьшали численность инокулированной популяции *Pseudomonas* sp. ADP – штамма, разлагающего атразин [133]. Тем не менее, в литературе имеются примеры положительного влияния

дождевых червей на очистку почв от пентахлорфенола за счет увеличения микробной биомассы и её активности [134-136].

## 2. Очистка водных сред

### 2.1 Очистка сточных вод

Любая деятельность с использованием воды, бытовая, сельскохозяйственная или промышленная, приводит к образованию сточных вод, загрязненных различными химическими веществами, которые могут быть токсичными [137,138].

В традиционных технологиях для первичной очистки сточных вод используют механические, физические, физико-химические, химические методы [137]. Перед сбросом в окружающую среду или перед повторным использованием предварительно очищенные сточные воды должны пройти вторичную очистку с использованием наиболее подходящих биологических, физических или химических методов. Вторичная очистка удаляет большую часть остаточных загрязнителей, присутствующих в сточных водах, при этом некоторые растворенные питательные вещества, такие как азот и фосфор, могут оставаться.

Обычно источники загрязнения разделяют на точечные и неточечные. К точечным источникам относятся сбросы муниципальных и промышленных сточных вод, в то время как сельское хозяйство (рассматриваемое как поверхностный возвратный сток от орошения), ливневые и другие стоки и относятся к неточечным источникам. Бытовые сточные воды содержат разлагающуюся пищу, моющие средства, продукты выделения, а также болезнетворные микроорганизмы. Сточные воды предприятий химической и фармацевтической промышленности обычно содержат опасные вещества, которые необходимо инактивировать и утилизировать. Стоки сельского хозяйства, содержащие органические вещества, антибиотики, пестициды, также нуждаются в очистке и переработке.

Для утилизации органических веществ, присутствующих в сточных водах, таких как моющие средства, отходы жизнедеятельности человека, масла и пищевые продукты используются различные биологические процессы. Микроорганизмы способны перерабатывать органические вещества, содержащиеся в сточных водах. Обычно выделяют три категории процессов биологической очистки: аэробная, анаэробная и процесс компостирования. В зависимости от характера роста или структурной организации микробного сообщества биологические процессы подразделяются на две группы: рост во взвешенном состоянии (суспензии), когда микробные клетки растут в планктонной форме в большом объеме жидкой среды и рост в прикрепленном состоянии в виде биопленок [138].

Последние достижения в технологиях очистки городских и промышленных сточных вод включают несколько инновационных подходов, направленных на повышение эффективности и экологической устойчивости [139].

1. Мембранные биореакторы сочетают биологическую очистку с мембранной фильтрацией, что позволяет эффективно разделять твердые частицы и жидкость и удалять патогены. Мембранные биореакторы производят высококачественные сточные воды, пригодные для повторного использования.

2. Процессы усовершенствованного окисления используют мощные окислители (например, озон или перекись водорода) для расщепления органических загрязнителей в промышленных сточных водах, включая трудно поддающиеся очистке вещества. Эта технология эффективна для удаления токсичных соединений и улучшения качества сточных вод.

3. Искусственные водно-болотные угодья имитируют экосистемы водно-болотных угодий для фильтрации загрязняющих веществ с помощью биологических и физических процессов, обеспечивая экономически эффективное решение для городских сточных вод.

4. Биоремедиацию все чаще применяют при очистке сточных вод нефтеперерабатывающих заводов для удаления углеводородов и тяжелых металлов.

5. При электрокоагуляции используют электрические токи для очистки сточных вод, эффективно удаляя взвешенные твердые частицы и загрязняющие вещества, что делает ее пригодной как для муниципального, так и для промышленного применения.

Эти технологии не только повышают эффективность очистки, но и способствуют восстановлению водных ресурсов и достижению целей устойчивого развития.

## 2.2. Очистка природных водоемов

Недавние достижения в области биоремедиации загрязненных водоемов включают использование инновационных методов с использованием микроорганизмов и растений и биоинженерных подходов. Перспективным подходом является применение биочара – богатого углеродом материала, полученного из органических отходов, который может улучшать качество воды, адсорбируя загрязнители и обеспечивая среду обитания для полезных микробов [140]. Метод биodeградации стойких органических загрязнителей с использованием микроводорослей по оценкам [141] является перспективным решением для очистки водоемов. Достижения в области метагеномики и синтетической биологии позволяют лучше понимать микробные сообщества и адаптировать стратегии биоремедиации к конкретным сценариям загрязнения. Также учёные изучают использование нанотехнологий для доставки питательных веществ и добавок, которые повышают микробную активность в загрязненных средах [142]. Эти разработки имеют большой потенциал для более эффективных и устойчивых методов восстановления загрязненных водных экосистем.

### 2.2.1 Очистка и восстановление водохранилищ

По сравнению с другими технологиями методы биорекультивации поверхностных вод не являются инвазивными и не нарушают взаимосвязи трофической сети водных экосистем [143]. В большинстве случаев микробиологическая биорекультивация способна достаточно быстро и эффективно восстановить качество воды в загрязненных и эвтрофированных водохранилищах. Микроорганизмы в составе биопрепаратов также успешно используют в процессе минерализации илов. Для поддержания эффекта после микробиологической обработки в водоем высаживают погруженные и плавающие макрофиты в так называемых экотонах [144]. Микроводоросли являются начальным звеном в пищевых цепочках водоемов, макрофиты продуцируют кислород, создают благоприятные физико-химические условия и экониши для обитания остальных гидробионтов; могут служить пищей для многих животных, обитающих в водоемах. Растения, произрастающие по берегам водоемов, укрепляют береговую линию, препятствуют взмучиванию донных отложений и как следствие, обеспечивают снижение мутности воды и поступление солнечного света [144].

Одно из первых исследований эвтрофного водохранилища, дающих представление об эффективности использования эффективных микроорганизмов (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Streptomyces*) в улучшении качества воды (за счёт снижения количества гетеротрофных бактерий, колиформных бактерий, энтерококков, *Salmonella* spp.), известно для водохранилища Турава на реке Мала Панев в Польше (2019–2021 гг.). Применение биопрепаратов серии ProBio улучшило трофический статус водохранилища на ~8% [145].

Интересный подход регулирования трофической цепи «рыбы – двустворчатые моллюски – фитопланктон - микроорганизмы» за счёт контролируемого лова рыбы был предложен китайскими исследователями [146] и успешно применён на водохранилищах Сяосяньшан и Шицишан на реке Янцзы.

### 2.2.2 Восстановление загрязненной речной воды

Загрязнение рек может являться источником распространения болезней, передающихся через воду, а также быть причиной неприятного запаха и загрязнения воздуха [147].

Источниками отходов являются промышленное производство, сточные воды, свалки, торговые рынки, рестораны, сельское хозяйство. Агрохимикаты (удобрения, пестициды, гербициды и т.д.), используемые в сельскохозяйственной деятельности, загрязняют речную воду различными химическими веществами, включая нитраты и фосфаты. Ливневые стоки являются еще одним основным маршрутом переноса загрязнений, по которому в речную воду попадают очищенные и неочищенные сточные воды, промышленные отходы, нефтепродукты, гидрохимикаты и дорожная пыль.

Загрязненная речная вода может быть восстановлена либо путем очистки воды *in situ*, либо путем ограничения и контроля загрязнения в месте источника загрязнения. Для очистки речной воды от различных типов загрязнителя не существует универсального эффективного метода. Поэтому для восстановления чистоты речной воды требуются комплексные технологии и гибридные методы.

Описано несколько технологий биологической и экологической очистки, таких как микробная биоремедиация, использование биопленок, контактное окисление, технология с использованием мембранных биореакторов, экологические пруды, очистка с использованием растений, экологические плавучие маты и искусственные водно-болотные угодья.

*In situ* используют главным образом метаболическую активность растений и микроорганизмов для поглощения, накопления или разложения загрязняющих веществ в воде. Благодаря аэрации увеличиваются разнообразие и обилие микробных сообществ, которые разлагают органические соединения в речной воде. Защита берегов рек с использованием габионов, водных и почвенных растений-макрофитов может улучшить биоразнообразие прибрежных сообществ и процесс восстановления экосистем.

Водные растения, включая микроводоросли и высшие растения, демонстрируют высокий потенциал для очистки речной воды. Посадка на берегу устойчивых к загрязнителям растений может способствовать очистке речной воды путем поглощения, адсорбции, накопления и разложения загрязняющих веществ либо на берегу реки, либо в месте сброса сточных/ливневых вод [147].

Осадебе с соавт. [142] исследовали удаление нефтепродуктов из речной воды с использованием композитов на основе наночастиц оксида железа, нанесенных на биоуголь с иммобилизованными бактериями-деструкторами и моноаммонийфосфатом при загрязнении 10% об./об. Обработка сложным комплексом перечисленных компонентов стимулировала наиболее полное и быстрое удаление углеводов по сравнению с использованием отдельных компонентов.

### 2.2.3 Восстановление искусственно созданных водно-болотных систем

Искусственно созданные водно-болотные угодья (ВБУ) из растений с корнями в осадочных породах сочетают физические и биогеохимические процессы для эффективного удаления загрязняющих воду веществ и восстановления естественной речной экосистемы, имеют низкие эксплуатационные расходы, простоту обслуживания, отсутствие вторичного загрязнения, экономические и экологические выгоды и высокую эффективность. Однако они требуют большой площади, имеют низкую гидравлическую нагрузку и неустойчивы к высокой скорости поступления загрязняющих веществ; также на эффективность ВБУ влияют сезонная гибель и болезни растений [148].

*Плавучие очистные сооружения* – естественные или искусственные – сочетают свойства естественных прудов и гидропонной растительности. Корни растений, погруженные в толщу воды, не только действуют как естественный фильтр для удаления загрязняющих веществ, но и обеспечивают площадь поверхности для усиленного роста микроорганизмов и образования биопленок. Эндوفитные организмы, локализованные в корневых системах, в плавающих матах вносят существенный вклад в борьбу с водными загрязнителями. Декомпозиция, адсорбция, денитрификация, корневое улавливание и осаждение, а также ассимиляция являются ключевыми процессами, участвующими в очищении воды от патогенов, органических веществ, токсических металлов и органических соединений [149-151].

Использование искусственных водно-болотных угодий имеет некоторые ограничения из-за засорения фильтрующего слоя субстрата и требования большой площади покрытия. Напротив, экологические плавучие маты становятся популярными для очистки речной воды благодаря своей экономичности, эффективности удаления загрязнений и мобильности. Они могут обеспечить места обитания птицам и рыбам, препятствуют росту фитопланктона и защищают берег от эрозии.

Возможность очистки речной воды была оценена с применением гидропонной системы с плавающими матами с водяным шпинатом (*Ipomoea aquatica*) и клейким рисом (*Semnostachya menglaensis*): при этом в воде существенно снижалась концентрация общего количества азота и фосфора [152], увеличилась прозрачность, и улучшилось качество воды в реке. Описан плавающий мат на основе вспененного полиэтилена [153] для культивирования различных высших растений,

способных удалять загрязнения из речной воды. Сочетание растения канны индийской (*Canna indica*) с плавающим субстратом эффективно очищало воду от биогенных веществ [154].

Применение сложных инженерных систем (сооружения для отделения биомассы водорослей, плавучие маты с цветковыми растениями на поверхности, погружённые в воду площадки с подводными растениями и придонные покрытия с микроорганизмами) продемонстрировало эффективное удаление биогенных веществ и тяжёлых металлов и повышение прозрачности воды [155].

Комбинация рогоза доминиканского (*Typha domingensis*) и ломоноса бурого (*Clematis fusca*) с проникающими в их корни эндوفитами обеспечивает превосходную очистку речной воды от бытовых и промышленных стоков, при этом значительно сокращая как химическое потребление кислорода (ХПК), так и биологическое потребление кислорода (БПК) – на 87% за четыре дня [156].

Элодея Нутталля (*Elodea nuttallii*) способна разделять нитратный и аммонийный азот на фракции, которые затем или оседают в донных отложениях, или поглощаются самим растением [157,153]; при этом более активно усваивается аммонийная форма азота. Такая селективность предотвращает водорослевое «цветение» воды.

#### *Факторы, влияющие на эксплуатационные характеристики плавучих матов*

Плавучие экосистемы не зависят от изменения уровня воды, волнения и наводнения. Тем не менее, эффективная очистка речной воды с использованием плавучих матов зависит от множества параметров, главным образом, от подбора соответствующих растений. Канна садовая (*Canna indica*) превосходит по своим очищающим способностям такие виды, как аир обыкновенный (*Acorus calamus*) и другие гидробионты [158].

Производительность таких систем зависит от микроорганизмов – симбионтов растений:  $\alpha$ - и  $\beta$ -протеобактерий [159]. Температура, сезонные изменения, продолжительность контакта загрязненной воды с плавучей системой и концентрация примесей также значимы для функционирования этих биоочистительных систем [160].

#### *Восстановление речных экосистем с помощью водных животных*

Фауна – незаменимый инструмент повышения качества водных ресурсов. Так, моллюски, толстолобики и карпы отфильтровывают загрязнители, снижая количество органических веществ и водорослей. Иногда эффективность рыб-фильтраторов, как в случае с толстолобиками, низка из-за токсичности водорослей и антропогенных загрязнителей.

#### *Применение микробных агентов для очистки водных систем*

Использование микроорганизмов для очистки загрязнённых водоёмов может обеспечить увеличение уровня растворенного кислорода до 5,0 мг/л [161], умеренное удаление аммиачного азота ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), снижает ХПК и содержание общего фосфора, а также заметно улучшает цветность речной воды. Микробные технологии просты и потенциально устойчивы при долговременном применении. Применение нитробактерий вместе с гуминовыми кислотами эффективно для удаления общего азота и фосфора, аммонийного азота ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), снижает ХПК и мутность воды в загрязнённых водоёмах [162-164].

Использование фотосинтезирующих бактерий в сочетании с микроводорослями стимулирует активное разложение органических компонентов, снижая на 70% значения ХПК и БПК. Важную роль в данном процессе играет наличие аэрации и использование различных носителей, в том числе водных матов.

#### *Биопленочные реакторы*

В последнее время достигнут значительный успех в применении биопленочных реакторов с использованием биомембран, непосредственно закрепленных на субстратах различного происхождения, в том числе на дне рек. При этом аэрация обеспечивает устранение органических и неорганических загрязнений благодаря адсорбции, деструкции и фильтрации. Стабильность структуры и очищающая мощность биопленок напрямую коррелируют с такими параметрами, как

гидравлическая нагрузка, скорость потока воды, температурный режим и материал для биомембран [165].

Ван с соавт. [166] разработали комбинированную технологию с использованием аэраторов, биопленок и специализированных бактерий для снижения ХПК, БПК, содержания общего азота и фосфора, твёрдых веществ в речной воде. Для этих же целей и увеличения прозрачности загрязненной воды было разработано еще несколько различных технологий с применением биокерамического носителя [167], биологической фильтрующей среды, композитной упаковки из гальки и цеолита для образования биопленок, биокорда (субстрата для микроорганизмов) и рециркуляционного песчаного фильтра [158]. Использование нитевидного бамбука в качестве носителя биопленки продемонстрировало значительный потенциал для очистки загрязненной речной воды [168].

### 3. Очистка воздуха

#### 3.1 Очистка воздуха в жилых помещениях

К основным загрязнителям городского воздуха относятся различные газы (например, углекислый газ, диоксид серы, оксид и диоксид азота), тяжелые металлы, ПАУ, твердые пылевые частицы (PM) (например, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub>) [169,170]. Последние сами по себе представляют сложную смесь абиотических и биотических частиц (микроорганизмы и микрочастицы биологического происхождения) [171]. Твердые частицы могут вызывать респираторные, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания [172,173].

Рост урбанизации привел к тому, что горожане проводят до 90% времени в помещениях [174], поэтому качество внутренней среды стало проблемой здравоохранения во всем мире [175]. Уровень загрязнений воздуха внутри помещений может быть выше, чем на улице, поскольку воздух помещений дополнительно загрязняют летучие органические соединения (из мебели, красок, растворителей, элементов отделки), углекислый газ (дыхание человека и горение газа), и твердые частицы различных размеров [176,177].

Разработки биотехнологических систем для улучшения качества воздуха в помещении начались благодаря космическим исследованиям [178]. Предполагалось, что растения будут удалять загрязняющие вещества (летучие органические соединения – ЛОС) либо поглощая их через устьица, либо путем абсорбции и адсорбции на поверхности растений [179,180]. Был выявлен потенциал эпифитной, эндофитной и ризосферной микробиот в удалении ЛОС [181-183]. Наиболее исследованным способом является так называемая пассивная биофильтрация – использование горшечных комнатных растений для очистки воздуха в помещениях [184]. По сравнению с орошаемыми биофильтрами она дешева и не требует сложных технических решений [185]. Использование определенного вида растения зависит от типа загрязняющего вещества [186]. Одним из видов растений, имеющим широкое применение, является хлорофитум хохлатый (*Chlorophytum comosum*) [187]. Также известна роль мирной лилии (*Spathiphyllum wallisii* «Verdi»), драцены душистой (*Dracaena fragrans* «Golden Coast») и zamiокулькаса (*Zamioculcas zamiifoli*) в удалении диоксида азота [188]. «Зеленые стены» (биостены) с различными видами растений для каждого вида загрязнителя могут одновременно удалять смесь различных загрязняющих веществ с меньшими требованиями к пространству [189].

В качестве гидропонного субстрата для комнатных растений применяют активированный уголь [190]. Сю с соавт. [191] выращивали хлорофитум хохлатый (*Chlorophytum comosum*) в колонке с инертными субстратами и компостом для удаления высоких концентраций формальдегида.

Для удаления загрязняющих веществ из воздуха в помещении, в том числе и CO<sub>2</sub>, используют микроводоросли, которые можно выращивать в биореакторах [192]. Разработана технология очистки воздуха от ультрамелких твердых частиц (PM<sub>2.5</sub>) с использованием хлореллы обыкновенной (*Chlorella pyrenoidosa*), иммобилизованной на хлопчатобумажном полотне [193]. Такая методика позволяет увеличить плотность клеток, что снижает объём биофильтра и упрощает замену биопленки.

### 3.2. Перспективы применения микроорганизмов для сокращения объёмов газовых выбросов промышленных предприятий и станций по выработке тепла и электроэнергии

Загрязнение воздуха является причиной подкисления водных масс, эвтрофикации водоёмов и образования городского смога, которые наносят ущерб природным экосистемам, здоровью людей и приводят к экономическим потерям. Несомненно, нормативы, предъявляемые к воздушным выбросам, будут ужесточаться [194].

ВОЗ представила список из шести поллютантов, которые известны как типичные загрязнители воздуха в промышленно развитых странах: оксиды азота (NO<sub>x</sub>), диоксид серы (SO<sub>2</sub>), монооксид углерода (CO), углекислый газ (CO<sub>2</sub>) и взвешенные твердые частицы [195]. Кроме так называемых «дымовых газов» (CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub>), при промышленном производстве основными загрязнителями воздуха являются продукты сжигания углеводородов, неорганический хлор и сами углеводороды. Большое количество летучих органических соединений, бенз[а]пирена выбрасывается при производстве асфальта [196].

Применяемые в настоящее время процессы и технологии очистки дымовых газов энергозатратны, довольно дороги и экологически небезопасны.

В настоящее время в странах с развитой экономикой наблюдается значительное снижение общего объема выбросов NO<sub>x</sub>, PM<sub>2.5</sub>, SO<sub>x</sub> и CO. С другой стороны, в странах с низким и средним уровнем дохода отмечается экспоненциальный рост выбросов, особенно в тех из них, которые находятся в процессе ускорения индустриализации, таких как Китай, Индия и другие страны Юго-Восточной Азии [194].

Микроорганизмы, применяемые для очистки газовых выбросов, требуют обеспечения необходимыми питательными веществами, растворёнными в воде. Такая питательная среда предварительно используется для орошения газового потока. Также следует предусмотреть регенерацию используемой воды и возврат ее в цикл очистки воздушных выбросов, а также необходимость удаления излишней биомассы, образующей биопленки.

Как известно, микроорганизмы способны жить и активно утилизировать загрязнители в достаточно узком диапазоне относительно низких температур: от 20° до 70-100°C, причем для конкретного микроорганизма величина диапазона сужается до Δ20°C, а иногда и меньше. Таким образом, очевидна необходимость охлаждения дымовых газов, имеющих высокую температуру, и терморегуляция установок для обезвреживания загрязнителей – биофильтров – во избежание гибели микроорганизмов.

При создании систем биофильтрации газовых выбросов необходимо использование орошения для растворения газа или смеси газов в воде с тем, чтобы микроорганизмы получили возможность для их биохимического преобразования. Газовый поток, содержащий загрязнения, контактирует с водной фазой, при этом поллютант поглощается и разрушается микроорганизмами [197]. Возможна многостадийная очистка воздушных выбросов, содержащих многокомпонентную смесь, например, фенола и формальдегида, путем последовательного пропускания газа через растворы абсорбентов, содержащих различные культуры микроорганизмов [198].

Успешное использование обычного биофильтра показано при утилизации неорганических соединений, таких как сероводород [199], аммиак [200], а также и органических соединений: амины [201], метилсульфиды [199, 201], меркаптаны [201], дисульфид углерода [199], кетоны и хлороформ [201], ароматические соединения группы БТЭК (бензол, толуол, этилбензол, ксилолы [199, 201], альдегиды [202]), в том числе смеси летучих органических веществ и др [203].

Разработаны капельные биофильтры, в которых осуществляется микробная деградация дисульфида углерода и сероводорода [204], винилхлорида [205], метилсульфидов [199], четыреххлористого углерода [205], летучих органических веществ (хлорсодержащие соединения) [204], стирола [206], углеводородов группы БТЭК [205,207], некоторых других соединений [208].

С целью повышения абсорбции газовых и загрязняющих частиц в очищающей жидкости рядом авторов предлагается способ, включающий стадии контакта загрязненного газового потока в противотоке со струей, содержащей микроорганизмы [198,209].

В химической промышленности изменение концентрации загрязняющих веществ и состава отработанного воздуха делают биофильтрацию сложной технологией. В качестве возможного решения разработана и реализована согласованная схема, включающая циклический двухпроцессный (адсорбция/десорбция) блок и струйный рециркуляционный воздушный биофильтр [210].

Технология с использованием микроводорослей [211] позволяет получать биомассу микроводорослей до  $742 \text{ мг л}^{-1}$ , улавливать до 80%  $\text{CO}_2$ , и разлагать летучие ароматические соединения.

Назаровой с соавт. [212] определены источники летучих ароматических соединений кондитерского производства, вносящие наибольший вклад в загрязнение атмосферы терпенами и бензальдегидом; подобраны штаммы микроорганизмов, способные трансформировать ароматические соединения в процессе биотехнологической очистки воздуха, рассмотрены конструктивные и технологические особенности биотехнологических установок для очистки газовой смеси.

Разработана и проанализирована интегрированная гибридная модель «биомасса – солнце – природный газ» с использованием водорослей на предмет технико-экономической целесообразности в качестве подхода к снижению выбросов углерода и использованию солнечной энергии для производства электроэнергии и тепла на основе биогаза. Исследование показывает, что производительность и количество биомассы водорослей соответствуют в тепловом эквиваленте потребности в биогазе для системы подогрева сырой нефти, т.е. гибридная модель технически жизнеспособна [213].

#### 4. Микропластик как загрязнитель окружающей среды

В современном мире постоянно растёт производство и применение синтетических материалов на основе пластмасс благодаря их прочности, низкой стоимости и лёгкости. Очень малый объём таких материалов подвергается утилизации или сжиганию – около 20% [214]. В окружающей среде большинство брошенного пластика деградирует до мелких частиц размером менее 5 мм в диаметре – это микропластик (МП). МП составляет доминирующую часть (около 90%) всех отходов пластика [215], при этом основными соединениями являются полистирол, полипропилен и полиэтилен.

МП представляет насущную экологическую угрозу, негативно воздействуя как на водные (реки, озёра, моря, океаны и т.д.), так и на наземные экосистемы [216]. Широкий диапазон представителей фауны, употребляя МП, страдает от ложного чувства насыщения, патологических стрессов, уменьшения темпа развития и репродуктивных нарушений [217,216]. Ввиду ингибирующего эффекта на различные жизненные формы и системы, поиски подходов и методик для уменьшения количества МП стали приоритетом [218].

МП пассивно обогащаются различными химическими примесями и адсорбируют металлы и устойчивые органические загрязнители, тем самым, формируя вредные конгломераты. Отмечено, что подобные конгломераты усиливают проблемы загрязнения окружающей среды, особенно в плане плодородия земли и состояния водных систем [219,220]; биогеохимический баланс в природных экосистемах оказывается на грани срыва.

В последние годы проведено множество исследований, посвящённых изучению распространения, судьбы, поведения, количества и воздействия МП [221]. Хотя МП может длительно сохраняться в окружающей среде, он может быть деградирован некоторыми микроорганизмами [222,223]. Так, штаммы микромицетов *Penicillium* spp. демонстрируют высокую степень деструкции полимерных материалов [224].

Использование микроорганизмов позволит усилить биодеградацию МП без вреда для окружающей среды [225-227]. В природных средах деградация МП представляет собой комплексный процесс, в котором сочетаются физико-химические и микробиологические факторы [228]. В настоящее время выделено мало активных штаммов-деструкторов МП. В отношении особенностей взаимодействия между микроорганизмами и МП и удаления МП ощущается явный недостаток знаний [229]. Следует отметить, что в настоящее время большинство работ проведены в лабораторных условиях, и появление коммерческих биотехнологий утилизации МП возможно только в будущем.

## Заключение

Применение технологий биоремедиации, направленных на детоксикацию загрязнителей в почве, водной и воздушной средах, занимает центральное место в экологической биотехнологии. Микроорганизмы и ферменты, используемые в процессах биоремедиации, способствуют преобразованию токсичных элементов в неопасные соединения. Биоремедиация – экологически ответственный и устойчивый метод устранения загрязнений, вызванных индустриальными авариями, отходами и прочей антропогенной активностью. Благодаря этому биоремедиация приобретает все большее признание в государственных структурах и корпорациях как эффективное средство очищения экосистем, что способствует ее распространению и росту рыночного сегмента.

Ожидается, что по мере достижения целей устойчивого развития и уменьшения «экологического следа» спрос на «зелёные» биотехнологии будет только увеличиваться. Постоянное внимание к развитию высокоэффективных методов очистки воды, почвы и воздуха обещает значительные перспективы для расширения масштаба применения эковиотехнологических стратегий в обозримом будущем.

## Финансирование

Работа выполнена в рамках реализации госзадания Министерства образования и науки РФ № FMRM-2022-0014.

## Список литературы

1. Resolution adopted by the General Assembly on 6 July 2017, Work of the statistical commission pertaining to the 2030 agenda for sustainable development. Доступен по ссылке: <https://documents.un.org/doc/undoc/gen/n17/207/66/pdf/n1720766.pdf> (дата посещения 12.08.2024).
2. Хаустов А. П., Нормирование и снижение загрязнения окружающей среды: учебник для вузов / А. П. Хаустов, М. М. Редина. – 2–е изд., перераб. и доп. – Москва: Издательство Юрайт, 2021. – 387 с.
3. Wang Z. and Zhang J. S. Characterization and performance evaluation of a full-scale activated carbon-based dynamic botanical air filtration system for improving indoor air quality. *Build Environ.*, **46**, 758–768, (2011). DOI: 10.1016/j.buildenv.2010.10.008.
4. Varjani S. J. and Gnansounou E. Microbial dynamics in petroleum oilfields and their relationship with physiological properties of petroleum oil reservoirs. *Bioresour Technol.*, **245**, 1258–1265 (2017). DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.028.
5. Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Xinmei G., Li F., Haiyan L. and Yu H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Front Microbiol.*, **9**, 2885 (2018). DOI: 10.3389/fmicb.2018.02885.
6. Ossai I. C., Hassan A. and Hamid F. S. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review. *Environ Technol Innov.*, **17** (1), 100526 (2020). DOI: 10.1016/j.eti.2019.100526.
7. Gouda A. H., El-Gendy A. S., Abd El-Razek T. M. and El-Kassas H. I. Evaluation of phytoremediation and bioremediation for sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Int J Environ Sci Dev.*, **7** (7), 490–493 (2016). DOI: 10.18178/ijesd.2016.7.7.826.
8. Favas P., Pratas J., Varun M., D'Souza R. and Paul M.S. Phytoremediation of soil contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In *Environmental risk assessment of soil contamination*, Ed. by M. C. Hernandez-Soriano (London, UK, IntechOpen, 2014), pp. 485-517. DOI: 10.5772/57469.
9. Kösesakal T., Ünal M., Kulen O., Memon A. and Yüksel B. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons by using a freshwater fern species *Azolla filiculoides* Lam. *Int J Phytoremediation*, **18**(5), 467–476 (2015).
10. Muthusaravanan S., Sivarajasekar N., Vivek J. S., Paramasivan T., Naushad M., Prakashmaran J., Gayathri V. and Al-Duaij O. K. Phytoremediation of heavy metals: Mechanisms, methods and enhancements. *Environ Chem Letters*, **16**, 1339–1359 (2018). DOI: 10.1007/s10311-018-0762-3.
11. Trulli E., Morosini C., Rada E. C. and Torretta V. Remediation in situ of hydrocarbons by combined treatment in a contaminated alluvial soil due to an accidental spill of LNAPL. *Sustainability*, **8**, 1086 (2016). DOI: 10.3390/su8111086.

12. Shi Z., Liu J., Tang Z., Zhao Y. and Wang C. Vermiremediation of organically contaminated soils: concepts, current status, and future perspectives. *Appl Soil Ecology*, **147**, 103377 (2020). DOI: 10.1016/j.apsoil.2019.103377.
13. Kumar A., Tripti, Prasad M. N. V, Maiti S. K. and Favas P. J. C. Mycoremediation of mine site rehabilitation. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*, Ed. by M. N. V. Prasad, P. J. de Campos Favas, S. K. Maiti (Elsevier, 2018), pp. 233–260. DOI: 10.1016/B978-0-12-812986-9.00014-2.
14. Barh A., Kumari B., Sharma S., Annepu S. K., Kumar A., Kamal S. and Sharma V. P. Chapter 1 – Muchroom mycoremediation: Kinetics and mechanism. In *Smart bioremediation technologies*, Ed. P. Bhatt (Elsevier Academic Press, 2019), pp. 1-22. DOI: 10.1016/B978-0-12-818307-6.00001-9.
15. Gani P., Sunar N. M., Matias-Peralta P., Latiff A. A., Parjo U. K. and Ab Razak A. R. Phycoremediation of wastewaters and potential hydrocarbon from microalgae: a review. *Adv Environ Biol.*, **9** (20), 1–8 (2015).
16. Abd-Razak S. B. and Sharip Z. The potential of phycoremediation in controlling eutrophication in tropical lake and reservoir: a review. *Desalin Water Treat* **180**, 164-175 (2020). DOI: 10.5004/dwt.2020.25078.
17. Subashchandrabose S. R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu and R. R. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environ Int.*, **51**, 59–72 (2013). DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.007.
18. Fathi A. A., Azooz M. M. and Al-Fredan M. A. Phycoremediation and the potential of sustainable algal biofuel production using wastewater. *Am J Appl Sci.*, **10** (2), 189–194 (2013).
19. Dwivedi S. Bioremediation of heavy metals by algae: current and future perspective. *J Adv Lab Res Biol.*, **3** (3), 195–199 (2012).
20. Sinha S., Mehrotra T., Srivastava A., Srivastava A. and Singh R. Nanobioremediation technologies for potential application in environmental cleanup. In *Environmental Biotechnology*, Vol. 2, 2020; Ed. by K. M. Gothandam, S. R. N. Dasgupta, E. Lichtfouse (Switzerland, Cham, Springer Nature Switzerland AG, 2020), pp. 53-73. DOI: 10.1007/978-3-030-38196-7\_3.
21. Kumari B. and Singh D. P. A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Ecol Eng.*, **97** (5), 98–105 (2016). DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.08.006.
22. Koul B. and Taak P. *Biotechnological strategies for effective remediation of polluted soils*, (Singapore, Springer Singapore, 2018). pp. 197–220. DOI: 10.1007/978-981-13-2420-8.
23. Vogt C. and Richnow H. H. Bioremediation via in situ microbial degradation of organic pollutants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, **142**, 123–146 (2014). DOI: 10.1007/10\_2013\_266.
24. Кутыин Н. Г. Экологические проблемы и безопасность топливно-энергетического комплекса России. *Безопасность труда в промышленности*, **12**, 4-7 (2008).
25. Gurav R., Lyu H., Ma J., Tang J., Liu Q. and Zhang H. Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes. *Environ Sci Pollut Res.*, **24**, 11392–11403 (2017). DOI: 10.1007/s11356-017-8446-2.
26. Tang J., Lu X., Sun Q. and Zhu W. Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agric Ecosyst Environ.*, **149**, 109–117 (2012). DOI: 10.1016/j.agee.2011.12.020.
27. Zhou S, Peng S, Li Z., Zhang D., Zhu Y., Li X., Hong M., Li W. and Lu P. Characterization of microbial communities and functions in shale gas wastewaters and sludge: implications for pretreatment. *J Hazard Mater.*, **424** (Prt D), 127649 (2022). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127649.
28. Agamuthu P., Abioye P. O. and AbdulAziz A. R. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricant oil using *Jatropha curcas*. *J Hazard Mater.*, **179**(1–3), 891–894 (2010). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.03.088.
29. Cartmill A. D., Cartmill D. L., Alarcón A. Controlled release fertiliser increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil. *Int J Phytorem.*, **16**(3), 285–301 (2014) DOI: 10.1080/15226514.2013.773280.
30. Ingole N. W., Vinchurkar S. S. and Dharpal S. V. Adsorption of oil from wastewater by using human hairs. *J Environ Sci Comp Sci Eng Technol.*, **3** (1), 207–217 (2013).

31. Pagnucco R. and Philips M. L. Comparative effectiveness of natural by-products and synthetic sorbents in oil spill booms. *J Environ Manag.*, **225**, 10–16 (2018). DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.094.
32. Ukotije-Ikwut P. R., Idogun A. K., Iriakuma C. T., Aseminaso A. and Obomanu T. A novel method for adsorption using human hairs as a natural oil spill sorbent. *Int J Sci Eng Res.*, **7** (8), 1755–1765 (2016).
33. Flora G., Gupta D. and Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdis Toxicol.*, **5** (2), 47–58 (2012). DOI: 10.2478/v10102-012-0009-2.
34. Hołtra A. and Zamorska-Wojdyła, D. The pollution indices of trace elements in soils and plants close to the copper and zinc smelting works in Poland's Lower Silesia. *Environ Sci Pollut Res.*, **27**, 16086–16099 (2020). DOI: 0.1007/s11356-020-08072-0.
35. Masindi V. and Muedi K.L. Environmental contamination by heavy metals. In *Heavy Metals*, Ed by H. El-Din M. Saleh and R. F. Aglan (IntechOpen, 2018), pp. 115–133. DOI: 10.5772/intechopen.76082.
36. Li W., Li Z. and Jennings A. Regulatory performance dataset constructed from U.S. soil jurisdictions based on the top 100 concerned pollutants. *Data in Brief*, **21**, 36–49 (2018). DOI: 10.1016/j.dib.2018.09.049.
37. Rahman Z. and Singh V. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ Monit Asses.*, **191**, 419 (2019). DOI: 10.1007/s10661-019-7528-7.
38. Langley S. and Beveridge T. J. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl Environ Microbiol.*, **65**, 489–498 (1999). DOI: 10.1128/AEM.65.2.489-498.1999.
39. Zaccone C., Lobianco D., Raber G., D'Orazio V., Shotyck W., Miano T. M. and Francesconi K. Methylated arsenic species throughout a 4-m deep core from a free-floating peat island. *Sci Total Environ.*, **621**, 67–74 (2018). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.152.
40. Laporte D., Valdes N., Gonzalez A., Sáez C. A., Zúñiga A., Navarrete A., Meneses C. and Moenne A. Copper-induced overexpression of genes encoding antioxidant system enzymes and metallothioneins involve the activation of CaMs, CDPKs and MEK1/2 in the marine alga *Ulva compressa*. *Aquat Toxicol.*, **177**, 433–440 (2016). DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.06.017.
41. Lemire J., Mailloux R., Auger C., Whalen D. and Appanna V. D. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environ Microbiol.*, **12** (6), 1384–1390 (2010). DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02200.x.
42. Jitendra M., Rachna S. and Arora N. K. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Front Microbiol.*, **8**, 1706–1712 (2017). DOI: 10.3389/fmicb.2017.01706.
43. Lemire J. A., Harrison J. J. and Turner R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.*, **11** (6), 371–384 (2013). DOI: 10.1038/nrmicro3028.
44. Wallis S. L., Emmett E. A., Hardy R., Casper B. B., Blanchon D. J., Testa J. R., Menges C. W., Gonneau C., Jerolmack D. J., Seiphoori A., Steinhorn G. and Berry T.-A. Challenging global waste management – bioremediation to detoxify asbestos. *Front Environ Sci.*, **8**, 20 (2020) DOI: 10.3389/fenvs.2020.00020.
45. Luus K. Asbestos: mining exposure, health effects and policy implications. *McGill J Medicine*, **10** (2), 121–126 (2007). DOI:10.26443/mjm.v10i2.453.
46. Choi J. K., Vigliaturo R., Gieré R. and Pérez-Rodríguez I. 2023. Microbe–mineral interactions between asbestos and thermophilic chemolithoautotrophic anaerobes. *Appl Environ Microbiol.*, **89**, e02048–22 (2023). DOI: 10.1128/aem.02048–22.
47. Broomandi P., Guney M., Kim J. R. and Karaca F. Soil contamination in areas impacted by military activities: a critical review. *Sustainability* **12**, 9002 (2020) DOI: 10.3390/su12219002.
48. Funkhouser A.C. and Glueck K.J. 2015. Environmental considerations in military operations. Army Techniques Publication (accessed 06/04/2022) <https://armypubs.army.mil>
49. Aldridge R. L., Britch S. C., Linthicum K. J., Golden F. V., Dao T. T., Rush M., Holt K., White G., Gutierrez A. and Snelling M. Pesticide misting system enhances residual pesticide treatment of HESCO geotextile. *J Am Mosq Control Assoc.*, **36**, 43–46 (2020). DOI: 10.2987/19-6897.1.
50. Hu X. C., Andrews D. Q., Lindstrom A. B., Bruton T. A., Schaidler L. A., Grandjean P., Lohmann R., Carignan C. C., Blum A., Balan S. A., Higgins C. P. and Sunderland E. M. Detection of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in U.S. drinking water linked to industrial sites, military fire training

areas, and wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol Lett.*, **3**, 344–350 (2016). DOI: 10.1021/acs.estlett.6b00260.

51. John J., Coulon F. and Chellam P. V. Detection and treatment strategies of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): fate of PFAS through DPSIR framework analysis. *J Water Process Eng.*, **45**, 102463 (2022). DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.102463.

52. Pichtel J. 2012. Distribution and fate of military explosives and propellants in soil: a review. *Appl Environ Soil Sci.*, 1687-7667 (2012). DOI: 10.1155/2012/617236.

53. Juhasz A. L. and Naidu R. Explosives: fate, dynamics, and ecological impact in terrestrial and marine environments. *Rev Environ Contam Toxicol.*, **191**, 163–215 (2007). DOI: 10.1007/978-0-387-69163-3\_6.

54. Clausen J. L., Scott C. and Osgerby I. Fate of nitroglycerin and dinitrotoluene in soil at small arms training ranges. *Soil Sediment Contam.*, **20**, 649–671 (2011). DOI: 10.1080/15320383.2011.594108.

55. Chauhan S., D'Cruz R., Faruqi S., Singh K. K., Varma S., Singh M. and Karthik V. Chemical warfare agents. *Environ Toxicol Pharmacol.*, **26**, 113–122 (2008) DOI: 10.1016/j.etap.2008.03.003.

56. Bartelt-Hunt S. L., Barlaz M. A., Knappe D. R. U. and Kjeldsen P. 2006. Fate of chemical warfare agents and toxic industrial chemicals in landfills. *Environ Sci Technol.*, **40**, 4219–4225.—DOI: 10.1021/es052400y.

57. Munro N. B., Talmage S. S., Griffin G. D., Waters L. C., Watson A. P., King J. F., Hauschild V. The sources, fate and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ Health Perspect.*, **107**, 933–974 (1999). DOI: 10.1289/ehp.99107933.

58. Francocci F., Trincardi F., Barbanti A., Zacchini M. and Sprovieri M. Linking bioeconomy to redevelopment in contaminated sites: potentials and enabling factors. *Front Environ Sci.*, **8**, 1–13 (2020). DOI: 10.3389/fenvs.2020.00144.

59. Bolan N., Sarkar B., Yan Y., Li Q., Wijesekara H., Kannan K., Tsang D. C. W., Schauerte M., Bosch J., Noll H., Ok Y. A., Scheckel K., Kumpiene J., Gobindlal K., Kah M., Sperry J., Kirkham M. B., Wang H., Tsang Y. F., Hou D. and Rinklebe J. Remediation of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) contaminated soils – to mobilize or to immobilize or to degrade? *J Hazard Mater.*, **401**, 123892 (2021). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123892.

60. Gobelius L., Lewis J. and Ahrens L. Plant uptake of per- and polyfluoroalkyl substances at a contaminated fire training facility to evaluate the phytoremediation potential of various plant species. *Environ Sci Technol.*, **51**, 12602–12610 (2017). DOI: 10.1021/acs.est.7b02926.

61. Pereira A. F., de Castro A. A., Soares F. V., Leal D. H. S., da Cunha E. F. F., Mancini D. T. and Ramalho T. C. Development of technologies applied to the biodegradation of warfare nerve agents: theoretical evidence for asymmetric homogeneous catalysis. *Chem Biol Interact.*, **308**, 323–331 (2019). DOI: 10.1016/j.cbi.2019.06.007.

62. de Castro A. A., Soares F. V., Pereira A. F., Silva T. C., Silva D. R., Mancini D. T., Caetano M. S., da Cunha E. F. F. and Ramalho T. C. Asymmetric biodegradation of the nerve agents Sarin and VX by human dUTPase: chemometrics, molecular docking and hybrid QM/MM calculations. *J Biomol Struct Dyn.*, **37**, 2154–2164 (2019). DOI: 10.1080/07391102.2018.1478751.

63. Ashmore M. H. and Nathanail C. P. 2008. A critical evaluation of the implications for risk based land management of the environmental chemistry of sulphur mustard. *Environ Int.*, **34**, 1192–1203 (2008) DOI: 10.1016/j.envint.2008.03.012.

64. Wang F. L., Song T. Y., Jiang H., Pei C. X., Huang Q. B. and Xi H. L. *Bacillus subtilis* spore surface display of haloalkane dehalogenase DhaA. *Curr Microbiol.*, **76**, 1161–1167 (2019). DOI: 10.1007/s00284-019-01723-7.

65. Kohler M., Hofmann K., Volsgen F., Thurow K. and Koch A. Bacterial release of arsenic ions and organoarsenic compounds from soil contaminated by chemical warfare agents. *Chemosphere*, **42**, 425–429 (2001). DOI: 10.1016/s0045-6535(00)00060-6.

66. Lorenz A., Rylott E. L., Strand S. E. and Bruce N.C. Towards engineering degradation of the explosive pollutant hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett.*, **340**, 49–54 (2013). DOI: 10.1111/1574-6968.12072.

67. Jugnia L. B., Manno D., Drouin K. and Hendry M. *In situ* pilot test for bioremediation of energetic compound-contaminated soil at a former military demolition range site. *Environ Sci Pollut Res.*, **25**, 19436–19445 (2018). DOI: 10.1007/s11356-018-2115-y.
68. Anand S. and Celin S. M. Green technologies for the safe disposal of energetic materials in the environment. In *Chemical Rocket Propulsion: A Comprehensive Survey of Energetic Materials*. Springer aerospace technology, Ed. by L. T. DeLuca, T. Shimada, V. P. Sinditskii, M. Calabro (Germany, Berlin, Springer-Verlag, 2017), pp. 835–860. DOI:10.1007/978-1003-1319-27748-27746-27735.
69. Kalderis D., Juhasz A. L., Boopathy R. and Comfort S. Soils contaminated with explosives: environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.*, **83**, 1407–1484 (2011). DOI: 10.1351/PAC-REP-10-01-05.
70. Michalsen M. M., King A. S., Rule R. A., Fuller M. E., Hatzinger P. B., Condee C. W., Crocker F. H., Indest K. J., Jung C. M. and Istok J. D.. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation to stimulate hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine degradation in an aerobic groundwater aquifer. *Environ Sci Technol.*, **50**, 7625–7632 (2016). DOI: 10.1021/acs.est.6b00630.
71. Fernandez-Lopez C., Posada-Baquero R., Garcia J. L., Castilla-Alcantara J. C., Cantos M. and Ortega-Calvo J.J. Root-mediated bacterial accessibility and cometabolism of pyrene in soil. *Sci Tot Environ.*, **760**, 13 (2021). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143408.
72. Das P., Datta R., Makris K. C. and Sarkar D. Vetiver grass is capable of removing TNT from soil in the presence of urea. *Environ Pollut.*, **158**, 1980–1983 (2010). DOI: 10.1016/j.envpol.2009.12.011.
73. Lamichhane K. M., Babcock R. W., Turnbull S. J. and Schenck S. Molasses enhanced phyto and bioremediation treatability study of explosives contaminated Hawaiian soils. *J Hazard Mater.*, **243**, 334–339 (2012). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.10.043.
74. Payne Z. M., Lamichhane K. M., Babcock R. W. and Turnbull S. J. Pilot-scale *in situ* bioremediation of HMX and RDX in soil pore water in Hawaii. *Environ Sci Process Impacts.*, **11**, 2023–2029 (2013). DOI: 10.1039/c3em00320e.
75. Hannink N., Rosser S.J., French C.E., Basran A., Murray J. A. H., Nicklin S. and Bruce N. C. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nat Biotechnol.* **19**, 1168–1172 (2001). DOI: 10.1038/nbt1201-1168.
76. Rylott E. L., Budarina M. V., Barker A., Lorenz A., Strand E. S. and Bruce N. Engineering plants for the phytoremediation of RDX in the presence of the co-contaminating explosive TNT. *New Phytol.*, **192**, 405–413 (2011). DOI:10.1111/j.1469-8137.2011.03807.x.
77. Cary T. J., Rylott E. L., Zhang L., Routsong R. M., Palazzo A. J., Strand S. E. and Bruce N. C. Field trial demonstrating phytoremediation of the military explosive RDX by XplA/XplB-expressing switchgrass. *Nat Biotechnol.*, **39**, 1216–1219 (2021). DOI : 10.1038/s41587-021-00909-4.
78. Thijs S., Sillen W., Truyens S., Beckers B., van Hamme J., van Dillewijn P., Samyn P., Carleer R., Weyens N. and Vangronsveld J.. The sycamore maple bacterial culture collection from a TNT polluted site shows novel plant-growth promoting and explosives degrading bacteria. *Front. Plant Sci.*, **9**, 1134 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01134.
79. Teng Y., Feng S., Ren W., Zhu L., Ma W., Christie P. and Luo Y. Phytoremediation of diphenylarsinic-acid-contaminated soil by *Pteris vittata* associated with *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b. *Int J Phytorem.*, **19**, 463–469. (2017). DOI: 10.1080/15226514.2016.1244166.
80. Rajmohan K. S., Chandrasekaran R. and Varjani S. A.: Review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian J Microbiol.*, **60**, 125–138 (2020). DOI: 10.1007/s12088-019-00841-x.
81. Pesticides contamination and exposure reduction. Доступен по ссылке: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb9953en/> (дата посещения 12.08.2024).
82. Bilal M., Iqbal H. M. N. and Barceló D. Persistence of pesticides-based contaminants in the environment and their effective degradation using laccase-assisted biocatalytic systems. *Sci Total Environ.*, **695**, 133896 (2019). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133896.
83. Francisco S. Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods. *Toxics*, **9**(8), 177 (2021). DOI: 10.3390/toxics9080177.

84. Pereira L. C., de Souza A. O., Franco Bernardes M. F., Pazin M., Tasso M. J., Pereira P. H. and Dorta D. J. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **18**, 13800–13823 (2015). DOI: 10.1007/s11356-015-4896-6.
85. Singh N. S., Sharma R., Parween T. and Patanjali P. K. (2018). Pesticide contamination and human health risk factor. In *Modern age environmental problems and their remediation*, Ed by M. Oves, M. Z. Khan and I. M. I. Ismail (Switzerland, Cham, Springer, 2018), pp. 49-68. DOI: 10.1007/978-3-319-64501-8\_3.
86. Korres N. E. (2018) Herbicide effects on humans: exposure, short and long-term effects and occupational hygiene. In: *Weed control: sustainability, hazards, and risks in cropping systems worldwide*, Ed. by N. E. Korres, N. R. Burgos and S. O. Duke (USA, FL, Boca Raton, CRC Press, Taylor Francis Group, 2018), pp. 14-32. DOI: 10.1201/9781315155913-2.
87. Bhatt P., Gangola S., Bhandari G., Zhang W., Maithani D., Mishra S. and Chen S. New insights into the degradation of synthetic pollutants in contaminated environments. *Chemosphere*, **268**, 128827 (2021). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128827.
88. Bhat S. A., Qadri H., Cui G. and Li F. Remediation of pesticides through microbial and phytoremediation techniques. In *Fresh water pollution dynamics and remediation*, Ed. by H. Qadri, R. Bhat, M. Mehmood and G. Dar (Singapore, Springer Singapore, 2020), pp. 235-245. DOI: 10.1007/978-981-13-8277-2\_13.
89. Tarla D. N., Erickson L. E., Hettiarachchi G. M., Amadi S. I., Galkaduwa M., Davis L. C., Nurzhanova A. and Pidlisnyuk V. Phytoremediation and bioremediation of pesticide-contaminated soil. *Appl Sci.*, **10**, 1217, (2020). DOI: 10.3390/app10041217.
90. Amani F., Student P., Akbar A., Sinegani S., Ebrahimi F. and Nazarian S. Biodegradation of chlorpyrifos and diazinon organophosphates by two bacteria isolated from contaminated agricultural soils. *Biolog J Microor.*, **7**(28), 27-39 (2019). DOI: 10.1007/s11274-011-0879-z.
91. Zaffar H., Ahmed R., Pervez A. and Naqvi T. A. (2018). A newly isolated *Pseudomonas* sp. can degrade endosulfan via hydrolytic pathway. *Pesticide Biochem Physiol.*, **152**, 69-75 (2018). DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.09.002.
92. Liu L., Helbling D. E., Kohler H.-P. E. and Smets B. F. Modelling carbofuran biotransformation by *Novosphingobium* sp. KN65.2 in the presence of coincidental carbon and indigenous microbes. *Environ Sci Water Res Technol.*, **5**(4) (2019). DOI: 10.1039/c8ew00929e.
93. Abraham J. and Gajendiran A. Biodegradation of fipronil and its metabolite fipronil sulfone by *Streptomyces rochei* strain AJAG7 and its use in bioremediation of contaminated soil. *Pestic Biochem Physiol* **155**, 90–100 (2019). DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.01.011
94. Mir-Tutusaus J. A., Masís-Mora M., Corcellas C., Eljarrat E., Barceló D., Sarrà M., Rodríguez-Rodríguez C. E.. Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Sci Total Environ.*, **500–501**, 235–242 (2014). DOI:10.1016/j.scitotenv.2014.08.116.
95. Mori T., Wang J., Tanaka Y., Nagai K., Kawagishi H. and Hirai H. Bioremediation of the neonicotinoid insecticide clothianidin by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. *J Hazar. Mater.*, **321**, 586–590 (2017). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.09.049.
96. Alvarenga N., Birolli W. G., Selegim M. H. R. and Porto A. L. M. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere* **117**, 47–52 (2014). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.069.
97. Silambarasan S. and Abraham J. Efficacy of *Ganoderma* sp. JAS4 in bioremediation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP from agricultural soil. *J Basic Microbiol.*, **54** (1), 44–55 (2013a). DOI: 10.1002/jobm.201200437.
98. Palmer-Brown W., de Melo Souza P. L. and Murphy C. D. Cyhalothrin biodegradation in *Cunninghamella elegans*. *Environ Sci Pollut Res.*, **26**, 1414–1421 (2019). DIO: 10.1007/s11356-018-3689-0.
99. Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z. L., Williams B. D., Lewis G. and Naidu R. Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide,  $\alpha$ -endosulfan, and its metabolite, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. *J Agric Food Chem.*, **52**(10), 3030–3035 (2004). DOI: 10.1021/jf035173x.

100. Zhang H., Hu C., Jia X., Xu Y., Wu C., Chen L. and Wang F. Characteristics of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane biodegradation by a nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena azotica*. *J Appl Phycol.*, **24**, 221–225 (2012). DOI: 10.1007/s10811-011-9670-7.
101. McLellan J., Gupta S.K. and Kumar M. Feasibility of using bacterial–microalgal consortium for the bioremediation of organic pesticides: application constraints and future prospects. In *Application of microalgae in wastewater treatment*, Ed. by S. K. Gupta and F. Bux (Switzerland, Cham, Springer, 2019), pp. 341–362. DOI: 10.1007/978-3-030-13913-1\_16.
102. Prabha R., Singh D. P. and Verma M. K. Microbial interactions and perspectives for bioremediation of pesticides in the soils. In *Plant–microbe interactions in agro–ecological perspectives*, Ed. by D. Singh D, H. Singh H. and R. Prabha (Singapore, Springer Singapore, 2017), pp. 649–671. DOI: 10.1007/978-981-10-6593-4\_27.
103. Ellegaard-Jensen L., Knudsen B. E., Johansen A., Albers C. N., Aamand J. and Rosendahl S. Fungal–bacterial consortia increase diuron degradation in water–unsaturated systems. *Sci Tot Environ.*, **466–467**, 699–705 (2014). DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.07.095.
104. Horne I., Sutherland T. D., Harcourt R. L., Russell R. J. and Oakeshott J. G. Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol.*, **68** (7), 3371–3376 (2002). DOI: 10.1128/AEM.68.7.3371-3376.2002.
105. Sutherland T. D., Horne I., Weir K. M., Coppin C. W., Williams M. R., Selleck M., Russell R. J. and Oakeshott J. G. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clinic Exper Pharmacol Physiol.*, **31**, 817–821 (2004). 10.1111/j.1440-1681.2004.04088.x.
106. Anderson B., Phillips B., Hunt J., Largay B., Shihadeh R. and Tjeerdema R. Pesticide and toxicity reduction using an integrated vegetated treatment system. *Environ Toxicol Chem.*, **30**(5), 1036–1043- (2011). DOI:10.1002/etc.471.
107. Chauhan P. S. and Jha B. Pilot scale production of extracellular thermo–alkali stable laccase from *Pseudomonas* sp. S2 using agro waste and its application in organophosphorous pesticides degradation. *J Chem Technol Biotechnol.*, **93**(4), 1022–1030 (2017). DOI: 10.1002/jctb.5454.
108. Zeng S., Qin X. and Xia L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochem Eng J.*, **119**, 92–100. (2017). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.016>.
109. Sarker A., Lee S.-H., Kwak S.-Y., Nandi R. and Kim J.-E. Comparative catalytic degradation of a metabolite 3,5–dichloroaniline derived from dicarboximide fungicide by laccase and MnO<sub>2</sub> mediators. *Ecotox Environ Safety*, **196**, 110561 (2020). DOI:10.1016/j.ecoenv.2020.110561.
110. Pizzul L., Castillo M.d.P. and Stenström, J. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation*, **20**, 751–759 (2009). DOI: 10.1007/s10532-009-9263-1.
111. Naumann K.. Influence of chlorine substituents on biological activity of chemicals: a review. *Pest Manag Sci.*, **56** (1), 3–21 (2000). DOI: 10.1002/(sici)1526-4998(200001)56:1<3::aid-ps107>3.0.co;2-p.
112. Ortíz I., Velasco A., Le Borgne S. and Revah S. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation*, **24**, 215–225 (2013). DOI: 10.1007/s10532-012-9578-1.
113. Chen M., Shih K., Hu M., Li F., Liu C., Wu W. and Tong H. Biostimulation of indigenous microbial communities for anaerobic transformation of pentachlorophenol in Paddy soils of southern China. *J Agric Food Chem.*, **60**, 2967–2975 (2012a). DOI: 10.1021/jf204134w.
114. Lamilla C., Schalchli H., Briceño G., Leiva B., Donoso-Piñol P., Barrientos L., Rocha V. A. L., Freire D. M. G. and Diez M. C. A pesticide biopurification system: a source of biosurfactant–producing bacteria with environmental biotechnology applications. *Agronomy*, **11**, 624 (2021). DOI: 10.3390/agronomy11040624.
115. Bhatt P., Verma A., Gangola S., Bhandari G. and Chen S. Microbial glycoconjugates in organic pollutant bioremediation: recent advances and applications. *Microb Cell Fact.*, **20**, 72 (2021b) DOI: 10.1186/s12934-021-01556-9.
116. Lopes A.R., Danko A.S., Manaia C.M. and Nunes O.C. Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **97** (6), 2691–2700 (2012). DOI: 10.1007/s00253-012-4096-y.

117. Chen S., Chang S., Deng Y., An S., Dong Y. H., Zhou J., Hu M., Zhong G. and Zhang L.-H. Fenpropathrin biodegradation pathway in *Bacillus* sp. DG-02 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils. *J Agric Food Chem.*, **62** (10), 2147–2157 (2014). DOI: 10.1021/jf404908j.
118. Dai Y., Li N., Zhao Q. and Xie S. Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. *Biodegradation*, **26**, 161–170 (2015). DOI: 10.1007/s10532-015-9724-7.
119. Silambarasan S. and Abraham J.. Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* JAS1. *Water Air Soil Pollut.*, **224**, 1369 (2013b). DOI: 10.1007/s11270-012-1369-0.
120. Silva E., Fialho A., Sa-Correia I., Burns R. G. and Shaw L. J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environ Sci Technol.*, **38**, 632–637 (2004). DOI: 10.1021/es0300822.
121. Gangola S., Khati P. and Sharma A.. Mycoremediation of imidaclopridin the presence of different soil amendments using *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus oryzae* isolated from pesticide contaminated agricultural fields of Uttarakhand. *J Biorem Biodegr.*, **6** (5), 1 (2015a). DOI: 10.4172/2155-6199.1000310.
122. Gangola S., Negi G., Srivastava A. and Sharma A. Enhanced biodegradation of endosulfan by *Aspergillus* and *Trichoderma* spp. isolated from an agricultural field of Tarai region of Uttarakhand. *Pestic Res J.*, **27** (2), 223–230 (2015b).
123. Gerhardt K. E., Huang X. D., Glick B. R. and Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci.*, **176**, 20–30 (2009). DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.09.014.
124. Singh T. and Singh D. K. Phytoremediation of organochlorine pesticides: concept, method, and recent developments. *Int J Phytoremed.*, **19** (9), 834–843 (2017). DOI: 10.1080/15226514.2017.1290579.
125. Lunney A. I., Zeeb B. A. and Reimer K. J. Uptake of weathered DDT in vascular plants: potential for phytoremediation. *Environ Sci Technol.*, **38**, 6147–6154 (2004). DOI: 10.1021/es030705b.
126. Mitton F. M., Miglioranza K. S. B., Gonzalez M., Shimabukuro V. M., Monserrat J. M. Assessment of tolerance and efficiency of crop species in the phytoremediation of DDT polluted soils. *Ecol Eng.*, **71**, 501–508 (2014). DOI: 10.1016/j.ecoleng.2014.07.069.
127. Mitton F. M., Gonzalez M., Monserrat J. M. and Miglioranza K. S. B. Potential use of edible crops in the phytoremediation of endosulfan residues in soil. *Chemosphere*, **148**, 300–306 (2016). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.028.
128. Nurzhanova A., Kalugin S. and Zhambakin K. Obsolete pesticides and application of colonizing plant species for remediation of contaminated soil in Kazakhstan. *Environ Sci Pollut Res.*, **20**, 2054–2063 (2013). DOI: 10.1007/s11356-012-1111-x.
129. Singh V. and Singh N. Uptake and accumulation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfan sulfate in naturally growing plants of contaminated area. *Ecotox Environ Safety*, **104**, 189–193 (2014). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.02.025.
130. Dams R. I., Paton G. I. and Killham K. Rhizoremediation of pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Chemosphere*, **68**, 864–870 (2007). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.02.014.
131. Dubey K. K. and Fulekar M. H. Investigation of potential rhizospheric isolate for cypermethrin degradation. *3 Biotech.*, **3**, 33–43 (2013). DOI: 10.1007/s13205-012-0067-3.
132. Binet F., Kersante A., Munier-Lamy C., Le Bayon R. C., Belguy M. J., Shipitalo M. J.. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol Biochem.* **38**, 1255–1263 (2006) DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.09.018.
133. Kersanté A., Martin-Laurent F., Soulas G. and Binet, F. Interactions of earthworms with atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol.* **57**, 192–205 (2006). DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00108.x.
134. Lin Z., Baia J., Zhen Z., Laoa S., Li W., Wu Z., Li Y., Spirod B. and Zhange D. Enhancing pentachlorophenol degradation by vermicomposting associated bioremediation. *Ecol Eng.*, **87**, 288–294 (2016a). DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.12.004.

135. Lin Z., Zhena Z., Wu Z., Yang J., Zhong L., Hu H., Luo C., Bai J., Li Y. and Zhang D. The impact on the soil microbial community and enzyme activity of two earthworm species during the bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soils. *J Hazard Mater.*, **301**, 35–45 (2016b). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.034.
136. Li X., Lin Z., Luo C., Bai J., Sun Y. and Li Y. Enhanced microbial degradation of pentachlorophenol from soil in the presence of earthworms: evidence of functional bacteria using DNA–stable isotope probing, *Soil Biol Biochem.*, **81**, 168–177 (2015). DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.11.011.
137. Crini G. and Lichtfouse E. Wastewater treatment: an overview. In *Green adsorbents for pollutant removal*, Ed. by G. and E. Lichtfouse (Switzerland, Springer Cham, 2018) pp. 1–21. DOI:10.1007/978-3-319-92111-2\_1.
138. Machineni L. Review on biological wastewater treatment and resources recovery: attached and suspended growth systems. *Water Sci Technol.*, **80** (11), 2013–2026 (2019). DOI: 10.2166/wst.2020.034.
139. Bai X., Zhu X., Jiang H., Wang Z., He C., Sheng L. and Zhuang J. Purification effect of sequential constructed wetland for the polluted water in urban river. *Water*, **12**, 1054 (2020). DOI: 10.3390/w12041054.
140. Vasseghian Y., Nadagouda M. M. and Aminabhavi T. M. Biochar-enhanced bioremediation of eutrophic waters impacted by algal blooms, *J Environ Manag.*, **367**, (2024). DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.122044.
141. Sharma M., Sharma A., Batra N., Pareek R. and Patel S. Persistent organic pollutants in water and their microalgae based bioremediation Biosciences Biotechnology Research Asia, **21** (3) 913–928 (2024). DOI: 10.13005/bbra/3273
142. Osadebe A U., Ogugbue C J. and Okpokwasili G C. Bioremediation of crude oil polluted surface water using specialised alginate-based nanocomposite beads loaded with hydrocarbon-degrading bacteria and inorganic nutrients *Bioremediation J.*, 1–23 (2024). DOI: 10.1080/10889868.2024.2381022
143. Mazurkiewicz J., Mazur A., Mazur R., Chmielowski K., Czekala W. and Janczak D. The process of microbiological remediation of the polluted sloneczko reservoir in Poland: for reduction of water pollution and nutrients management. *Water*, **12**, 3002 (2020). DOI: 10.3390/w12113002.
144. Мелихов В. В., Медведева Л. Н. и Московец М. В. Экотоны водозаборных зон цимлянского водохранилища: состояние и биоремедиация. *Известия НВ АУК*, **1** (69), 13–21 (2023). DOI: 10.32786/2071-9485-2023-01-02.
145. Tomczyk P., Wierzchowski P.S., Dobrzynski J., Kulkova I., Wrobel B., Wiatkowski M., Kuriqi A., Skorulski W., Kabat T., Prycyk M, Gruss L. and Drobnik J. Effective microorganism water treatment method for rapid eutrophic reservoir restoration. *Environ Sci Pollut Res.*, **31**, 2377–2393 (2024). DOI: 10.1007/s11356-023-31354-2
146. Zhou J., Qiu H., Chen Y., Ma X., Yu G., Hong Y. and Hu B. Fish-mussel-algae-bacteria model remedied eutrophication pollution: application in Dongxiang district reservoir *Environ. Pollut.*, **342**, 123011 (2024). DOI: 10.1016/j.envpol.2023.123011
147. Md Anawar H. and Chowdhury R. Remediation of polluted river water by biological, chemical, ecological and engineering processes. *Sustainability*, **12**, 7017 (2020). DOI: 10.3390/su12177017.
148. Rehman K., Imran A., Amin I. and Afzal M. Inoculation with bacteria in floating treatment wetlands positively modulates the phytoremediation of oil field wastewater. *J Haz Mater.*, **349**, 242–251 (2018). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.02.013.
149. Billore S. K., Prashant and Sharma J.K. Treatment performance of artificial floating reed beds in an experimental mesocosm to improve the water quality of river Kshipra. *Water Sci Technol.*, **60**(11), 2851–2859 (2009) DOI: 10.2166/wst.2009.731.
150. Kadlec R. H. and Wallace S. *Treatment wetlands, 2nd edition* (USA, FL, Boca Raton, CRC Press, Taylor’s and Francis, 2009), 1061 p.
151. Ijaz A., Imran A., ul Haq M. A., Khan Q. M. and Afzal M. Phytoremediation: Recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant Soil*, **405**, 179–195 (2016a). DOI: 10.1007/s11104-015-2606-2.
152. Sun S.L., Sheng Y. Q., Zhao G. Q., Li Z. R. and Yang J. Feasibility assessment: application of ecological floating beds for polluted tidal river remediation. *Environ Monit Assess.*, **189**, 609 (2017). DOI: 10.1007/s10661-017-6339-y.

153. Bu F. P. and Xu X. Y. Planted floating bed performance in treatment of eutrophic river water. *Environ Monit Assess.*, **185**(11), 9651–9662 (2013). DOI: 10.1007/s10661-013-3280-6.
154. Wu Q., Hu Y., Li S.Q., Peng S. and Zhao H. B. Microbial mechanisms of using enhanced ecological floating beds for eutrophic water improvement. *Bioresour Technol.*, **211**, 451–456 (2016). DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.113.
155. Zheng Z., Zhang W., Luo X.Z., Wang S.B., Yang X.Y., He J. and Nie E. Design and application of plant ecological space technology in water eutrophication. *Control J Environ Eng.*, **145**, 04018142 (2019). DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001485.
156. Ijaz A., Iqbal Z. and Afzal M. Remediation of sewage and industrial effluent using bacterially assisted floating treatment wetlands vegetated with *Typha domingensis*. *Water Sci. Technol.*, **74**, 2192–2201 (2016b). DOI: 10.2166/wst.2016.405.
157. Wang H., Li Z. K. and Han H. Y. Comparison of different ecological remediation methods for removing nitrate and ammonium in Qinshui River, Gonghu Bay, Taihu Lake. *Environ Sci Pollut Res.*, **24**, 1706–1718 (2017). DOI: 10.1007/s11356-016-7963-8.
158. Ateia M., Yoshimura C. and Nasr M. In-situ biological water treatment technologies for environmental remediation: a review. *J Biorem Biodegr.*, **7**(3), 1000348 (2016). DOI: 10.4172/2155-6199.1000348.
159. Chen Y.H., Zhang Y., Huang M. S., Zhang Y. F., Zhao F., Luo J.H. Ecological restoration by a multistage floating-bed system in a eutrophic urban river, *China Appl Mech Mater.*, **157–158**, 945–949 (2012b). DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.157-158.945.
160. Deng Y. and Ni F. Q. Review of ecological floating bed restoration in polluted water. *J Water Resour Prot.*, **5**, 1203–1209 (2013). DOI: 10.4236/jwarp.2013.512128.
161. Gao H., Xie Y. B., Hashim S., Khan A. A., Wang X. L. and Xu H. Y. Application of microbial technology used in bioremediation of urban polluted river: a case study of Chengnan river, China. *Water*, **10**, 643 (2018). DOI: 10.3390/w10050643.
162. Wu W.Z., Liu, Y., Zhu Q., Wei C.J. and Wang J. L. Remediation of polluted river water by biological contact oxidation process using two types of carriers. *Int J Environ Pollut.*, **38**, 223-234 (2009). DOI: 10.1504/IJEP.2009.027223.
163. Liu J. Z., Wu Y. H., Wu C. X., Muylaert K., Vyverman W., Yu H.Q., Muñoz R. and Rittmann B. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: a review. *Bioresour Technol.*, **241**, 1127–1137 (2017). DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.054.
164. Shan M. J., Wang Y. Q. and Shen X. Study on bioremediation of eutrophic lake. *J Environ Sci.*, **21**, S16–S18 (2009). DOI: 10.1016/S1001-0742(09)60027-9.
165. Paulsen J. E., Oppen E. and Bakke R. Biofilm morphology in porous media, a study with microscopic and image techniques. *Water Sci Technol.*, **36** (1), 1–9 (1997). DOI: 10.1016/S0273-1223(97)00317-X.
166. Wang S. M.; Wang B. Z., Jin W. B., Cao X. D. and Bo T. In-situ remediation technology for polluted water in urban river. *Urban Environ Urban Ecol.*, **21**, 1-4: (2008).
167. Cao Y. and Sun C.J. Application of ecological floating beds to water restoration and its design. *Environ Sci Technol.*, **32**, 121–124 (2009).
168. Cao W. P., Zhang H. H., Wang Y. M. and Pan J. Z. Bioremediation of polluted surface water by using biofilms on filamentous bamboo. *Ecol Eng.*, **42**, 146–149 (2012) DOI: 10.1016/j.ecoleng.2012.02.018.
169. Pöschl U. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. *Angew Chem Int Ed.*, **44**, 7520–7540 (2005). DOI: 10.1002/anie.200501122.
170. Ailshire J. A. and Crimmins E. M. Fine particulate matter air pollution and cognitive function among older US adults. *Am J Epidemiol* **180**, 359-366. (2014). DOI: 10.1093/aje/kwu155.
171. Romano S., Becagli S., Lucarelli F., Rispoli G. and Perrone M. R. Airborne bacteria structure and chemical composition relationships in winter and spring PM10 samples over southeastern Italy. *Sci Total Environ.*, **730** (18), 138899 (2020). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138899.
172. Lelieveld J., Evans J., Fnais M., Giannadaki D. and Pozzer A. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature*, **525**, 367–371 (2015). DOI: 10.1038/nature15371.
173. Happo M. S., Sippula O., Jalava P. I., Rintala H., Leskinen A., Komppula M., Kuuspallo K., Mikkonen S., Lehtinen K., Jokiniemi J. and Hirvonen M.-R. Role of microbial and chemical composition in

- toxicological properties of indoor and outdoor airparticulate matter. *Part Fibre Toxicol.* **11**, 60 (2014). DOI: 10.1186/s12989-014-0060-6.
174. Torpy F. R., Irga P. J. and Burchett M. D. Reducing indoor air pollutants through biotechnology. In *Biotechnologies and biomimetics for civil engineering*, Ed. by F. Pacheco Torgal, J. Labrinchi, M. Diamanti, C. P. and H. Lee (Switzerland, Cham, Springer, 2015), pp. 181-210. DOI: 10.1007/978-3-319-09287-4\_8.
175. Bernstein J. A., Alexis N., Bacchus H., Bernstein I. L., Fritz P., Horner E., Li N., Mason S., Nel A., Oullette J., Reijula K., Reponen T., Seltzer J., Smith A. and Tarlo S. M. The health effects of nonindustrial indoor air pollution. *J Allergy Clin Immunol.*, **121**(3), 585-591 (2008) DOI: 10.1016/j.jaci.2007.10.045.
176. Sakai K., Norbäck D., Mi Y., Shibata E., Kamijima M., Yamada T. and Takeuchi Y. A comparison of indoor air pollutants in Japan and Sweden: formaldehyde, nitrogen dioxide, and chlorinated volatile organic compounds. *Environ Res.*, **94**, 75–85 (2004). DOI: 10.1016/s0013-9351(03)00140-3.
177. Norbäck D. and Nordström K Sick building syndrome in relation to air exchange rate, CO<sub>2</sub>, room temperature and relative air humidity in university computer classrooms: an experimental study. *Int Arch Occup Environ Health*, **82**, 21–30 (2008). DOI: 10.1007/s00420-008-0301-9.
178. Myers J. Basic remarks on the use of plants as biological gas exchangers in a closed system. *J Aviat Med.* **25**, 407–411 (1954).
179. Omasa K., Tobe K. and Kondo T. Absorption of organic and inorganic air pollutants by plants. In *Air pollution and plant biotechnology – prospects for phytomonitoring and phytoremediation*. Ed. by K. Omasa, H. Saji, S.Youssefian and N. Kondo (Japan, Tokyo, Springer -Verlag, 2002), pp. 155-178. DOI: 10.1007/978-4-431-68388-9.
180. Yoo M. H., Kwon Y. J., Son K.-C. and Kays S. J. Efficacy of indoor plants for the removal of single and mixed volatile organic pollutants and the physiological effects of the volatiles on the plants. *J Am Soc Hortic Sci.*, **131**, 452–458 (2006). DOI: 10.21273/JASHS.131.4.452.
181. Khaksar G., Treesubuntorn C. and Thiravetyan P. Effect of endophytic *Bacillus cereus* ERBP inoculation into non-native host: potentials and challenges for airborne formaldehyde removal. *Plant Physiol Biochem.*, **107**, 326–336 (2016). DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.06.020.
182. Sandhu A., Halverson L. J. and Beattie G. A. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. *Environ Microbiol.*, **9**, 383–392 (2007). DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01149.x.
183. Zhang H., Pennisi S. V., Kays S. J. and Habteselassie M. Y. Isolation and identification of toluene-metabolizing bacteria from rhizospheres of two indoor plants. *Water Air Soil Pollut.*, **224**, 1648 (2013). DOI: 10.1007/s11270-013-1648-4.
184. Orwell R. L., Wood R. A., Tarran J., Torpy F. R. and Burchett M. Removal of benzene by the indoor plant/ substrate microcosm and implications for air quality. *Water Air Soil Pollut.*, **157**, 193–207 (2004). DOI: 10.1023/B:WATE.0000038896.55713.5b.
185. Soreanu G., Dixon M. and Darlington A. Botanical biofiltration of indoor gaseous pollutants – a mini-review. *Chem Eng J.*, **229**, 585–594 (2013). DOI: 10.1016/j.cej.2013.06.074.
186. Han Y., Lee J., Haiping G., Kim K.-H., Wanxi P., Bhardwaj N., Oh J.-M. and Brown R. J. Plant-based remediation of air pollution: a review. *J Environ Manag.*, **301**, 1138602021 (2022). DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113860.
187. Prigioniero A., Zuzolo D., Niinemets U. and Guarino C. Nature-based solutions as tools for air phytoremediation: a review of the current knowledge and gaps. *Environ Pollut.*, **277**, 116817 (2021). DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116817.
188. Gubb C., Blanusa T., Griffiths A. and Pfrang C. Potted plants can remove the pollutant nitrogen dioxide indoors. *Air Qual Atmos Health*, **15**, 479–490 (2022). DOI: 10.1007/s11869-022-01171-6.
189. Auer T., Radi M. and Brkovi M. Green facades and living walls – a review establishing the classification of construction types and mapping the benefits. *Sustainability*, **11** (17), 4579 (2019). DOI: 10.3390/su11174579.
190. Wang Q., Zhang S., Li Y. and Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *J Environ Protec.*, **2**, 47–55 (2011). DOI: 10.4236/jep.2011.21005.
191. Xu Z., Quin N., Wang J. and Tong H. Formaldehyde biofiltration as affected by spider plant. *Bioresour Technol* **101**, 6930–6934 (2010). DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.128.

- 
192. Mata T. M., Oliveira G. M., Monteiro H., Silva G. V., Caetano N. S. and Martins A. A. Indoor air quality improvement using nature-based solutions: design proposals to greener cities. *Int J Environ Res Public Health.*, **18** (16), 8472 (2021). DOI: 10.3390/ijerph18168472.
193. Lu Q., Ji C., Yan Y., Xiao Y., Li J., Leng, L. and Zhou W. Application of a novel microalgae-film based air purifier to improve air quality through oxygen production and fine particulates removal. *J Chem Technol Biotechnol.*, **94**, 1057–1063 (2018). DOI: 10.1002/jctb.5852.
194. Oreggioni G. D., Mahiques O., Monforti-Ferrario F., Schaaf E., Muntean M., Guizzardi D., Vignati E. and Crippa M. The impacts of technological changes and regulatory frameworks on global air pollutant emissions from the energy industry and road transport. *Energy Policy*, **168**, 113021 (2022). DOI: 10.1016/j.enpol.2022.113021.
195. Munsif R., Zubair M., Aziz A. and Nadeem Zafar M. Industrial air emission pollution: potential sources and sustainable mitigation. In *Environmental emissions*, Ed. by R. Viskup (IntechOpen, 2021), pp. 1-13. DOI: 10.5772/intechopen.93104.
196. Qu S., Fan S., Wang G., He W., Xu K., Nie L., Zhao Y., Zhu Q., Li T. and Li G. Air pollutant emissions from the asphalt industry in Beijing. *J Environ Sci (China)*, **109**, 57-65 (2021). DOI: 10.1016/j.jes.2021.02.027.
197. Ottengraf Simon P. P., Diks Robertus M. M. and van Lith Christianus P. M. Method for biological cleaning of a contaminated gas flow. US Patent № 5,637,498 from 10.06.1997.
198. Садыров О. А., Винаров А. Ю., Касымов Р. и Смирнов В. Н. Способ микробиологической очистки газов. Авторское свидетельство на изобретение СССР № 1374502 от 10.12.1985.
199. Chou W. P., Tseng S. K. and Ho C. M. Anaerobic ammonium oxidation improvement via a novel capsule bioreactor. *Environ Technol.*, **33** (16–18), 2105–2110 (2012). DOI: 10.1080/09593330.2012.660647.
200. Wolstenholme P. and Finger R. Long-term odor and VOC performance tests on biofilters. In *Proceedings of the 67th Annual Conference & Exposition of the Water Environment Federation (US, VA, Alexandria, Water Environment Federation, 1994)*, pp. 541–552.
201. Kolton-Shapira R. Biofilters in action. Proceedings of odor and volatile organic compound emission control for municipal and industrial wastewater treatment facilities In *Proceedings of the 67th Annual Conference & Exposition of the Water Environment Federation (US, VA, Alexandria, Water Environment Federation, 1994)*, pp. 4–53/4–59.
202. Graham J. R. GAC based gas phase biofiltration. In *Proceedings of 1996 USC-TRG Conference on Biofiltration, Los Angeles, CA: University of Southern California (USA, California, 1996)*, pp. 85–93.
203. Gabriel D., Cox H. H. J., Brown J., Torres E. and Deshusses M. A. Biotrickling filters for POTWs air treatment: full-scale experience with a converted scrubber. In *Proceedings of WEF Odors and Toxic Air Emissions 2002 Specialty Conference (US, VA, Alexandria, Water Environment Federation, 2002)*, pp. 657–669.
204. Torres E. M., Basrai S. S. and Kogan V. Evaluation of two biotechnologies controlling POTWair emissions. In *Proceedings of 1996 USC-TRG Conference on Biofiltration, Los Angeles, CA: University of Southern California (USA, California, 1996)*, pp. 182–197.
205. Webster T. S., Cox H. H. J. and Deshusses M. A. Resolving operational and performance problems encountered in the use of a pilot/full-scale biotrickling filter reactor. *Environ. Progress.*, **18**, 162-172: (1999). DOI: 10.1002/ep.670180312.
206. Webster T. S., Togna A. P., Guarini W. J., Hooker B., Tran H., Sanfedele J. and Olsen J. Treatment of vapor emissions generated from an industrial wastewater treatment plant using a full-scale biotrickling filter reactor. In *Proceedings of Annual Meeting and Exhibition of the Air & Waste Management Association, Paper No335, (USA, PA, Pittsburgh, Air & Waste Management Association, 2000)*.
207. Iranpour R., Cox H. H. J., Deshusses M. A. and Schroeder E. D. Literature review of air pollution control biofilters for odor and volatile organic compound removal. *Environ Prog.*, **24** (3), P. 254–267 (2005). DOI: 10.1002/ep.10077.
208. Waweru M., Herrygers V., Van Langenhove H. and Verstraete W. Process engineering of biological waste gas purification. In *Biotechnology Set, Second Edition (12 volumes)* Ed. by H.-J. Rehm and G. Reed (Germany, Weinheim, Wiley-VCH, 1993–2008). 10942 p.

209. Van Lith Christianus P.M. Method for biological cleaning of a contaminated gas flow. US Patent No 6294373 from 25.09.2001.
210. Alkaabi A. A., Obaid A. A. and Abdulsada M. H. Investigation the impact of using the recess air biofilter (TBAB) with integrated system of a cyclic 2–recess adsorption/desorption unit for treatment of squander gas streams *Periodicals Eng Nat Sci.*, **10** (1), 212–227 (2022). DOI: 10.21533/pen.v10i1.2556.
211. Senatore V., Zarra T., Pahunang R. R., Oliva G., Belgiorno V., Ballesteros Jr. F. C. and Naddeo V. Sustainable odour and greenhouse gas emissions control in wastewater treatment plant by advanced biotechnology–based system. *Chemic Eng Transac.*, **85** (2021). DOI: 10.3303/CET2185005.
212. Nazarova A. V., Kurnikova N. V., Molodkina N. R., Yulmetova R. F. and Sergienko O. I. Perspective of using the biological method for gaseous emissions cleaning in the food productions. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.*, **826**, 012032 (2020). DOI:10.1088/1757–899X/826/1/012032.
213. Choudhary P. and Srivastava R. K. Techno-economic case study: bio-fixation of industrial emissions at an Indian oil and gas plant *J Cleaner Produc.*, **266**, 121820. (2020). DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.121820.
214. Law K. L. Plastics in the marine environment. *Annu Rev Mar Sci.*, **9**, 205–229 (2017). DOI: 10.1146/annurev-marine-010816-060409.
215. Carr S. A., Liu J. and Tesoro A. G.: Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res.*, **91**, 174–182 (2016). DOI: 10.1016/j.watres.2016.01.002.
216. Guo X. and Wang J. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: a review. *Mar Pollut Bull.*, **142**, 1–14 (2019). DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.019.
217. Batel A., Linti F., Scherer M., Erdinger L. and Braunbeck T. Transfer of benzo(a)pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants. *Environ Toxicol Chem.*, **35**(7), 1656-1666 (2016). DOI: 10.1002/etc.3361.
218. Vince J. and Hardesty B. D. Plastic pollution challenges in marine and coastal environments: from local to global governance. *Restor Ecol.*, **25**, 123–128; (2017). DOI: 10.1111/rec.12388.
219. Liu G. Z. Z., Yang Y., Sun Y., Fei Y. and Ma J. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. *Environ Pollut.*, **246**, 26–33 (2019). DOI: 10.1016/j.envpol.2018.11.100.
220. Ma J., Zhao J., Zhu Z., Li L. and Yu F. Effect of microplastic size on the adsorption behavior and mechanism of triclosan on polyvinyl chloride. *Environ. Pollut.* 254, 113104 (2019).
221. Sigler M. The effects of plastic pollution on aquatic wildlife: current situations and future solutions. *Water Air Soil Pollut.*, **225**, 2184 (2014). DOI: 10.1007/s11270-014-2184-6.
222. Krueger M. C., Harms H. and Schlosser D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **99**, 8857–8874 (2015). DOI: 10.1007/s00253-015-6879-4.
223. Rujnic–Sokele M. and Pilipovic A. Challenges and opportunities of biodegradable plastics: a mini review. *Waste Manag Res.*, **35**, 132–140 (2017). DOI: 10.1177/0734242X16683272.
224. Yamada-Onodera K., Mukumoto H. and Katsuyaya Y. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degr Stabil.*, **72**, 323–327 (2001). DOI: 10.1016/S0141-3910(01)00027-1.
225. Kumar Sen S. and Raut S. 2015. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review. *J Environ Chem Eng.*, **3** (1), 462–473. DOI: 10.1016/j.jece.2015.01.003.
226. Qi X., Ren Y. and Wang X. New advances in the biodegradation of poly(lactic) acid. *Int Biodeter Biodeg.*, **117**, 215–223 (2017). DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.01.010.
227. Restrepo-Flórez J.-M., Bassi A. and Thompson M. R.: Microbial degradation and deterioration of polyethylene – a review. *Int Biodeterior Biodeg.*, **88**, 83–90 (2014). DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.12.014.
228. Ammala A., Bateman S., Dean K., Petinakis E., Sangwan P., Wong S., Yuan Q., Yu L., Patrick C. and Leong K. H. 2011. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Progress Polym Sci.*, **36**, 1015–1049. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002.
229. Gu J.-D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int Biodeter Biodeg.*, **52**, 69–91 (2003). DOI: 10.1016/S0964-8305(02)00177-4.



УДК 504.064:576.8

Статья

# Разработка метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных минеральных почв Северо-Западной Сибири на примере подзола иллювиально-железистого

Васильева Г. К.<sup>1,\*</sup>, Михедова Е. Е.<sup>1</sup>, Стрижакова Е. Р.<sup>1</sup>, Ахметов Л. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН; soil@pbcras.ru

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина ФИЦ ПНЦБИ РАН; adm@ibpm.ru

\* Ответственный за переписку: [gkvasilyeva@rambler.ru](mailto:gkvasilyeva@rambler.ru);

## Цитирование:

Васильева Г.К., Михедова Е.Е., Стрижакова Е.Р., Ахметов Л.И. Разработка метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных минеральных почв Северо-Западной Сибири на примере подзола иллювиально-железистого. *Biologia et Biotechnologia* 2024, 1, 3. <https://doi.org/10.61847/pbcras.bbt.2024.1.3>

Получено: 25.09.2024

Принято: 18.10.2024

Опубликовано: 07.11.2024

**Авторские права:** © 2024 год от авторов.

Представлено для публикации в открытом доступе на условиях открытой лицензии.

**Реферат:** Важной задачей современности является разработка экологических методов очистки почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Ранее нами была доказана эффективность метода сорбционной биоремедиации для очистки от нефти ряда почв Восточно-Европейской равнины. Целью данной работы было разработать аналогичный метод для рекультивации подзолистых почв, распространенных на территории Северо-Западной Сибири, где добывается основная часть российской нефти. На основании результатов микрополевого и вегетационного экспериментов с подзолом иллювиально-железистым, загрязненным 6 и 12% нефти, сделан вывод о высокой эффективности метода сорбционной биоремедиации этих почв. В случае умеренно загрязненной почвы наилучшим сорбентом оказался смешанный сорбент АУД на основе гранулированного активированного угля и диатомита, а для сильно загрязненной почвы – композитный сорбент на основе АУД и торфа. Проведение сорбционной биоремедиации этих почв с использованием биопрепарата Микробак на фоне внесения оптимальных доз разработанных сорбентов уже к концу 1-го или 2-го сезонов может обеспечить снижение концентрации нефтепродуктов до уровня, допустимого для рекультивированных почв Ханты-Мансийского автономного округа, предназначенных для лесного использования, а через 2-3 сезона – и для почв сельскохозяйственного назначения. Механизм положительного действия этих сорбентов объясняется снижением токсичности загрязненных почв за счет преимущественно обратимой сорбции углеводородов нефти и их метаболитов, поддержания оптимальной влажности и pH почвы, а также повышения устойчивости микроорганизмов и растений к неблагоприятным факторам, что создает условия для ускоренного разложения поллютантов и минимизации показателей интегральной токсичности почв.

**Ключевые слова:** супесчаные подзолы; загрязнение нефтью; сорбенты; сорбционная биоремедиация; биопрепарат; фитотоксичность; биотоксичность.

## Введение

Важной задачей современности является разработка экологических методов защиты окружающей природной среды от техногенного загрязнения. Одними из основных источников техногенного загрязнения являются места добычи, переработки и транспортировки нефти и нефтепродуктов. По данным Статистического бюллетеня РФ, в период с 2020 по 2022 гг. вследствие утечек при транзите нефти, газа и продуктов переработки нефти ежегодно образовывалось от 124 до 132 тыс. га нарушенных земель [1].

Основная часть углеводородов России добывается на территории Западной Сибири, где по добыче нефти лидирует Ханты-Мансийский автономный округ – Югра (ХМАО), площадь которого достигает 534,8 тыс. км<sup>2</sup>. По его территории проходит около 116 тыс. км трубопроводов нефтегазодобывающей отрасли. Отсюда, самыми распространенными экологическими проблемами являются прорывы на магистральных нефтепроводах (рис. 1) В 2021 г., например, на территории Югры зарегистрировано 942 аварии, из которых более 68% инцидентов – на нефтепроводах [2].



**Рисунок 1.** Фото нефтеразливов на территории ХМАО вблизи Сомотлорского месторождения (авторское фото Михедовой Е.Е.).

Попадая в почву из-за случайной утечки, нефть оказывает сильное негативное воздействие на свойства почвы и почвенную биоту. Наиболее распространенные воздействия нефти включают нагревание, гипоксию, окислительный и осмотический стресс, что приводит к изменению состава почвенных микроорганизмов, угнетает рост растений, а также губительно действует на почвенных беспозвоночных. Сумма этих экологических дисбалансов прямо или косвенно несёт ущерб здоровью человека, поскольку нефтяное загрязнение обладает высокой токсичностью, канцерогенным, мутагенным и тератогенным потенциалом [3]. В Федеральном законе №7 «Об охране окружающей среды» указано, что после ликвидации разлива нефти и нефтепродуктов необходимо провести рекультивационные и иные восстановительные работы в порядке, установленном законодательством РФ [4].

В связи со столь богатыми запасами углеводородов в Северо-Западной Сибири техногенная нагрузка на природные компоненты довольно высока. Нефтяное загрязнение почв приводит к выведению обширных территорий из народнохозяйственного использования. Эти проблемы необходимо решать качественно и быстро, поэтому часто возникает задача выбора наилучшего способа ликвидации последствий загрязнения.

Наиболее перспективным методом очистки почв от нефти является биоремедиация, основанная на способности почвенных микроорганизмов разлагать и утилизировать углеводороды нефти. До сих пор большинство работ, посвященных биоремедиации нефтезагрязненных почв, было направлено на получение новых биопрепаратов на основе выделенных штаммов микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти [5–7]. Однако, применение этого метода обычно рекомендуется только для почв с уровнем содержания углеводородов не выше 5%, а, следовательно, биоремедиация оказывается малоэффективной при решении проблем ликвидации аварийных ситуаций в нефтедобывающих

регионах, где концентрации углеводородов нефти в почве значительно превышают указанный уровень [8].

В ряде аналитических обзоров, рассматривающих расширение возможностей метода биоремедиации, предлагается использование биопрепаратов на основе микроорганизмов-деструкторов, иммобилизованных на сорбентах [9–11]. В последние годы стали появляться работы, в которых показано положительное влияние как самих сорбентов [12–15], так и растительных остатков [16] на скорость биоремедиации почвенных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

В наших и других недавних исследованиях было показано, что наиболее приемлемым подходом является применение метода сорбционной биоремедиации почв, который основан на использовании сорбентов в комбинации с приемами классической биоремедиации [3, 17–21]. Данная технология может применяться *in situ* и не требует изъятия и вывоза загрязненных почв. Очищение почвы до необходимого уровня происходит в течение относительно небольшого срока. При этом остается ненарушенным ландшафт, сохраняется аборигенная почва, ценная для чувствительных экосистем северных территорий, а за счет проведения комплекса мелиоративных мер улучшается исходное состояние почвенного покрова, стимулируется развитие аборигенной флоры и фауны. Доказано, что данный способ является наиболее экономически привлекательным, а дополнительные затраты на закупку сорбционных материалов и оплату труда рабочих с лихвой окупаются за счет экономии средств, необходимых для извлечения загрязненного грунта и его доставки к месту утилизации, иногда за сотни и тысячи километров [22].

Ранее нами была продемонстрирована высокая эффективность метода сорбционной биоремедиации для очистки основных типов нефтезагрязненных почв, распространенных в центре Европейской части России. Кроме того, было доказано, что в присутствии сорбентов резко снижается миграция подвижных и токсичных продуктов окисления углеводородов в грунтовые воды в период обработки почв. Установлено, что положительное действие сорбентов связано в основном с обратимой сорбцией токсичных веществ, а также с улучшением физических и физико-химических свойств нефтезагрязненных почв [17–23].

Однако территория основного нефтедобывающего региона страны на Севере Западной Сибири простирается в пределах тундрово-таежных ландшафтов, где одними из основных являются минеральные почвы, а именно подзолы легкого гранулометрического состава [24]. Песчаные подзолы мало обеспечены гумусом, плохо структурированы, растительность не разнообразна. Поэтому, разработка эффективных методов их очистки от нефти весьма актуальна. К настоящему времени разработан ряд технологий для восстановления нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата [25–27], однако, из-за низкой буферности этих почв использование классического метода биоремедиации малоэффективно.

В наших исследованиях была также доказана возможность использования сорбционно-биологического метода для очистки подбура оподзоленного на хронически загрязненной нефтепродуктами территории, находящейся в Субарктическом регионе на Севере Кольского полуострова [12, 13]. Кроме того, в условиях вегетационных экспериментов на примере глеево-подзолистой почвы, отобранной вблизи г. Уренгоя (ЯНАО), впервые было подтверждено положительное влияние ряда натуральных сорбентов на скорость биоремедиации минеральных почв подзолистого типа, загрязненных умеренными дозами нефти [28].

В настоящее время в РФ отсутствуют общепринятые критерии максимально допустимого уровня нефтепродуктов в почвах. Однако, согласно постановлению правительства ХМАО от 2004 г. [29] в подзоне среднетаежных и северотаежных почв установлены локальные нормативы допустимого остаточного содержания нефти и нефтепродуктов в почвах (ДОСН) после проведения рекультивации и иных восстановительных работ. Для подзолов, относящихся к органо-минеральным почвам легкого гранулометрического состава (легкие суглинки, супеси), установлены следующие максимально допустимые уровни: для верхних аккумулятивных горизонтов дерново-подзолистых почв и подзолов легкого гранулометрического состава, предназначенных для **лесохозяйственного использования** установлены ДОСНлес 15 г/кг, для аналогичных почв, предназначенных для **сельскохозяйственного использования** – ДОСНсх 5 г/кг.

Ряд авторов указывают на необходимость экосистемного подхода при оценке безопасного уровня остаточных количеств углеводородов нефти в почве, когда учитываются не только количественные показатели загрязнения почв углеводородами, но и интегральные показатели их токсичности [30, 31]. В соответствии с санитарными правилами [32] по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления, при оценке эффективности рекультивации химически загрязненных почв наряду с требованием снижения остаточных концентраций поллютантов в почве до допустимых уровней, необходимо учитывать **интегральную токсичность почвы**, оцениваемую с использованием двух стандартных методов: 1) фитотестирование по длине корней недельных проростков пшеницы/ячменя или по биомассе травянистых растений и 2) биотестирование на гидробионтах: ветвистоусых рачках *Daphnia magna* либо инфузории *Paramecium caudatum*.

Целью данного исследования было изучить влияние сорбентов разных классов на скорость биоремедиации подзола иллювиально-железистого, загрязненного умеренными и высокими дозами нефти, а также подобрать оптимальные условия для проведения сорбционной биоремедиации подзолистых почв Северо-Западной Сибири в широком интервале нефтяного загрязнения и установить возможные сроки достижения допустимых уровней нефтепродуктов в почве и время снижения показателей интегральной токсичности почв до минимального уровня.

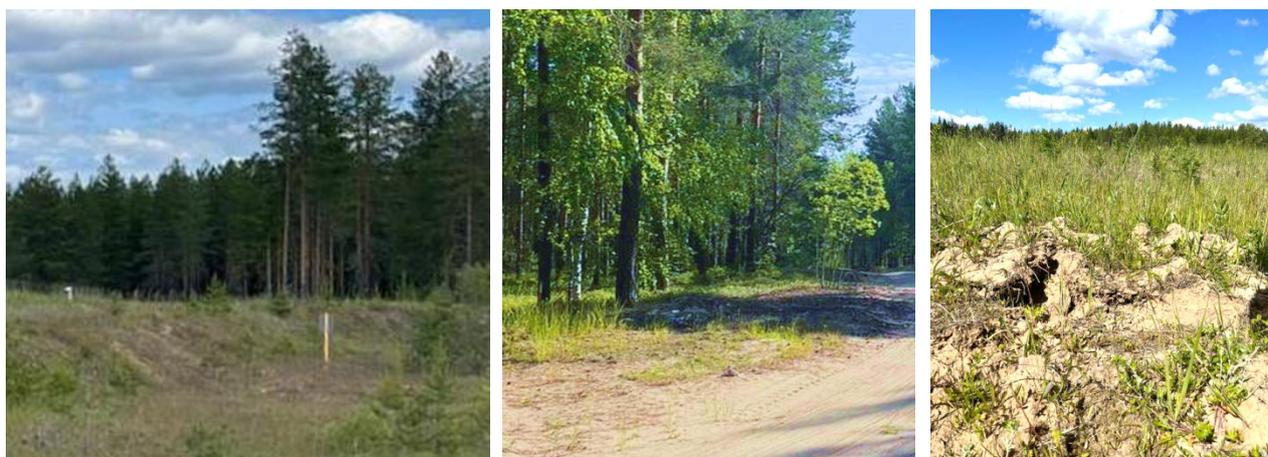
## Материалы и методы

### 1. Материалы

Эксперименты проводили на почве **подзол иллювиально-железистый** (АоА1-А2-Вf-Сf). Образец почвы весом около 500 кг был отобран из верхнего 30-сантиметрового слоя на фоновой территории в районе Самотлорского месторождения нефти вблизи г. Нижневартовск. На рисунке 2 показано место отбора образца подзола иллювиально-железистого. Образец почвы был доставлен в Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН) (г. Пушкино Московской обл.) и использован в наших исследованиях на экспериментальной площадке института. Почву после удаления лесной подстилки просеивали через сито 1 см. Лабораторные анализы показали, что почва супесчаная (содержание физ. песка 87.5%; физ. глины 12.5%, илстой фракции 3.8%), слабогумусированная ( $C_{орг}$  0.86%), слабокислая ( $pH_v$  5.7,  $pH_{КС1}$  4.3) и слабообеспеченная биофильными элементами: суммарное содержание азота – 0.7%, доступного фосфора – 1.2 мг  $P_2O_5/100$  г, обменного калия – 9.5 мг  $K_2O/100$  г.

В экспериментах использовали нефть, полученную от московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ) «Капотня». Нефть средней плотности ( $0.87$  г/см<sup>3</sup>), сернистая (массовая доля серы 0.99%), высоко парафинистая (массовая доля парафина 7.5%). Биоремедиацию нефтезагрязненных почв проводили с помощью **биопрепарата «Микробак»**, разработанного в ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина РАН. Биопрепарат содержит консорциум бактериальных штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Он предназначен для биоремедиации почв с содержанием нефти до 15% при pH почвы от 6 до 8 и температурах от 4 до 32°C. В состав биопрепарата входят штаммы псевдомонад, содержащих плазмиды, способные разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [33].

В ходе экспериментов использовали **сорбенты** натурального происхождения трех классов: минеральные (диатомит и вермикулит вспученный); органические (торф верховой, торф низинный и Спилсорб) и углеродистый – гранулированный активированный уголь (ГАУ). Состав и свойства всех сорбентов приведены в Таблице 1. Помимо индивидуальных сорбентов, использовали смешанный сорбент АУД (смесь ГАУ и диатомита в массовом соотношении 4:1), который показал наилучшие результаты в предыдущих экспериментах [23, 28]. Также использовали смешанные сорбенты на основе торфа верхового и ГАУ, в том числе как с добавками диатомита (АУДТ), так и без него (АУТ).



**Рисунок 2.** Место отбора образца подзола иллювиально-железистого на фоновой территории в районе Самотлорского нефтяного месторождения вблизи г. Нижневартовск (ХМАО) (авторское фото Михедовой Е.Е.).

**Таблица 1.** Характеристика сорбентов, использованных в экспериментах.

Сорбенты		Шифр	Фракция	Описание, производство
Минеральные	Вермикулит	В	Гранулы 1–3 мм	Вермикулит вспученный, ГОСТ 12865-67, ООО Полимер, Иркутск
	Диатомит	Д	Частицы <0,5 мм	Диатомит (кизельгур), производство ООО «Диатомовый комбинат», г. Ульяновск
Углеродистые	Гранулированный активированный уголь	ГАУ	Гранулы 2–3 мм	Гранулированный активированный уголь, Марка ГАУ ВСК, г. Дзержинск
Органические	Спилсорб	СС	Частицы до 10 мм	Пиролизированный торфяной сфагновый мох, влажность 9%, ООО «Терра-Экология», г. Москва
	Торф низинный	Тн	Частицы до 10 мм	Торф низинный нейтрализованный, пр-во ООО «Здоровая планета», нейтральный, рН 5.5–6.5
	Торф верховой	Тв	Частицы до 15 мм	Торф верховой (ГОСТ Р 51213–98), пр-во ООО «ФАСКО», Московская область, рНв 3.1–4.0
Смешанные	Сорбент АУД	АУД	Разные	Смесь ГАУ и Д (4:1)
	Сорбент АУТ	АУТ	Разные	Смесь Тв и ГАУ (1:1)
	Сорбент АУДТ	АУДТ	Разные	Смесь Тв и АУД (1:1)

В качестве комплексных минеральных удобрений использовали азофоску (АЗФ) с содержанием 16% действующего вещества (д.в.) в пересчете на  $N_{\text{сум.}}$ ,  $P_2O$  и  $K_2O$ . Известкование проводили с помощью доломитовой муки (ДМ), в состав которой входит 40%  $CaCO_3$  и 40%  $MgCO_3$  (пр-во ООО «ГЕРА», Московская обл.).

## 2. Условия проведения экспериментов

Закладывали два типа экспериментов: в микрополевых и вегетационных условиях.

### 2.1. Микрополевой эксперимент

Микрополевой эксперимент проводили на экспериментальной площадке ИФХиБПП РАН (г. Пущино Московской обл.). Он был заложен в конце июля 2020 г. и продолжался в течение 3-х сезонов – до конца октября 2022 г., т.е. в течение 27 месяцев. Таким образом, в первый год моделировались погодные условия ХМАО, для которого характерно теплое, но короткое лето.

Эксперимент с подзолом иллювиально-железистым (далее Подзол) проводили в сосудах из поливинилхлорида без дна размером 35×35×35 см<sup>3</sup> (площадь образца 0.1 м<sup>2</sup>), которые вкапывали в землю на глубину 25 см. Исходную почву удаляли на глубину 10 см, дно застилали пластиковой сеткой «серпянкой» и заполняли сосуд экспериментальной почвой – по 10 кг, как описано в [19]. Для моделирования нефтеразлива почву поверхностно загрязняли нефтью в соответствующем количестве и оставляли на 3 суток при температуре воздуха 5–22°C, без осадков. Затем почву тщательно перемешивали на всю глубину (около 10 см), анализировали на исходное содержание нефтепродуктов и сразу же подвергали обработке. Схема микрополевого эксперимента приведена в Таблице 2. Каждый вариант закладывали в 3-х повторностях.

**Таблица 2.** Схема закладки микрополевого эксперимента.

Шифр	Вариант / сорбент	Доза нефти, масс. %	Доза сорбента, масс. %	Суммарная доза					
				БП, кл./г	АЗФ, мг д.в./кг	ДМ, г/кг			
<b>ЧК</b>	Чистый контроль	-	-	-	150	0.5			
<b>Серия Н1</b>									
<b>НК1</b>	Необрабатываемый контроль	6.0	-	-	-	-			
<b>К1</b>	Контроль 1		-	2×10 <sup>7</sup>	1000	3.0			
<b>В5</b>	Вермикулит		5						
<b>В10</b>			10						
<b>ГАУ5</b>	ГАУ		5						
<b>ГАУ10</b>			10						
<b>АУД5</b>	АУД		5						
<b>АУД10</b>			10						
<b>Тн10</b>	Торф низинный		10						
<b>Тн20</b>			20						
<b>Тв10</b>	Торф верховой		10						
<b>Тв20</b>			20						
<b>СС10</b>	Спилсорб		10						
<b>СС20</b>			20						
<b>Серия Н2</b>									
<b>К2</b>	Контроль 2	12.0	-				2×10 <sup>7</sup>	1600	4.8
<b>АУДТ20</b>	АУДТ		20	6.2					

Было заложено 2 серии образцов (**Серия Н1** и **Серия Н2**), которые были загрязнены двумя разными дозами нефти, 6 и 12% на сухой вес почвы, соответственно. В **Серии Н1** были заложены два контрольных образца, в том числе необрабатываемый контроль (**НК1**), а также контроль (**К1**), который обрабатывали методом классической биоремедиации, заключающемся во внесении биопрепарата на основе нефтедеструкторов, а также основных биофильных элементов (НРК), известковании для поддержания оптимального рН почвы и создании оптимальных аэрогидротермических условий (периодическое перемешивание) для активации микроорганизмов. Помимо этого, были заложены образцы с применением метода сорбционной биоремедиации, где почву обрабатывали так же, как в контроле **К1**, но на фоне дополнительного внесения сорбентов. В качестве сорбентов использовали вермикулит, ГАУ, АУД, торф верховой, торф низинный, Спилсорб. Сорбенты вносили в дозах, близких к оптимальным, определенным на основе наших предыдущих экспериментов [19, 28].

В **Серии Н2** из-за ограниченного объема почвы было заложено только 2 варианта: контроль **К2** без сорбентов и вариант с композитным сорбентом АУДТ20. Было сделано предположение, что при сильном загрязнении такой малогумусированной супесчаной почвы, как подзол иллювиально-железистый, эффективность ремедиации можно повысить за счет внесения 20% композитного сорбента АУДТ, состоящего из смеси равных количеств торфа верхового и смешанного сорбента АУД.

Дополнительно был заложен вариант с фоновой чистой почвой, который использовался в качестве чистого контроля (**ЧК**) для оценки фито- и биотоксичности загрязненных почв. В каждой серии опыта все загрязненные образцы почв (контрольные и опытные с сорбентами) обрабатывали одинаково за исключением дополнительного внесения доломитовой муки в некоторые образцы.

На первом этапе в сосуды вносили сорбенты в соответствии со схемой, почву тщательно перемешивали, а через сутки вносили комплексные минеральные удобрения в виде азофоски. В образцах **Серии Н1** и **Серии Н2** суммарная доза АЗФ составила, соответственно, 1000 и 1600 мг/кг в пересчете на каждое действующее вещество: N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и K<sub>2</sub>O. Удобрения вносили в 4 приема: в самом начале обработки, а также через 1.5, 9 и 11 мес. При этом около 75% от этой дозы АЗФ было внесено в течение 1-го сезона, а остальное количество – в течение 2-го сезона. Суммарное количество минеральных удобрений было рассчитано исходя из примерного соотношения исходного содержания углерода нефтепродуктов к суммарному содержанию д.в. биофильных элементов C:N:P:K=40:1:0.4:0.8.

Одновременно с биофильными элементами (во избежание сильного подкисления почвы) вносили доломитовую муку (ДМ). Ее дозу рассчитывали исходя из трехкратного количества ДМ к весу АЗФ в пересчете на сухой вес. Кроме того, через 2 и 12.5 месяцев в некоторые образцы вносили дополнительное количество ДМ. Сигналом для этого служило сильное подкисление почвы (до pH<6.0), которое фиксировалось в основном в вариантах с органическими сорбентами, примерно через неделю после внесения минеральных удобрений. В конечном итоге суммарная доза ДМ, внесенной в образцы с максимальными дозами органических сорбентов, была в 1.5–2.5 раза выше, чем в контроле **К1** или в вариантах с добавками минеральных и углеродистых сорбентов. Дозы АЗФ и ДМ в контроле **ЧК** были снижены до уровней, рекомендуемых в сельском хозяйстве.

Через 1 сутки после 1-го и 2-го внесения АЗФ и ДМ во все образцы с загрязненной почвой (за исключением **НК1**) вносили биопрепарат Микробак (далее БП) в количестве 10<sup>7</sup> кл./г в соответствии с рекомендациями разработчиков [33]. В ходе всего эксперимента почву во всех сосудах (кроме **НК1**) по мере необходимости увлажняли отстоянной водопроводной водой во избежание сильного пересушивания. Во время внесения добавок или при отборе образцов на анализ почву в сосудах перемешивали на всю глубину экспериментального образца. В начале 2-го и 3-го сезонов почву в сосудах засеивали смесью семян клевера красного (*Trifolium pratense*) и райграса высокого (*Arrhenatherum elatius*) в соотношении 1:1 в количестве 1 г/сосуд, а через 2 или 3 месяца растения удаляли.

В ходе инкубирования почву периодически перемешивали и отбирали образцы для определения различных характеристик. Определяли суммарное содержание углеводов нефти (УВН) и промежуточных продуктов окисления углеводов нефти (ОУВН). Кроме того, определяли численность углеводород-окисляющих микроорганизмов в почве и ее дегидрогеназную активность, а также водный pH и полевую влажность почвы. Через 11 мес. (30.04.2021 г.) и 23 мес. (05.06.2023 г.) после начала обработки для оценки интегральной токсичности почв определяли их фитотоксичность стандартным методом по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а также биотоксичность в остром и хроническом биотестах с *Daphnia magna*. Биотест на дафниях был повторен через 27 мес. (02.10.2023 г.) после начала обработки.

## 2.2 Вегетационный эксперимент

Вегетационный эксперимент **Серии Н2в** закладывали одновременно с экспериментом в микрополевых условиях. Его основная цель была оценить правильность выбора состава и дозы композитного сорбента АУДТ. Для этого были заложены образцы **Серии Н2в** с почвой, загрязненной 12% нефти, в котором сравнивали результаты, полученные в вариантах с двумя дозами (10 и 15%) торфа низинного или АУД, а также с двумя дозами (15 и 20%) смешанных сорбентов на основе торфа: с добавкой диатомита (АУДТ) и без него (АУТ). Из-за сложного состава сорбента АУДТ к нему был применен термин «композитный».

Эксперимент закладывали с образцами почвы весом 1 кг, которые помещали в пластиковые вегетационные сосуды на 1.5 л. с отверстиями в дне и с поддонами. Схема закладки эксперимента приведена в Таблице 3. Все обработки почвы проводили практически с теми же дозами БП, что и

в микрополевом эксперименте, но с несколько большими дозами АЗФ и ДМ, которые вносили примерно в те же сроки, что и в микрополевом эксперименте. Дозы АЗФ были немного увеличены, так как в этих образцах были обнаружены несколько более высокие исходные уровни УВН и их метаболитов по сравнению с образцами микрополевого эксперимента. Все образцы закладывали в 3-х повторностях.

Почву в сосудах во время вегетационного периода инкубировали на экспериментальной площадке под дугами с укрывным материалом, а в холодный период – в условиях оранжереи при температуре 20–25°C. Почву в сосудах периодически увлажняли, не давая ей пересыхать, ежемесячно перемешивали и периодически отбирали на анализ.

**Таблица 3.** Схема закладки вегетационного эксперимента – *Серия Н2в*.

Шифр	Вариант	Доза нефти, масс. %	Доза сорбента, масс. %	Суммарная доза		
				БП, кл./г	АЗФ, мг д.в./кг	ДМ, г/кг
<i>ЧК</i>	Чистый контроль	-	-	-	150	0.5
<i>К2в</i>	Контроль <i>К2в</i>	12.0	-	2×10 <sup>7</sup>	1800	5.4
АУД10	АУД		10			
АУД15			15			
Тв10	Торф верховой		10			
Тв15			15			
АУТ15	АУТ		15			
АУТ20			20			
АУДТ15	АУДТ		15			
АУДТ20			20			

Кроме того, через 4 и 14 мес. определяли фитотоксичность почвы стандартными методами: по длине корней проростков пшеницы и по фитомассе 1-месячных растений райграса.

### 3. Методы анализа

**Суммарное содержание углеводов нефти (УВН)** в почве определяли сертифицированным методом ИК-спектрии ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 [34]. Для этого воздушно сухие образцы почвы экстрагировали четыреххлористым углеродом, экстракт очищали путем пропускания через колонку с окисью алюминия и измеряли концентрацию УВН в очищенных экстрактах по поглощению при длине волны 3.42 мкм с помощью ИК-спектрометра на концентратомере КН-2М (Сибприбор, Россия). Кроме того, оценивали суммарное **содержание продуктов окисления углеводов нефти (ОУВН)** разработанным нами методом – по количеству полярных С–Н-содержащих соединений. Эту величину оценивали по разнице между суммарной концентраций С–Н-содержащих соединений и их неполярных производных (соответственно в неочищенных и очищенных экстрактах), как описано в [18].

**Численность углеводород-окисляющих микроорганизмов (УОМ) в почве** определяли методом посева почвенной суспензии соответствующего разведения на минимальную агаризованную среду, где источником углерода и энергии служили пары дизельного топлива [35]. **Дегидрогеназную активность почвы** определяли методом, описанным в [36]. **Водный рН почвы** измеряли с помощью рН метра в суспензии почвы в дистиллированной воде при соотношении 1:2.5.

**Фитотоксичность почвы** определяли тремя методами. Для выбора дозы сорбента и наблюдения за процессом очистки фитотоксичность почвы регулярно определяли по гибели семян клевера ползучего (белого) (*Trifolium repens* L.) с помощью разработанного нами экспресс-метода [37]. Кроме того, в конце 2-го и 3-го сезонов определяли **фитотоксичность** почв стандартными методами: по задержке роста корня 7-дневных проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), проращиваемых в оптимальных условиях (при температуре воздуха 20±2°C, влажности воздуха 60±5% и влажности почвы 70±5% от ППВ) в соответствии с ИСО 11269-1:2012 [38], либо по

изменению фитомассы растений. В последнем случае почву во всех вегетационных сосудах засеивали семенами райграса пастбищного (*Lolium perenne*), через 1 месяц растения вынимали, промывали водой, высушивали при 40°C и определяли их сухой вес. Фитотоксичность почвы рассчитывали по снижению показателей всхожести или роста растений по сравнению с аналогичными показателями в чистом контроле.

Одновременно с определением фитотоксичности по ростовым параметрам растений определяли **биотоксичность почвы** с помощью биотестов на гидробионтах – по смертности *Daphnia magna* в водно-почвенном экстракте в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, Т 16.1:2.3.3.9-06 [39].

#### 4. Статистическая обработка результатов.

Все результаты представлены в виде средних величин из 3-х повторностей со стандартными отклонениями. Содержание УВН и ОУВН в почве, а также различные почвенные характеристики в каждом образце сравнивали с аналогичными параметрами в соответствующих контрольных образцах почвы **К** с помощью критерия Стьюдента и программы STATISTICA10. Различия считались значимыми при  $p < 0.05$  ( $n=3$ ).

## Результаты

### 1. Результаты микрополевого эксперимента

На рисунках 3-5 показаны результаты микрополевого эксперимента с подзолом иллювиально-железистым и двумя уровнями нефтяного загрязнения. На рисунке 3 приведены данные по динамике изменения концентраций УВН и ОУВН в почве **Серии Н1**, загрязненной 6% нефти, а также динамике изменения различных характеристик почвы в ходе ее биоремедиации. Результаты экспериментов **Серии Н1** показали, что исходные концентрации УВН и ОУВН в почве, измеренные через 3 сут. после внесения нефти были, соответственно,  $31.8 \pm 1.3$  и  $10.3 \pm 2.1$  г/кг из-за быстрого испарения легколетучих углеводородов и, возможно, из-за частичного микробного разложения УВН. При проведении биоремедиации умеренно загрязненной почвы **разложение УВН** в контроле **К1** протекало сравнительно быстро, и за первые 4 месяца концентрация УВН в почве снизилась до  $11.2 \pm 0.9$  г/кг. Затем разложение нефти замедлилось, и к концу 2-го и 3-го сезонов (через 14 и 27 мес., соответственно) остаточные концентрации УВН в **К1** достигали  $9.4 \pm 0.5$  и  $6.1 \pm 0.8$  г/кг, а ОУВН –  $9.0 \pm 0.9$  и  $4.4 \pm 0.4$  г/кг, соответственно. В необрабатываемом контроле **НК1** концентрация УВН в почве снизилась лишь до  $25.7 \pm 2.2$  г/кг, а концентрация ОУВН даже возросла до  $15.5 \pm 0.9$  г/кг.

Внесение сорбентов всех 3-х классов существенно ускорило разложение УВН, но это явление наблюдалось преимущественно в первые 4 месяца, затем процесс замедлился во всех образцах почв. К концу 3-го сезона концентрации УВН в некоторых вариантах с сорбентами АУД5, Тн10 и СС10 варьировали в интервале 5.0–5.9 г/кг, а в остальных вариантах – в интервале 6.0–8.4 г/кг. При этом разница между Концентрациями УВН в опытных образцах и в контроле **К1** во многих случаях была статистически недостоверной. Различие между содержанием ОУВН в почти во всех опытных образцах незначительно отличалось от контрольного уровня, и лишь в присутствии 10% АУД и 20% СС в первые месяцы накапливалось примерно вдвое меньшее количество ОУВН, чем в **К1**.

Более существенные различия между опытными и контрольным образцами наблюдались для некоторых свойств почвы, особенно для показателей ее **фитотоксичности**. В первые 2 месяца в контроле **К1** семена клевера белого (*Trifolium repens*) почти полностью погибали, затем фитотоксичность постепенно снижалась, но даже к концу 2-го и 3-го сезонов она оставалась повышенной: до  $35 \pm 5$  и  $27 \pm 3\%$ , соответственно. В то же время, внесение всех исследованных сорбентов (кроме 20% СС) резко снизило фитотоксичность почвы в первые 3–4 месяца до малотоксичного уровня (9–25%). Однако в присутствии всех органических сорбентов, особенно Спилсорба, фитотоксичность почвы вновь временно повышалась до 29–64% в зависимости от сорбента.

Изменения фитотоксичности почвы согласуются не только со снижением концентрации поллютантов, но и с динамикой изменением **pH почвы**. В контроле **К1**, а также в присутствии обеих доз вермикулита, ГАУ и АУД, уровень pH почвы колебался, в основном, в пределах от 6.0 до 7.3. В то

же время добавки органических сорбентов в дозе 10% и, еще более, 20% приводили к резкому подкислению почвы до pH 5.0–5.8 в зависимости от сорбента. Наиболее сильно снижался pH в варианте СС20. В большинстве случаев подкисление почвы сопровождалось повышением фитотоксичности и лишь своевременное внесение дополнительного количества ДМ обеспечивало нейтрализацию избыточной кислотности почвы, что сопровождалось снижением уровня фитотоксичности. В общей сложности для поддержания pH почвы, близкого к нейтральному, в образцах с органическими сорбентами потребовалось внесение примерно в 1.5–2.5 раза более высоких доз ДМ (Таблица 2).

В период наиболее быстрого снижения концентрации УВН наблюдалось практически симметричное повышение *численности углеводов-окисляющих микроорганизмов*, которая во всех образцах достигала максимума в первые 1.5–3 месяца обработки. В контроле **К1** численность УОМ возрастала до  $260 \pm 33$  млн КОЕ/г, тогда как в большинстве вариантов с сорбентами максимальная численность УОМ была в несколько раз выше. При этом наибольшее увеличение средней максимальной численности УОМ (до 900–1200 млн КОЕ/г) наблюдалось в вариантах с обеими дозами вермикулита и АУД. В почвах с добавками 10% органических сорбентов численность УОМ также существенно повышалась, однако в присутствии высоких доз (20%) органических сорбентов максимум УОМ снижался до 350–450 млн КОЕ/г и приближался среднему контрольному уровню в **К1**.

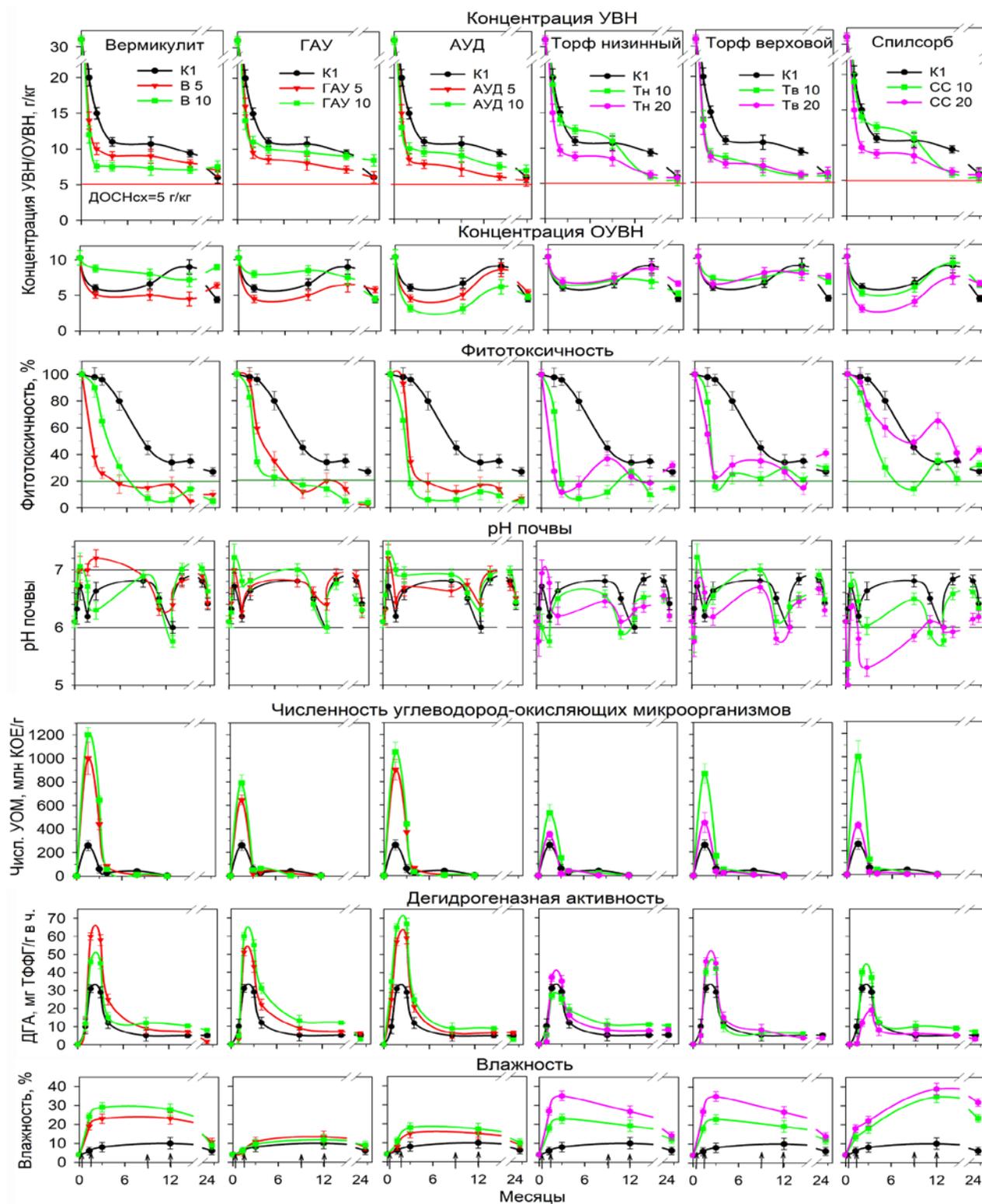
Аналогичным образом изменялась величина *дегидрогеназной активности* почвы (ДГА). Через 2–3 месяца ДГА повышалась до максимума: в контроле **К1** – до  $31.2 \pm 3.0$  мг ТФФ/г в ч., в вариантах с минеральными/углеродистыми сорбентами – до 51–65, а с органическими – до 28–46 мг ТФФ/г в ч. К концу сезона величина ДГА снизилась, и в дальнейшем регистрировалось лишь небольшое превышение ДГА по сравнению с чистой почвой: в пределах 2.7–5.0 и 0.6–0.7 мг ТФФ/г в ч, соответственно.

Иная картина наблюдалась при измерении полевой *влажности почвы*. По способности удерживать влагу в нефтезагрязненной почве сорбенты располагались в ряду: ГАУ < АУД < В < Тн = Тв < СС, причем величина полевой влажности почв возрастала с увеличением дозы сорбентов. В контроле **К1** влажность почвы в середине 1 и 2-го сезонов оставалась низкой (от 8 до 10%), в присутствии ГАУ и АУД она возрастала до 11–12 и 13–18% соответственно, а в вариантах с вермикулитом – до 22–28%. Но наиболее высокая влажность почвы (до 22–38%) поддерживалась во всех вариантах с органическими сорбентами.

На рисунке 4 приведены динамики изменения тех же характеристик почвы *Серии Н2* с высоким уровнем загрязнения (**К2** и АУДТ20), где они сравниваются с результатами 3-х вариантов *Серии Н1* (**К1**, АУД5 и АУД10). Сравнение полученных результатов показало, что разложение УВН в контроле **К2** протекало значительно медленнее, чем в менее загрязненной почве.

В первые 4 мес. *содержание УВН* снизилось с  $67.0 \pm 2.9$  до  $38.8 \pm 4.4$  г/кг, после чего процесс разложения резко замедлился, а к концу 3-го сезона концентрация УВН оставалась сравнительно высокой ( $22.3 \pm 2.8$  г/кг), тогда как в варианте АУДТ20 концентрация УВН за этот период снизилась до  $7.2 \pm 2.5$  г/кг.

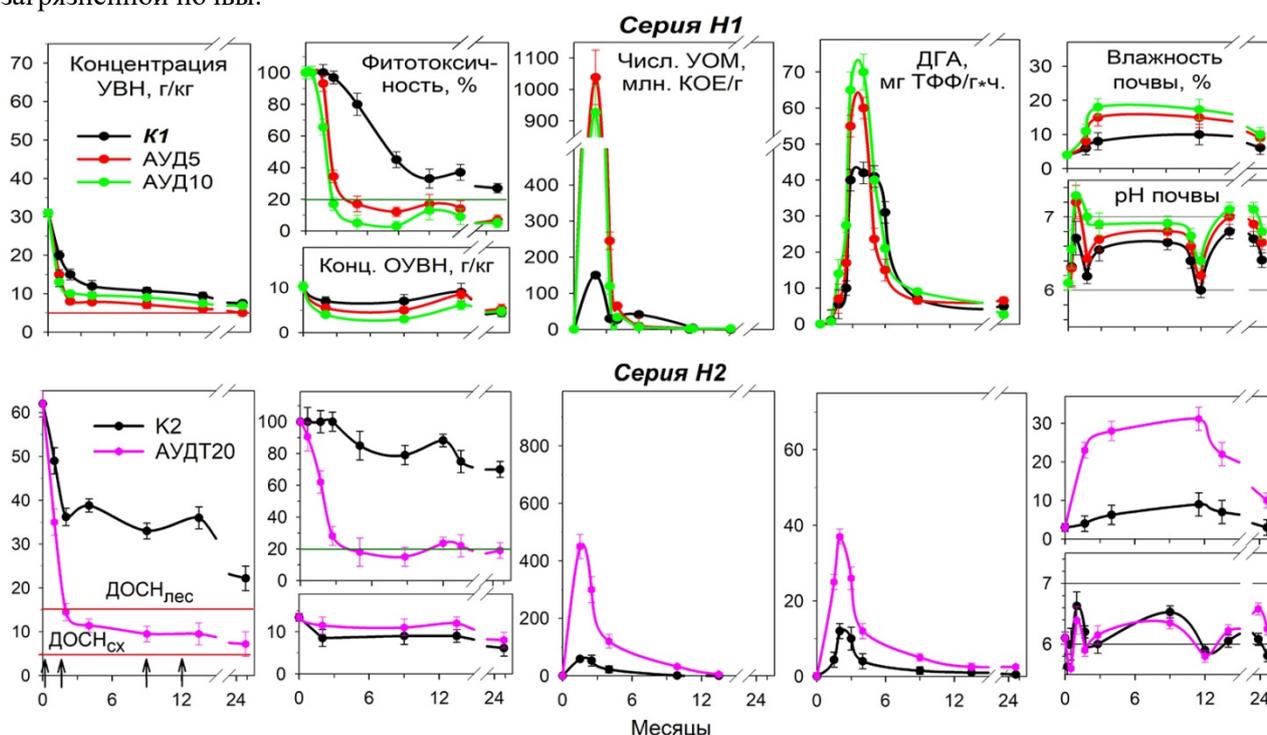
В сильно загрязненной почве перед началом обработки обнаруживали повышенные уровни ОУВН ( $13.4 \pm 0.9$  г/кг), концентрация которых медленно снижалась в течение всего периода. К концу наблюдений их содержание в опыте и контроле снизилось до  $6.1 \pm 0.6$  и  $8.2 \pm 0.8$  г/кг соответственно, а разница в содержании ОУВН между этими вариантами в большинстве точек отбора была статистически недостоверной. Таким образом, в почвах **К2** и АУДТ20 к концу наблюдений произошло разложение УВН на 67 и 89% соответственно, а концентрация ОУВН в обоих образцах снизилась на 40–55%.



**Рисунок 3.** Влияние двух доз (5 и 10%) минеральных и углеродистых сорбентов (В, ГАУ, АУД) и двух доз (15 и 20%) органических сорбентов (Тн, Тв, СС) на динамику изменения содержания УВН и ОУВН, а также характеристик почвы в ходе биоремедиации Подзола, загрязненного 6% нефти, в условиях микрополевого эксперимента *Серии Н1*. Здесь и далее стрелками указано время внесения АЗФ и ДМ; красными линиями отмечены уровни ДОСН, а зелеными – уровни минимальной фито- и биотоксичности почв.

Другие характеристики почв *Серии Н2* изменялись аналогично почвам *Серии Н1*, но в сильнозагрязненной почве разница между опытными и контрольным образцами по ряду показателей была более существенной. Вплоть до конца 3-го сезона **фитотоксичность** почвы *К2* оставалась очень высокой (>70%), тогда как в варианте АУДТ20 она снизилась до минимума (<20%) уже в первые месяцы обработки и далее поддерживалась на уровне 19–25%. В сильно загрязненном контроле *К2* наблюдался более низкий максимум **численности УОМ**, чем в *К1*, однако в варианте АУДТ20 этот показатель был на порядок выше, чем в *К2*:  $450.3 \pm 42.1$  и  $58.4 \pm 4.6$  млн КОЕ/г соответственно.

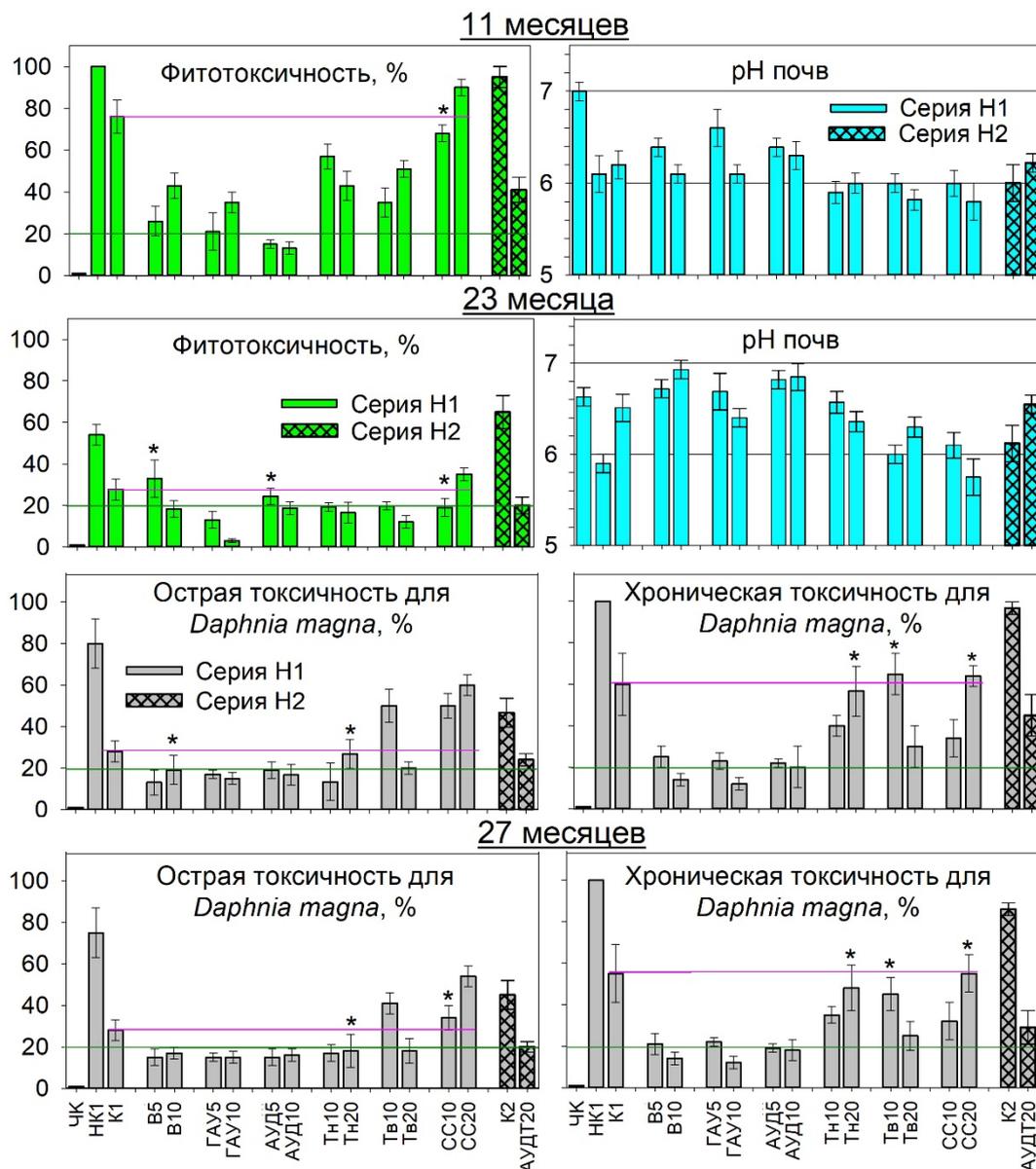
Аналогичная картина наблюдалась и по максимальным показателям **ДГА**. В опыте и контроле *К2* максимум ДГА достигал  $37.2 \pm 3.1$  и  $10.2 \pm 1.4$  мг ТФФ/г в час. соответственно. В первые месяцы обработки в *Серии Н2* наблюдалось существенное подкисление почвы до pH 5.5, однако в дальнейшем за счет дополнительного внесения ДМ в варианте АУДТ20 удалось поддерживать уровень pH почв близкий к нейтральному, хотя в этом композитном сорбенте также присутствовал торф. Но особенно заметная разница наблюдалась между показателями **полевой влажности почв**. В образцах АУДТ20 полевая влажность почвы в ходе инкубирования колебалась в интервале 23–31%, тогда как в контроле *К2* она не превышала 10%, что связано с высокой гидрофобностью сильно загрязненной почвы.



**Рисунок 4.** Влияние двух доз (5 и 10%) смешанного сорбента АУД и композитного сорбента АУДТ в дозе 20% на динамику изменения концентраций УВН и ОУВН в образцах Подзола, загрязненного, соответственно, 6% и 12% нефти, а также различных характеристик загрязненных почв в ходе трехлетнего микрополевого эксперимента в наилучших вариантах *Серии Н1* и двух вариантах *Серии Н2* соответственно.

На рисунке 5 приведены данные оценки показателей **интегральной токсичности почв** в конце 2-го и 3-го сезонов, где они сравниваются также с показателями pH почв. Представлены данные определения фитотоксичности почв сертифицированным методом по длине корней проростков пшеницы, а также биотоксичности по смертности *Daphnia magna* в остром и хроническом опытах. Во 2-м сезоне (через 11 мес.) в почве из необработанного контроля *НК1* высеванные растения полностью погибали, а на 3-й год рост корней ингибировался на  $54 \pm 4\%$ . В контроле *К1* во 2-м и 3-м сезонах **фитотоксичность почв**, оцененная сертифицированным методом, снизилась до  $74 \pm 6$  и  $25 \pm 4\%$  соответственно, тогда как в контроле *К2* этот показатель оставался еще очень высоким ( $66 \pm 7\%$ ) до конца 3-го сезона.

С другой стороны, в **Серии Н1** уже во 2-м сезоне фитотоксичность почв с добавками АУД снизилась до минимума (12–15%), а в присутствии вермикулита и ГАУ – до 21–43%, тогда как в вариантах со всеми органическими сорбентами она оставалась высокой – в пределах 35–95%. Повышенная фитотоксичность почвенных образцов с органическими сорбентами совпадала с понижением рН почв до 6.0 и менее. Однако, в 3-м сезоне в большинстве вариантов с сорбентами фитотоксичность почв приблизилась к минимуму (<20%) за исключением почвы варианта СС20 с рН <6.0, где длина корней проростков еще была достоверно ниже на 32–34%, чем в чистом контроле. В **Серии Н2** фитотоксичность почвы АУДТ20 в середине 3-го сезона снизилась до минимума, тогда как в контроле **К2** она оставалась очень высокой (66±5%).



**Рисунок 5.** Влияние одной или двух доз сорбентов (В, ГАУ, АУД, Тн и Тв, СС, АУДТ), на показатели интегральной токсичности и рН почвы Подзол, загрязненной 6 и 12% нефти, оцененные через 11, 23 и 27 мес. после начала обработки в условиях микрополевого эксперимента **Серии Н1** и **Серии Н2**. Интегральную токсичность почвы оценивали по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а также по биотоксичности в остром и хроническом биотестах с *Daphnia magna*. Звездочками отмечены варианты, в которых разница между опытными и контрольной вариантами была недостоверной ( $p < 0.05$ ). Шифры соответствуют вариантам, приведенным в Таблице 2. Малиновыми прямыми отмечен уровень фито- и биотоксичности почвы в контроле **К1**.

Данные по фитотоксичности подтверждаются результатами *биотестов на гидробионтах Daphnia magna*, при этом результаты, полученные с помощью дафний, показывают еще более высокий уровень биотоксичности почв, чем с помощью фитотестирования.

Наиболее значимые различия проявляются при определении хронической токсичности водно-почвенных суспензий, оцениваемой по размножению дафний. В вариантах *Серии Н1* в последнем сезоне биотоксичность образцов *НК1*, как острая, так и хроническая, была очень высокой и колебалась в пределах 75–80 и 98–99% соответственно. В контроле *К1* эти показатели снизились лишь до 27–28 и 55–60%, соответственно. Внесение минеральных и углеродистых сорбентов уже через 23 мес. обеспечило достоверное снижение смертности дафний по сравнению с контролем *К1*, а через 27 мес., и в остром, и в хроническом биотесте этот показатель снизился до минимума (<20%). Однако те же показатели для большинства образцов с органическими сорбентами до конца наблюдений оставались повышенными.

В то же время в *Серии Н2* в середине и конце 3-го сезона показатели острой и хронической токсичности контрольной почвы *К2* оставались высокими: в пределах 44–48 и 69–74% соответственно. В противоположность этому, обработка сильнозагрязненной почвы методом сорбционной биоремедиации с внесением 20% АУДТ к концу 3-го сезона обеспечила снижение этих показателей до  $20 \pm 2$  и  $28 \pm 9\%$ , соответственно, т.е. почти до допустимого уровня (<20%).

## 2. Результаты вегетационного эксперимента

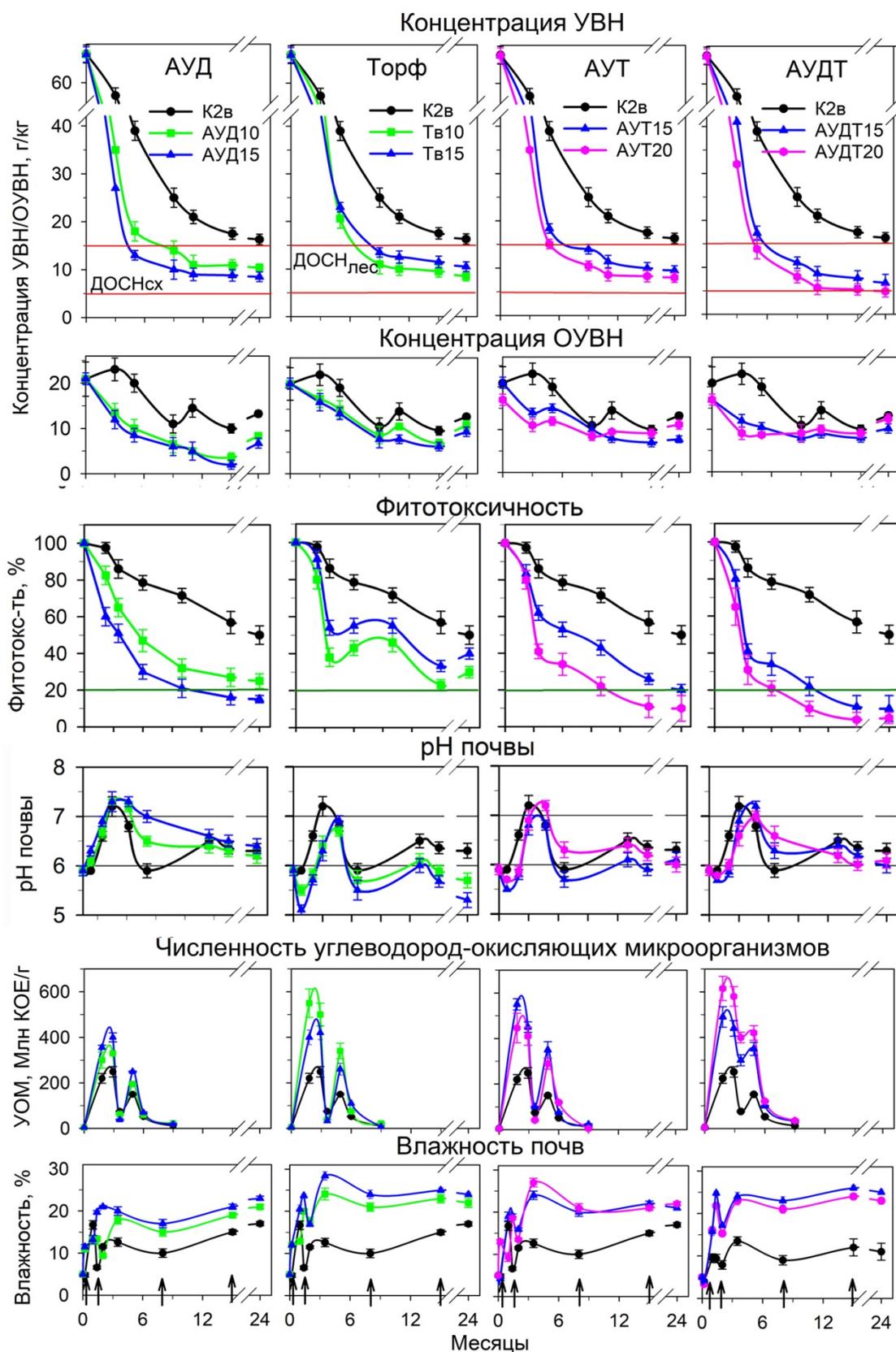
Результаты вегетационного эксперимента представлены на рисунках 6 и 7. На рисунке 6 показана динамика изменения содержания УВН и ОУВН в почвах, а также разных почвенных свойств в ходе всего периода наблюдения. Из представленных данных следует, что все изученные сорбенты оказывали положительное действие на скорость разложения нефти. К концу 3-го сезона концентрация УВН в контроле *К2в* снизилась с  $71.2 \pm 3.4$  до  $16.3 \pm 1.1$  г/кг. При этом в почве первоначально накапливались значительные количества ОУВН –  $20.9 \pm 3.8$  г/кг, затем их концентрация в контроле сначала несколько возрастала, а к концу эксперимента снизилась с до  $13.3 \pm 0.7$  г/кг.

В присутствии всех сорбентов разложение УВН ускорилось, особенно в первые месяцы, а через 26 мес. остаточные концентрации УВН в этих почвах были в 1.5–2 раза ниже, чем в контроле *К2в*. Наиболее быстро разложение УВН, как и ожидалось, протекало в вариантах АУДТ15 и АУДТ20, в которых остаточные концентрации УВН в конце 1-го сезона варьировали в пределах 13.9–17.3 г/кг, а к концу 3-го сезона – в пределах 4.9–6.1 г/кг, причем отличие между вариантами с разными дозами АУДТ в обоих случаях было статистически недостоверным. В остальных образцах с сорбентами разложение УВН протекало немного медленнее, а в конце 3-го сезона остаточные концентрации УВН варьировали в интервале 8.4–10.5 г/кг, то есть в вариантах с сорбентами к концу наблюдений концентрация УВН снизилась на 85–92% по сравнению с 77% в *К2в*, а в наилучших вариантах (с АУДТ) она достигла уровня ДОСНсх.

**Фитотоксичность** почв с сорбентами в *Серии Н2в* снижалась значительно быстрее, чем в контроле *К2в*, а наилучшие результаты также были продемонстрированы в вариантах с двумя дозами композитного сорбента АУДТ, где минимальный уровень фитотоксичности (<20%) был достигнут через 7–12 мес., тогда как в почве с другими смешанными сорбентами – только через 13–26 мес. Образцы с добавками одного торфа, также, как и контрольные образцы *К2в*, наоборот, сохраняли повышенную фитотоксичность (до 35–50%) вплоть до конца наблюдений.

В вегетационном эксперименте, так же, как и в микрополевом, повышенная фитотоксичность образцов с добавками обеих доз торфа коррелировала с существенным понижением *pH почвы* – до уровня <6.0. Величины pH образцов со смешанным сорбентом АУТ в некоторые периоды времени также были пониженными, но в меньшей степени, чем с одним торфом. С другой стороны, в вариантах с добавками АУД и АУДТ pH почв колебался в основном в интервале от 6.0 до 7.4.

Во всех образцах вегетационного эксперимента **численность УОМ** повышалась в первые месяцы после начала обработки. При этом наблюдалось 2 максимума их численности: через 2 и 5 мес., т.е. примерно через 1,5–2 мес. после первых двух внесений основной части АЗФ и ДМ.

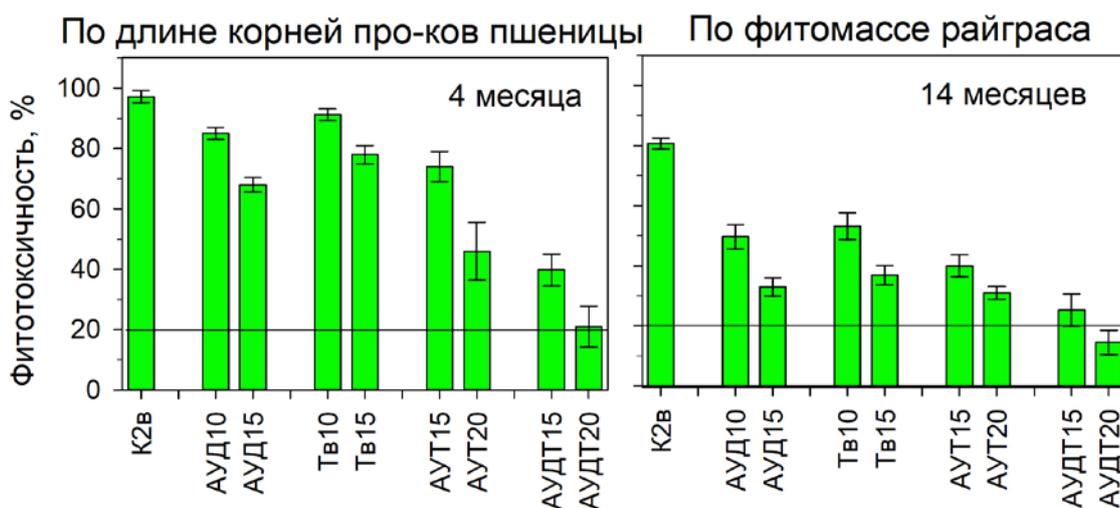


**Рисунок 6.** Влияние двух доз (10 и 15%) сорбентов АУД и Тв и двух доз (15 и 20%) АУТ и АУДТ на динамику изменения концентраций УВН и ОУВН в почве Подзол, загрязненной 12% нефти, а также на изменение характеристик почвы в условиях вегетационного эксперимента *Серии Н2в*. Измерялись фитотоксичность почвы, оцененная экспресс-методом, численность УОМ в почвах, их водный pH и влажность.

Максимальная численность УОМ наблюдалась в вариантах АУДТ20 ( $615 \pm 54$  млн КОЕ/г), тогда как в остальных образцах с сорбентами максимум численности УОМ варьировал в интервале 298–554 млн КОЕ/г.

Кроме того, в образцах с сорбентами на основе торфа, поддерживалась наиболее высокая *влажность почв* (от 20 до 28%), в образцах с добавками АУД она колебалась в пределах 17–23%, однако, в большинстве случаев этот показатель достоверно превосходил влажность контрольной почвы *К2в*, колебавшейся в пределах 6–16%.

На рисунке 7 представлены данные *фитотоксичности* почв *Серии Н2в*, определенной стандартными методами. Фитотоксичность контрольной почвы через 4 и 14 мес. оставалась очень высокой:  $97.2 \pm 2.0$  и  $80.7 \pm 1.8\%$  соответственно.



**Рисунок 7.** Влияние сорбентов АУД и Тв, внесенных в дозах 10 и 15%, а также АУТ и АУДТ, внесенных в дозах 15 и 20%, на фитотоксичность Подзола, загрязненного 12% нефти, в вегетационном эксперименте *Серии Н2в*. Через 4 мес. фитотоксичность почв оценивали по длине корней проростков пшеницы (*Triticum vulgare*), а через 14 мес. – по сухой фитомассе 1-месячных растений райграса пастбищного (*Lolium perenne*).

При этом, в оба срока наблюдений в вариантах с сорбентами фитотоксичность почв снижалась в ряду Тв>АУД>АУТ>АУДТ, и во всех случаях фитотоксичность почв с сорбентами была достоверно ниже, чем в контроле *К2в*. Для почв с большей дозой сорбента этот показатель был ниже, чем с его меньшей дозой. Причем, через 14 месяцев фитотоксичность почвы в варианте АУДТ20 снизилась до минимума (<20%), а в АУДТ15 – до  $26.3 \pm 6.4\%$ . В остальных вариантах с сорбентами к этому времени наблюдений фитотоксичность почв была выше и колебалась в пределах 31–49%.

### Обсуждение

Таким образом, результаты микрополевого эксперимента показали, что при проведении биоремедиации умеренно загрязненных почв *Серии Н1* (6% нефти), как классическим методом (контроль *К1*), так и методом сорбционной биоремедиации на фоне внесения разных натуральных сорбентов, уже к концу 1-го сезона концентрация УВН снизилась с  $31.8 \pm 1.3$  г/кг до уровня ниже допустимого для почв лесохозяйственного назначения – ДОСНлес. При этом, к концу 3-го сезона использование ряда сорбентов (5% АУД5 и 10% Тн или СС) обеспечило снижение остаточных концентраций УВН в почве до  $5.5 \pm 0.5$  г/кг, т.е. практически до уровня ДОСНсх. В образцах с органическими сорбентами, как и в контроле *К1*, остаточные концентрации УВН колебались в интервале 6.0–8.4 г/кг, и таким образом также приблизились к уровню ДОСНсх. При этом разница между некоторыми вариантами и контролем отсутствовала.

Однако, в сильно загрязненной почве *Серии Н2* (12% нефти) аналогичное снижение концентрации УВН до указанных допустимых уровней наблюдалось только при проведении сорбционной биоремедиации на фоне внесения 20% АУДТ, тогда как в контрольной почве *К2*

конечная концентрация УВН ( $22.2 \pm 1.8$  г/кг) оставалась существенно выше обоих допустимых нормативов.

Результаты вегетационного эксперимента *Серии Н2в* подтвердили высокую эффективность сорбционной биоремедиации сильно загрязненной почвы с использованием композитного сорбента АУДТ. Хотя все изученные сорбенты и их смеси, входящие в состав АУДТ (торф, АУД и АУТ), внесенные в дозах 10, 15 или 20%, оказывали положительное действие на скорость биоремедиации сильно загрязненного нефтью Подзола, однако наилучшие результаты были получены с добавками композитного сорбента АУДТ. Сорбционная биоремедиация Подзола на фоне внесения 15 и 20% АУДТ за 4 мес. обеспечила снижение концентрации УВН с  $71.2 \pm 3.4$  г/кг до уровня ДОСНлес, а через 14 мес. остаточные концентрации УВН в этих почвах приблизились к уровню ДОСНсх. При этом, разложение УВН сопровождалось накоплением наименьших (по сравнению с другими образцами) концентраций продуктов микробного окисления углеводов – ОУВН.

В то же время, сравнение показателей фито- и биотоксичности почв показало иные результаты. В почвах *Серии Н1*, не смотря на снижение остаточных концентраций УВН до допустимых уровней, снижение фито- и биотоксичности до минимума наблюдалось лишь в почвах с добавками обеих доз (5 и 10%) минеральных или углеродистых сорбентов (АУД, ГАУ и вермикулит). Остальные почвы (контроль *К1* и варианты с добавками органических сорбентов) проявляли еще значительную фитотоксичность вплоть до конца 3-го сезона. В вариантах с органическими сорбентами повышенная фитотоксичность коррелировала с понижением рН почв до величин 5.6–6.1. Факт высокой токсичности этих почв можно объяснить присутствием в них повышенных концентраций метаболитов ОУВН, токсичность которых, как было показано ранее [18], может быть существенно выше, чем самих углеводов. Кроме того, из-за снижения сорбции этих полярных кислородсодержащих соединений в почвах с пониженным рН их токсическое действие на растения и особенно на гидробионты может еще более повышаться.

Эти выводы подтверждаются результатами, полученными для сильнозагрязненной почвы *Серии Н2*. Через 3 года обработки классическим методом биоремедиации в контроле *К2* наблюдались остаточные концентрации УВН, значительно превышавшие оба допустимых уровня ДОСН. Это указывает на то, что токсическое действие на рост растений, а также на выживаемость и размножение дафний, могут оказывать сами углеводороды, остаточные концентрации которых в этой почве превышают критический уровень. В то же время, более высокий уровень биотоксичности, оцененной по гибели и размножению дафний в водных вытяжках, по сравнению с фитотоксичностью, оцениваемой по росту растений в почве, может также свидетельствовать о дополнительном токсическом действии метаболитов ОУВН, которые вследствие сравнительно высокой водорастворимости обладают более высокой подвижностью и токсичностью, чем исходные углеводороды. Полученные результаты подтверждают выводы ряда авторов о необходимости наряду с достижением допустимого уровня по содержанию нефтепродуктов в рекультивированных почвах учитывать интегральные показатели их токсичности [30, 31].

На основании полученных результатов можно также сделать вывод о высокой эффективности метода сорбционной биоремедиации для очистки от нефти подзола супесчаного. При этом, в случае умеренно загрязненной почвы наилучшим сорбентом для проведения сорбционной биоремедиации является смешанный сорбент АУД, дополнительное внесение которого в дозе, близкой к исходному уровню загрязнения, может обеспечить рекультивацию подзола иллювиально-железистого в короткие сроки. В течение первого теплого сезона концентрация УВН может снизиться до уровня ДОСНлес, а к концу 2-го или 3-го сезонов – до уровня ДОСНсх, причем к концу обработки показатели интегральной токсичности этих почв снизятся до требуемого минимума – <20%.

С другой стороны, для очистки сильно загрязненного нефтью Подзола рекомендуется внесение композитного сорбента АУДТ в дозе, двукратно превышающей исходный уровень содержания нефтепродуктов. Это объясняется повышенной гидрофобностью сильно загрязненной нефтью супесчаной подзолистой почвы, которая обусловлена ее низкой буферностью. В то же время, в сильнозагрязненной почве на фоне внесенного композитного сорбента АУДТ создаются более благоприятные условия для развития микроорганизмов-деструкторов, о чем свидетельствует также максимальное повышение численности углеводород-окисляющих микроорганизмов и более высокие,

чем в контроле, показатели дегидрогеназной активности этих почв, наблюдаемые в период максимальной скорости разложения углеводов.

Ускорение разложения углеводов нефти во всех изученных образцах в присутствии АУД или АУДТ можно объяснить созданием наиболее благоприятных условий для активации микроорганизмов-деструкторов нефти за счет нескольких факторов. Это может быть связано с понижением токсичности почвы за счет преимущественно обратимой сорбции углеводов, а также вследствие меньшего накопления токсичных продуктов окисления ОУВН. Основную роль в этом процессе, по-видимому, играет **активированный уголь**, обладающий высокой поглотительной способностью по отношению ко многим органическим соединениям.

Положительную роль добавок **диатомита** в сорбентах АУД и АУДТ можно объяснить способностью этого минерала выделять моно- и поликремниевые кислоты, которые повышают устойчивость растений к стрессу, а также снижают прочное связывание высокоядерных представителей ПАУ, входящих в состав нефти. Этот эффект был продемонстрирован в наших предыдущих исследованиях по биоремедиации нефтезагрязненных почв Русской равнины [18, 19, 23], а также для глеево-подзолистой почвы, отобранной на территории ЯНАО [28].

Другой механизм положительного влияния сорбентов АУД и, еще более, АУДТ на скорость биоремедиации нефтезагрязненного Подзола обусловлен поддержанием оптимальной влажности почвы в ходе ее обработки, что особенно важно в случае высокого уровня загрязнения. При этом наибольший эффект обеспечивают добавки **торфа**, который значительно повышает влагоемкость нефтезагрязненных почв, что было доказано нами в предыдущих исследованиях [19]. В то же время в присутствии торфа, особенно на фоне внесения высоких доз минеральных удобрений, возможно значительное подкисление почвы из-за разложения присутствующих в нем растительных остатков. Однако внесение торфа в смеси с активированным углем снижает возможное подкисление почвы за счет присутствующих в нем зольных элементов Са и Mg. Об этом свидетельствует также меньшая доза ДМ, внесенная для нейтрализации избыточной кислотности в почву вариантов с АУДТ, по сравнению с самим торфом.

## Заключение

Результаты исследований, проведенных в условиях микрополевого и вегетационного экспериментов с подзолом иллювиально-железистым, загрязненным 6 и 12% нефти, продемонстрировали более высокую эффективность применения метода сорбционной биоремедиации по сравнению с классическим методом биоремедиации с помощью биопрепаратов на основе выделенных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов. При этом важными факторами, влияющими на скорость микробного разложения углеводов, являются выбор дозы и формы сорбента, а также дозы комплексных минеральных удобрений и доломитовой муки, которые должны поддерживать оптимальный уровень доступных для микроорганизмов углеводов в почве, необходимое соотношение углерода и биофильных элементов, а также обеспечивать уровень кислотности почвы, близкий к нейтральному.

Таким образом, на примере экспериментов с загрязненным сырой нефтью подзолом иллювиально-железистым была показана перспективность использования метода сорбционной биоремедиации для ликвидации аварийных ситуаций вследствие утечек нефти на поверхности минеральных почв, распространенных в нефтедобывающем регионе на территории Северо-Западной Сибири. Установлено, что наилучшим сорбентом для проведения сорбционной биоремедиации умеренно загрязненных почв является АУД (смесь гранулированного активированного угля и диатомита, 4:1), а для сильно загрязненной почвы наилучшие результаты были получены с добавками композитного сорбента на основе АУД и торфа (1:1).

Применение метода сорбционной биоремедиации нефтезагрязненных подзолистых почв на фоне внесения оптимальных доз этих сорбентов может в течение уже одного-двух вегетационных сезонов обеспечить снижение концентрации нефтепродуктов до уровня, допустимого для рекультивированных почв ХМАО, предназначенных для лесного использования, а через 2–3 сезона обработки – и для почв сельскохозяйственного назначения. При этом, показатели интегральной токсичности почв будут снижены до минимума.

Механизм положительного действия этих сорбентов объясняется снижением токсичности почв за счет преимущественно обратимой сорбции углеводородов нефти и их метаболитов, поддержания оптимальной влажности и рН почвы, а также повышения устойчивости микроорганизмов и растений к неблагоприятным факторам, что создает условия для ускоренного разложения поллютантов и минимизации показателей интегральной токсичности почв.

### Вклад авторов

К.б.н. Васильева Г.К. планировала исследования и писала основной текст статьи, к.б.н. Михедова Е.Е. проводила анализы почв и писала результаты экспериментов, к.б.н., с.н.с. Стрижакова Е.Р. выполняла анализы почв и писала раздел Методы анализа, Ахметов Л.И. подготовил к применению биопрепарат Микробак и определял численность микроорганизмов-деструкторов, а также участвовал в обсуждении результатов. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Основные показатели охраны окружающей среды. Статистический бюллетень. // [Электронный ресурс]. Федеральная служба государственной статистики, М., 2023. -105 с. Доступен по ссылке: [https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/oxr\\_bul\\_2023.pdf](https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/oxr_bul_2023.pdf). (дата посещения 01.10.2023).
2. Доклад «Об экологической ситуации в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре в 2021 году» [Электронный ресурс] — Ханты-Мансийск, 2022 год. Доступен по ссылке: <https://prirodnadzor.admhmao.ru/upload/iblock/fa0/МАКЕТ-DOKLADA-2021.docx> (дата посещения 15.09.2024).
3. Vasilyeva G. K., Strijakova E. R., Ortega-Calvo J-J. Remediation of soils polluted by oil industries. *In Soil Remediation, Science and Technology*, Ed. by J-J. Ortega-Calvo, F. Coulon (Germany, Springer-Nature, 2024, pp. 191-239. DOI: 10.1007/698\_2024\_1080.
4. Федеральный закон от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ "Об охране окружающей среды" (Электронный ресурс). Статья 46, пункт 14, подпункты 4–5. Доступен по ссылке: [https://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_34661/66adaab0989b794d736d9eb8e3a3ac44bf40a039/](https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34661/66adaab0989b794d736d9eb8e3a3ac44bf40a039/) (дата посещения 31.01.2023).
5. Naeem U., Qazi M. A. Leading edges in bioremediation technologies for removal of petroleum hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **27** (22), 27370–27382 (2020). DOI: 10.1007/s11356-019-06124-8.
6. Ławniczak Ł., Wozniak-Karczewska M., Loibner A. P., Heipieper H. J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: a review. *Molecules*, **25** (4), 856 (2020). DOI: 10.3390/molecules25040856.
7. Yuniati M. D. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: a review. *Earth Environ Sci.*, **118** (012063) (2018). DOI: 10.1088/1755-1315/118/1/012063.
8. De la Huz R., Lastra M., López J. Other environmental health issues: oil spill. *In Encyclopedia of Environmental Health*, Ed. by J. Nriagu (Burlington, NJ, USA, Elsevier, 2018), pp. 251–255. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11156-X.
9. Башкин В. Н., Лужков В. А., Трубицина О. П. Разработка биосорбента для ликвидации последствий углеводородных загрязнений на объектах нефтегазового комплекса. *Проблемы анализа риска*, **18** (1), 40-51 (2021). DOI: 10.32686/1812-5220-2021-18-1-40-51.
10. Федорова О. С., Бондарь П. Н., Рязанова Т.В. Влияние биосорбента «унисорб-био» с иммобилизованной микрофлорой родов *Bacillus* и *Trichoderma* на восстановление почвы в условиях нефтяного загрязнения. *Журнал СВУ. Химия*. **15** (2), 289–297 (2022). DOI: 10.17516/1998-2836-0293.

11. Cui J.-Q., He Q.-S., Liu M.-H., Chen H., Sun M.-B., Wen J.-P. Comparative study on different remediation strategies applied in petroleum-contaminated soils. *Int J Environ Res Public Health*, **17** (5), 1606 (2020). DOI: 10.3390/ijerph17051606.
12. Мязин В. А., Исакова Е. А., Васильева Г. К. Влияние гранулированного активированного угля на скорость биоремедиации почв Мурманской области, исторически загрязненных нефтепродуктами. *Проблемы региональной экологии*, **2**, 20–26 (2020). DOI: 10.24411/1728-323X-2020-12020.
13. Myazin V. A., Korneikova M. V., Chaporgina A. A., Fokina N. V., Vasilieva G. K. The effectiveness of biostimulation, bioaugmentation and sorption-biological treatment of soil contaminated with petroleum products in the Russian Subarctic. *Microorganisms*, **9**, 1722 (2021). DOI: 10.3390/microorganisms9081722.
14. Minnikova T., Kolesnikov S., Ruseva A., Kazeev K., Minkina T., Mandzhieva S., Sushkova S. Influence of the biochar on petroleum hydrocarbon degradation intensity and ecological condition of haplic chernozem. *Eur J Soil Sci*, **11** (2), 157–166 (2022). DOI: 10.18393/ejss.1037798.
15. Zavgorodnyaya Y. A., Stepanov A. A., Trofimov S. Y., Farkhodov Y., Pervakova V. N., Sokolova T. A., Aptikaev R. S. Effect of introduction of clays, mineral fertilizers, and soil ameliorants on decomposition of organic pollutants in oil-polluted sand under conditions of model experiment. *Moscow University Soil Sci Bull.*, **72** (1), 35–41 (2017). DOI: 10.3103/S0147687417010070.
16. Ukpaka C. P., Eno O. N. Modeling of *Azadirachta indica* leaves powder efficiency for the remediation of soil contaminated with crude oil. *Chem Internat.*, **7** (1), 62–70 (2021). DOI: 10.5281/zenodo.4032367.
17. Васильева, Г. К., Стрижакова Е. Р., Бочарникова Е. А., Семенюк Н. Н., Яценко В. С., Слюсаревский А. В., Барышникова Е. А. Нефть и нефтепродукты как загрязнители почв. Технология комбинированной физико-биологической очистки загрязненных почв. *Российский химический журнал*, **57** (1), 79–104 (2013).
18. Vasilyeva G., Kondrashina V, Strijakova E., Ortega-Calvo J.-J. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. *Sci Tot Environ.*, **706**, 135739 (2020). DOI: 10.1016/j.stotenv.2019.135739.
19. Vasilyeva G., Mikhedova E., Zinnatshina L., Strijakova E., Akhmetov L., Sushkova S., Ortega-Calvo J.-J. Use of natural sorbents for accelerated bioremediation of grey forest soil contaminated with crude oil. *Sci Tot Environ.*, **850**, 157952 (2022). DOI: 10.1016/j.stotenv.2022.157952.
20. Al-Muqbel D., Otifi M., Aly R., Darra R., Al-Othman A., Tawalbeh M., Halalshah N. Bioremediation of petrochemical sludge from soils. In *Metagenomics to Bioremediation*. Ed. by V. Kumar, M. Bilal, S. K. Shahi, V. K. Carg (Elsevier Science, 2022), pp. 379–402. DOI: 10.1016/B978-0-323-96113-4.00009-3.
21. Sozina I. D., Danilov A. S. Microbiological remediation of oil-contaminated soils. *J Mining Inst.*, **260**, 297–312 (2023). DOI: 10.31897/PMI.2023.8.
22. Слюсаревский А. В., Зиннатшина Л. В., Васильева Г. К. Сравнительный эколого-экономический анализ методом рекультивации нефтезагрязненных почв путем биорекультивации *in situ* и механической замены грунта. *Экология и промышленность России*, **22** (11), 40–45 (2018). DOI: 10.18412/1816-0395-2018-11-40-45.
23. Kondrashina V., Strijakova E., Zinnatshina L., Bocharnikova E., Vasilyeva G. Influence of activated carbon and other additives on bioremediation rate and characteristics of petroleum-contaminated soils. *Soil Sci. (Special Issue)*, **138** (4), 150–159 (2018). DOI: 10.1097/SS.0000000000000234.
24. Середина В. П., Садыков М. Е., Блохина С. Л. Физическое состояние фоновых почв нефтяных месторождений средней тайги Западной Сибири. *Вестник Томского государственного университета. Биология.*, **4** (16), 17–29 (2011).
25. Башкин В. Н., Галиулин Р. В. Рекультивация нарушенных почв на Тазовском полуострове. *Жизнь Земли*, **2**, 153–159 (2020). DOI 10.29003/m1385.0514-7468.2020\_42\_2/153-159.
26. Chaudhary D. K., Kim J. New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. *Biodegradation*, **142**, 58–72 (2019). DOI: 10.1016/J.IBIOD.2019.05.001.

27. Korneykova, M. V., Myazin V. A., Fokina N. V., Chaporgina A. A. Bioremediation of soil of the Kola Peninsula (Murmansk region) contaminated with diesel fuel. *Geography Environment Sustainability*, **14** (1), 171–176 (2021). DOI: 10.24057/2071-9388-2019-170.
28. Михедова Е. Е., Васильева Г. К., Стрижакова Е. Р., Ланкин А. В., Ахметов Л. И., Узорина М. И. Использование биотестирования для оценки сорбционной биоремедиации нефтезагрязненной подзолистой почвы Западной Сибири. *Природные ресурсы Арктики и Субарктики*, **28** (4), 595–605 (2023). DOI: 10.31242/2618-9712-2023-28-4-595-605.
29. Постановление правительства Ханты-Мансийского Автономного Округа – Югры от 10 декабря 2004 года N 466-п «Об утверждении регионального норматива "допустимое остаточное содержание нефти и нефтепродуктов в почвах после проведения рекультивационных и иных восстановительных работ на территории Ханты-Мансийского Автономного Округа - Югры"».
30. Капелькина Л. П., Бардина Т. В., Чугунова М. В., Бакина Л. Г., Герасимов А. О., Бардина В. И., Малышкина Л. А. Экотоксикологическая оценка буровых шламов нефтяных месторождений биологическими методами. *Приборы*, **3** (165), 50-55 (2014).
31. Терехова В. А. Биотестирование почв: подходы и проблемы. *Почвоведение*, **2**, 190–198 (2011).
32. СП 2.1.7.1386-03. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления, 2003. 20 с.
33. Filonov A., Akhmetov L., Puntus I., Solyanikova I. Removal of oil spills in temperate and cold climates of Russia: experience in the creation and use of biopreparations based on effective microbial consortia. *In: Biodegradation, pollutants and bioremediation principles*. Ed. by E. D. Bidoia, R. N. Motagnolli (Boca Raton, CA, USA, Taylor's & Francis CRC Press), pp. 137–159 (2021). DOI:10.1201/9780429293931-7.
34. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. Москва, 2006, 21 с.
35. Теппер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии: 5-е издание, В. К. Шильникова. (Дрофа, Москва, 2004). 256 с.
36. Хазиев Ф. Х. *Методы почвенной энзимологии*, Ф. Х. Хазиев. (Наука.ю Москва, 2005). 252 с.
37. Vasilyeva G. K., Kondrashina V. S., Strijakova E. R., Pinsky D. L. Express-phytotest for choosing conditions and following process of soil remediation. *Environ Geochem Health.*, **44** (2) 433–445 (2020), DOI: 10.1007/s10653-020-00727-8.
38. ИСО 11269-1:2012 - Качество почвы. Определение воздействия загрязняющих веществ на флору почвы, 2012.
39. ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06, Т 16.1:2.3.3.9-06. Токсикологические методы анализа. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (*Daphnia magna Straus*), утв. ФГУ «ФЦАО» 19.04.2011. 33 с.



УДК 576.3, 661.635.68, 663.12

Статья

# Полифосфаты, полифосфатазная активность и устойчивость к стрессам нокаут-мутантов *Prp1* и *Prp2* *Saccharomyces cerevisiae*

Трилисенко Л. В.<sup>1</sup>, Ледова Л. А.<sup>1</sup>, Рязанова Л. П.<sup>1</sup>, Кулаковская Е. В.<sup>1</sup>,  
Томашевский А. А.<sup>1</sup>, Кулаковская Т. В.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН ФИЦ  
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
142290 Пущино, Россия, email: adm@ibpm.ru

\* Ответственный за переписку: alla@ibpm.ru

**Цитирование:** Трилисенко Л.В., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаковская Е.В., Томашевский А.А., Кулаковская Т.В. Полифосфаты, полифосфатазная активность и устойчивость к стрессам нокаут-мутантов генов *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующих полифосфатазы *Prp1* и *Prp2*. *Biologia et Biotechnologia* 2024, 1, 4. <https://doi.org/10.61847/pbcraas.bbt.2024.1.4>.

Получено: 30.09.2024

Принято: 21.10.2024

Опубликовано: 07.11.2024

**Авторские права:** © 2024 год от авторов. Представлено для публикации в открытом доступе на условиях открытой лицензии.

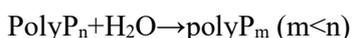
**Реферат:** С использованием коммерчески доступных нокаутных мутантов *Saccharomyces cerevisiae* (исходный штамм BY4741) по генам *PPN1* и *PPN2*, кодирующим полифосфатазы, показано, что каждая из двух одиночных мутаций приводит к набору схожих физиологических эффектов на стационарной стадии роста на глюкозе: повышению устойчивости к марганцевому и перекисному стрессам и повышению уровня длинноцепочечных полифосфатов. Повышение уровня длинноцепочечных полифосфатов более выражено при нокаут-мутации в гене *PPN2*. Мы предполагаем, что повышенная устойчивость к стрессу штаммов  $\Delta prp1$  и  $\Delta prp2$  связана с повышением уровня длинноцепочечных полифосфатов. Клетки мутанта  $\Delta prp1$  не отличались по параметрам роста в средах с этанолом или глюкозой, а также по содержанию полифосфатов в митохондриях по сравнению с родительским штаммом. Мутант  $\Delta prp2$  имел более длинную лаг-фазу при переходе к потреблению этанола. Полученные данные подтверждают представление о том, что полифосфатазы *Prp1* и *Prp2* ответственны за регуляцию длины цепи полифосфатов, а полифосфаты и их обмен важны для стрессовой адаптации дрожжей.

**Ключевые слова:** Полифосфатаза; полифосфаты; стресс; *PPN1*; *PPN2*; митохондрии; *Saccharomyces cerevisiae*

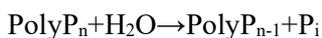
## Введение

Неорганические полифосфаты (polyP), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, присутствуют во всех живых клетках от архей до млекопитающих. В настоящее время сложилась концепция участия polyP и ферментов метаболизма polyP в различных процессах, регулирующих жизнедеятельность эукариот [1–3]. Дрожжи могут накапливать большое количество polyP [4]. Функции этих полимеров в клетках дрожжей простираются от фосфатного и энергетического резерва [4] до ключевой роли в регуляции клеточного цикла [5] и модификации активности ферментов [6–8]. PolyP влияют на физиологию клетки посредством неферментативного полифосфорилирования остатков лизина в белках, включая ДНК-топоизомеразу I, Nsr1 и факторы биогенеза рибосом [7]. PolyP дрожжей участвуют в подавлении экспрессии генов, предположительно в пути субтеломерного ингибирования TORC2 [9].

Одним из подходов к пониманию путей участия polyP в различных клеточных процессах является изучение физиологических особенностей нокаут-мутантов в генах, кодирующих ферменты, метаболизирующие polyP. У *Saccharomyces cerevisiae* идентифицированы и охарактеризованы четыре полифосфатазы [10–14]. Среди них Ppn1 и Ppn2 оказывают наибольшее влияние на уровень и длину цепи polyP [10–13]. Как Ppn1, так и Ppn2 проявляют эндополифосфатазную активность (полифосфатдеполимераза, EC 3.6.1.10.) и расщепляют длинные цепи polyP на более короткие:



Ppn1 также проявляет экзополифосфатазную активность (полифосфатфосфогидролаза, EC 3.6.1.11) и отщепляет ортофосфат от конца цепи polyP:



Кроме того, Ppn1 отщепляет терминальный фосфат от нуклеозид-5'-тетрафосфата и дезоксинуклеозидтрифосфата [14]. Как Ppn1, так и Ppn2 способны отщеплять polyP от polyP-лизин-фосфорилированных белков [7]. Наличие этих активностей расширяет вовлечение данных полифосфатаз в регуляторные процессы. Ферменты Ppn1 и Ppn2 различаются по клеточной локализации: Ppn2 локализуется в вакуолярной мембране [13]; Ppn1 также локализуется в основном в вакуолях, но был обнаружен в цитоплазме при избытке фосфата [15] и, по-видимому, отвечает за экзополифосфатазную активность в митохондриальной мембране и ядре [16].

Эффекты нокаут-мутаций в генах *PPN1* и *PPN2* на метаболизм polyP различались в зависимости от стадии роста и условий культивирования. Увеличение уровня polyP и длины цепи наблюдали у мутанта  $\Delta ppn1$ , культивируемого в минимальной среде, содержащей 2% глюкозы, 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 7.35 мМ фосфата, микроэлементы, соли и витамины [11]. Уровень polyP увеличился в митохондриях и вакуолях мутанта  $\Delta ppn1$ , а длина цепи polyP увеличилась в митохондриях, вакуолях и цитоплазме при культивировании дрожжевых клеток в богатой комплексной среде YPD [16]. В тоже время, уровни polyP в мутантах  $\Delta ppn1$ ,  $\Delta ppn2$  и  $\Delta ppn1\Delta ppn2$  не изменились по сравнению с родительским штаммом в клетках, культивируемых в минимальной среде Sc [13]. Обе мутации привели к увеличению длины цепи polyP [7, 13]. Был сделан вывод, что полифосфатазы Ppn1 и Ppn2 вносят ключевой вклад в регуляцию содержания и длины цепи polyP в клетках *S. cerevisiae* [7, 13]. Кроме того, были обнаружены другие эффекты нокаута гена *PPN1*. Мутантный штамм  $\Delta ppn1$  имел пониженную жизнеспособность на стационарной стадии роста [11] и не мог расти на лактате и этаноле [17]. У двойного мутанта  $\Delta ppn1\Delta ppn2$  время репликации ДНК увеличилось вдвое [5]. Различия в генетических конструкциях мутантов и в условиях культивирования затрудняют сравнение литературных данных о влиянии нокаут-мутаций генов *PPN1* и *PPN2* на обмен polyP и другие физиологические свойства дрожжевых клеток.

Поэтому целью данной работы было изучение влияния нокаут мутаций  $\Delta ppn1$  и  $\Delta ppn2$  с использованием стандартных коммерческих мутантов *S. cerevisiae* на следующие физиологические свойства: (i) рост на средах, содержащих глюкозу и этанол, (ii) содержание и длину цепи различных фракций polyP, (iii) активность полифосфатазы в субклеточных фракциях, включая митохондрии, и (iiii) устойчивость к стрессам, вызванным перекисью и токсическими концентрациями марганца и кадмия.

## Материалы и методы

Штамм дикого типа (WT) *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) и мутантные штаммы, полученные из BY4741 (*Δppn1* и *Δppn2*), были получены из коллекции Dharmacon (<https://horizondiscovery.com/en/non-mammalian-research-tools/products/yeast-knockout>). Культуры дрожжей поддерживали на агаризованной среде YPD, содержащей 2% пептона (Pronadisa, Испания), 1% дрожжевого экстракта (Pronadisa, Испания), 2% глюкозы и 2% агара. Инокулят выращивался в жидкой среде YPD. Клетки для экспериментов культивировали в среде YPD и среде YPEt, содержащей 1% этанола вместо глюкозы. Инокулят вносили в среду до оптической плотности ~0,065. Штаммы культивировали при температуре 29°C на качалке в колбах с 200 мл среды и скоростью перемешивания 145 об/мин в случае среды YPD и в колбах с 50 мл и скоростью перемешивания 250 об/мин в случае среды YPEt. Для построения кривых роста штаммов через определенные промежутки времени отбирали аликвоты культур и измеряли поглощение при  $\lambda=600$  нм в кювете 3.07 мм на фотометре КФК-3 (ЗОМЗ, Россия). Биомассу собирали на стационарной стадии роста (24 ч для YPD и 60 ч для YPEt) центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g, трижды промывали холодной (4°C) дистиллированной водой, взвешивали, замораживали при -20°C и использовали для анализа polyP.

Пять фракций polyP (кислоторастворимая polyP1, солерастворимая polyP2, щелочерастворимые polyP3 и polyP4, кислотонерастворимая polyP5) экстрагировали согласно [18]. Фосфат (Pi) определяли колориметрическим методом [19]. Количество polyP нормировали по сырому весу образцов биомассы, стандартизированным центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин.

Активность экзополифосфатазы и эндополифосфатазы измеряли в бесклеточном экстракте и суммарной мембранной фракции. Дрожжевые клетки собирали и дважды промывали дистиллированной водой при 5000 g в течение 10 мин; сферопласты получали, как описано [14]. Сферопласты лизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера в 0.1 М сорбите, 25 мМ Трис-НСl, pH 7.2, дополненном 0.5 мМ фенолметилсульфонилфторида (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и центрифугировали при 15000 g в течение 60 мин. Супернатанты представляли собой бесклеточные экстракты. Осадки (грубая мембранная фракция) ресуспендировали в 25 мМ Трис-НСl, pH 7.2.

Активность экзополифосфатазы определяли при 30°C по скорости образования Pi, определяемого колориметрически [14]. Инкубационная среда содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 7.2, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 200 мМ NH<sub>4</sub>Cl и 2.5 мМ polyP со средней длиной цепи 208 фосфатных остатков (polyP<sub>208</sub>) (Monsanto, США). Количество фермента, образующего 1 мкмоль фосфата за 1 мин, принимали за единицу активности (Е). Активность эндополифосфатазы анализировали по уменьшению длины цепи polyP<sub>208</sub>. Инкубационная среда содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 7.2, 200 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 9 мМ (по фосфору) polyP<sub>208</sub> и образцы бесклеточного экстракта или грубой мембранной фракции. Время инкубации составило 30 мин при 30°. Реакцию останавливали добавлением HClO<sub>4</sub> до концентрации 0.5 М. Дальнейшую подготовку образцов и электрофорез в 30% ПААГ с 7 М мочевиной проводили, как описано [14].

БСА использовали в качестве стандарта для анализа белка с реагентом Брэдфорда (Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования согласно [20] с модификациями. Для получения митохондрий из клеток, выращенных на глюкозе, клетки выращивали в среде YPD в течение 24 ч. Для получения митохондрий из клеток, культивированных на этаноле, клетки предварительно выращивали в среде YPD (0.5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% глюкозы) в колбах с 200 мл среды на шейкере при 145 об/мин в течение 24 ч, осаждали, промывали водой и переносили в среду YPEth (0.5% дрожжевого экстракта, 1% пептона, 1% этанола) в колбах с 50 мл среды в количестве 0.5 г сырой биомассы на колбу. Культивирование проводили в течение 10 ч при 29°C и 250 об/мин. Сферопласты получали, как описано ранее [16]. В случае клеток, выращенных на глюкозе, сферопласты лизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвехьема в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 1 мМ PMSF, 1 мМ EDTA, 4 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.02% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% конканавалина А. После этого при перемешивании быстро добавляли равный объем того же буфера, но с 1.2 М сорбита. Гомогенат

центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Осадок гомогенизировали тefлоновым пестиком в 0.6 М сорбите с тем же буфером в течение 1 мин и центрифугировали при 2500 g в течение 10 мин. Митохондрии из супернатанта, полученного после второго низкоскоростного центрифугирования, осаждали при 10000 g в течение 10 мин.

В случае клеток, выращенных на этаноле, сферопласты разрушали в буфере, уже содержащем 0.6 М сорбита и без второго этапа гомогенизации.

Активность АТФазы определяли по скорости высвобождения Pi при 30 °C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 1 mM MgSO<sub>4</sub> и 1 mM АТФ в 50 mM Трис-НСl при pH 8.5 в присутствии и в отсутствие 5 mM NaN<sub>3</sub>. Pi определяли, как описано ранее [14].

Активность экзополифосфатазы определяли по скорости высвобождения Pi при 30 °C в течение 30 мин в 1 мл реакционной смеси, содержащей 2.5 mM MgSO<sub>4</sub> и 1 mM polyP<sub>188</sub> (Monsanto, США) в 50 mM Трис-НСl при pH 7.2.

Для выделения polyP препараты митохондрий обрабатывали при 0 °C 1 М НСlO<sub>4</sub> в течение 15 мин при перемешивании и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Содержание Pi и фосфор polyP после обработки 1 М НСl при 100 °C в течение 10 мин измеряли в супернатанте, как описано выше.

Для определения чувствительности к перекиси и ионам тяжелых металлов образцы клеток дрожжей, нормализованные по концентрации клеток ( $0.5 \cdot 10^7$  клеток/мл), добавляли в лунки стерильных планшетов, содержащих среду YPD и различные концентрации Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> или перекиси водорода, культивировали в течение 24 ч и измеряли оптическую плотность культуры при 594 нм с помощью фотометра ЭФОС (Сапфир, Россия). Исходную концентрацию клеток определяли с помощью подсчета в стандартной камере Горяева.

Эксперименты были повторены трижды, и результаты представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением (Excel). Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма wt с помощью t-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel. Эксперименты с электрофорезом были повторены дважды, и представлены типичные картины.

## Результаты

### 3.1. Рост на глюкозе и этаноле

Родительский штамм (wt) и мутантные штаммы культивировали в средах, содержащих 3 mM Pi. При культивировании штаммов *Δppn1* и *Δppn2* в среде YPD не наблюдалось дефектов роста (Рис. 1). Что касается культивирования в среде YPEth с 1% этанола, штаммы wt и *Δppn1* были схожи по росту, в то время как *Δppn2* имел более длинную лаг-фазу (Рис. 1).

### 3.2. Содержание и длина цепи polyP

Мы сравнили содержание polyP разных фракций в клетках штаммов wt и мутантных штаммов, выращенных на глюкозе и этаноле в клетках стационарной стадии (рис. 2А). Не было обнаружено статистически значимых различий в содержании polyP в разных фракциях между клетками wt и *Δppn1* при культивировании на средах, как содержащих глюкозу, так и этанол (рис. 2А). В клетках мутанта *Δppn2* содержание относительно короткоцепочечных polyP1 и polyP2 снижалось, в то время как содержание более длинноцепочечных polyP3 и polyP5 увеличивалось независимо от используемого источника углерода (рис. 2А). Мы также оценили длину цепи polyP фракций с наибольшим содержанием polyP методом электрофореза с использованием препаратов polyP, полученных из клеток, выращенных на глюкозе (рис. 2Б).

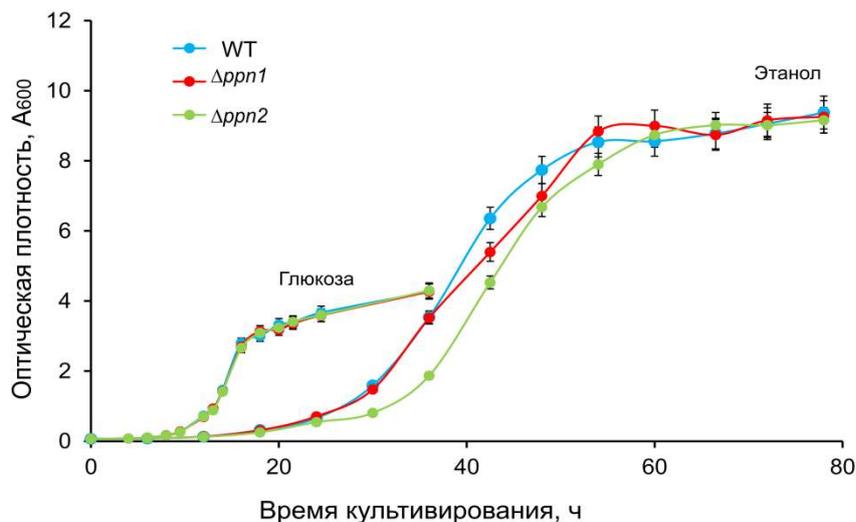


Рисунок 1. Кривые роста штаммов *S. cerevisiae* в средах YPD (глюкоза) и YPEth (этанол)

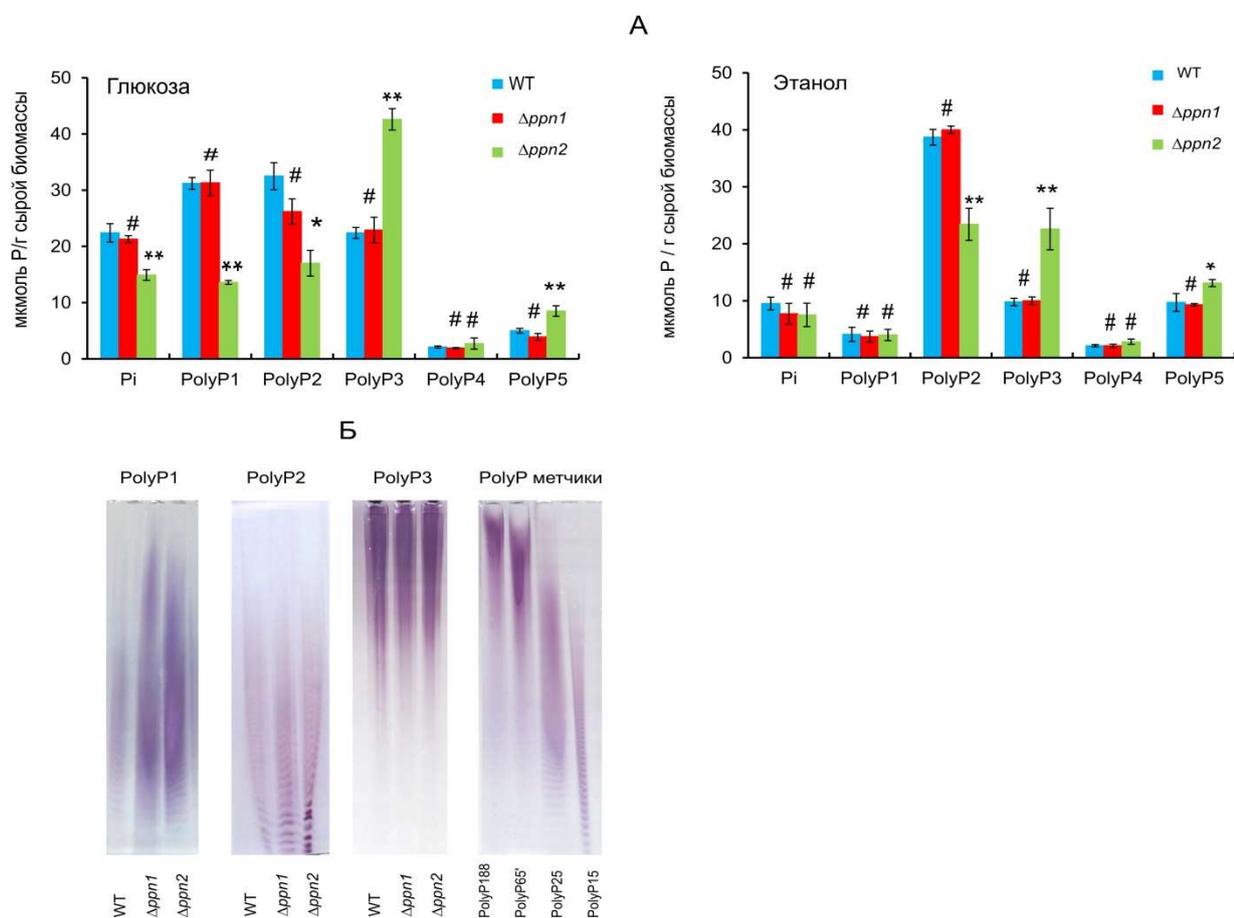


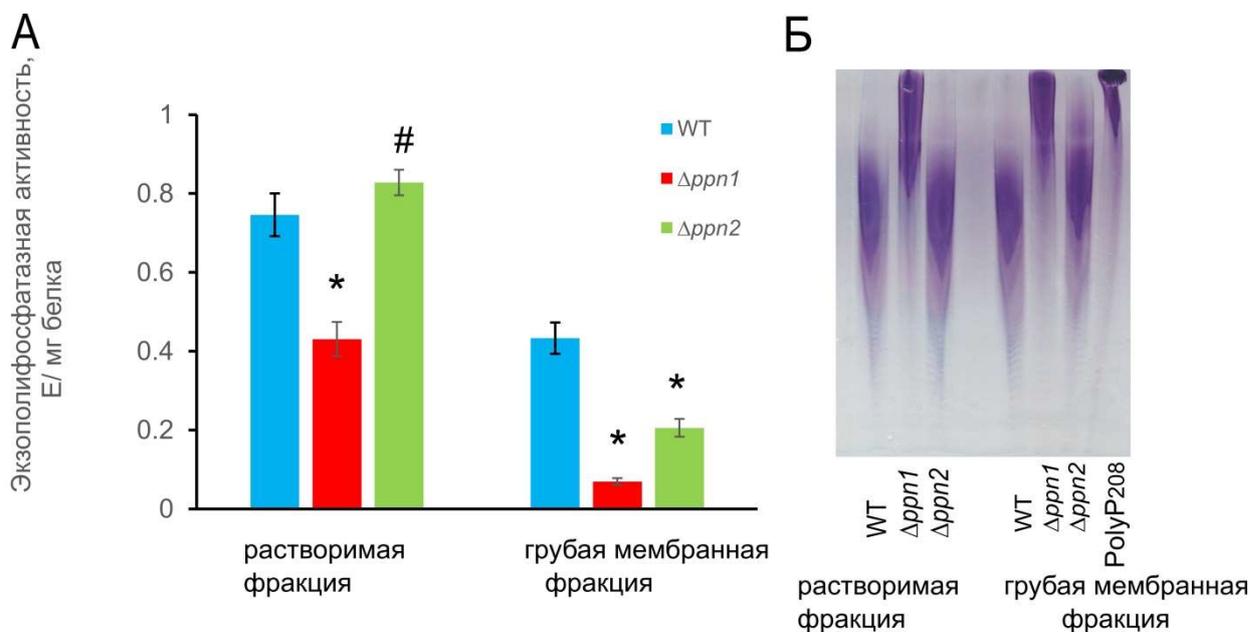
Рисунок 2. А - Содержание Pi и polyP различных фракций в клетках трех штаммов *S. cerevisiae*, выращенных до стационарной стадии роста на средах с глюкозой или этанолом. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма wt с помощью t-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ , #- разница статистически незначима.

Б – электрофореграмма препаратов фракций polyP1, polyP2 и polyP3, полученных из клеток, выращенных в среде с глюкозой, polyP<sub>15-188</sub> - препараты коммерческих полифосфатов со средними длинами цепи от 15 до 188 фосфатных остатков (Sigma-Aldrich, США).

Длины цепей polyP2 и polyP3 были схожи в препаратах, полученных из всех трех штаммов. Длина цепи polyP1 увеличилась как в случае штаммов  $\Delta prn1$ , так и  $\Delta prn2$ . Увеличение доли длинноцепочечных polyP было наиболее выражено в клетках штамма  $\Delta prn2$ .

### 3.3. Полифосфатазная активность в субклеточных фракциях

Мы сравнили полифосфатазные активности в препаратах растворимой фракции (бесклеточного экстракта) и грубой мембранной фракции для трех исследованных штаммов.



**Рисунок 3.** А - Экзополифосфатазные активности в растворимой и грубой мембранной фракциях с субстратом polyP<sub>208</sub>. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма wt с помощью t-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: \* p < 0.001, #- разница статистически незначима. Б - Эндополифосфатазная активность (электрофореграммы polyP<sub>208</sub> после инкубации с препаратами растворимой и грубой мембранной фракций. PolyP<sub>208</sub> - контрольная инкубация полифосфатов с длиной цепи около 208 фосфатных остатков без добавления исследуемых образцов

Как и ожидалось, в суммарной мембранной фракции мутанта  $\Delta prn1$  было значительное снижение как экзо-, так и эндополифосфатазной активности. В этой фракции мутанта  $\Delta prn2$  также было снижение эндополифосфатазной активности (рис. 3Б). Эти данные согласуются с информацией о преимущественной локализации Prn1 в вакуолярных и митохондриальных мембранах и в ядрах [13,16]. Неожиданно фракция бесклеточного экстракта, полученная из клеток штамма  $\Delta prn1$ , также продемонстрировала значительное снижение эндо- и экзополифосфатазной активности (Рис. 3А и Б). Этот факт предполагает значительный уровень Prn1 в цитоплазме штамма wt. Это, по-видимому, является характерной особенностью штамма ВУ4741. Обычно уровень Prn1 в цитоплазме низкий [15]. Метод получения бесклеточного экстракта [16], использованный в настоящей работе, не приводит к примесям клеточных органелл. Ранее значительное увеличение уровня Prn1 в цитоплазме наблюдалось у мутанта, лишённого полифосфатазы Prx1 [11], а также у дикого штамма *S. cerevisiae* в условиях сверхнакопления polyP [15] или при стрессе, нарушающем репликацию ДНК [21]. Что касается мутанта  $\Delta prn2$ , то как экзо-, так и эндополифосфатазная активность не изменялись в бесклеточном экстракте, но снижались в мембранной фракции (Рис. 3). Это согласуется с данными о локализации Prn2 в вакуолярной мембране [13]. Prn2 не проявляет существенной экзополифосфатазной активности *in vitro* [14]. По-видимому, сниженная способность высвобождать Pi из polyP в грубой мембранной фракции мутанта  $\Delta prn2$  обусловлена тем, что фрагментация polyP эндополифосфатазой Prn2 в той же фракции из штамма wt облегчает последующий гидролиз другими ферментами, например пирофосфатазами. Снижение активности полифосфатазы в обеих

субклеточных фракциях более выражено для мутанта *Δppn1* по сравнению с мутантом *Δppn2*. Это не согласуется с тем фактом, что увеличение содержания длинноцепочечных polyP более выражено в клетках штамма *Δppn2*. Отметим, что условия в клетке могут значительно отличаться от условий *in vitro*. Так, значение pH внутри вакуолей находится в кислом диапазоне, тогда как оптимальное значение pH для обеих полифосфатаз находится в нейтральном диапазоне. Кроме того, у дрожжевых клеток могут быть и другие, неизвестные в настоящее время пути регуляции гидролиза polyP полифосфатазами, часто локализованными вместе с polyP.

### 3.4. Полифосфатазная активность и polyP в митохондриях

Неспособность мутанта *Δppn1* CRN [11] расти на неферментируемых субстратах, таких как лактат и этанол, была обнаружена много лет назад [17]. Его митохондрии были дефектны по дыхательным функциям, не обладали экзополифосфатазной активностью и обладали удвоенным уровнем polyP в митохондриях [17]. Мутант *Δppn1*, использованный в этом исследовании, не имел дефектов роста при культивировании в среде с этанолом (Рис. 1). Чтобы понять различия между этими двумя мутантами *Δppn1* разного происхождения, мы получили препараты митохондрий из штаммов wt и *Δppn1*. АТФазная активность препаратов была высокочувствительна к специфическому ингибитору митохондриальной АТФазы NaN<sub>3</sub> (Таблица 1), что свидетельствует о достаточной чистоте препаратов от примесей вакуолей и цитоплазматических мембран. Как и в случае ранее изученной пары штаммов [17], активность полифосфатазы в митохондриальном препарате штамма *Δppn1* была незначительной (Таблица 1). Однако содержание polyP в мутантных митохондриях лишь слабо увеличивалось при росте на глюкозе (Таблица 2). Что касается препарата митохондрий из клеток, выращенных на этаноле, то и в штамме wt, и в штамме *Δppn1* наблюдали значительное снижение содержания polyP (Таблица 2), как и ранее наблюдали для клеток дикого типа [22]. Уровень polyP в клетках мутанта *Δppn1* снижался при культивировании на этаноле, несмотря на низкий уровень активности полифосфатазы. По-видимому, существуют иные способы регуляции уровня polyP в митохондриях, которые не реализованы в ранее использованном штамме CRN.

**Таблица 1.** АТФазная и полифосфатазная активности в препаратах митохондрий штаммов wt и *Δppn1* *S. cerevisiae*

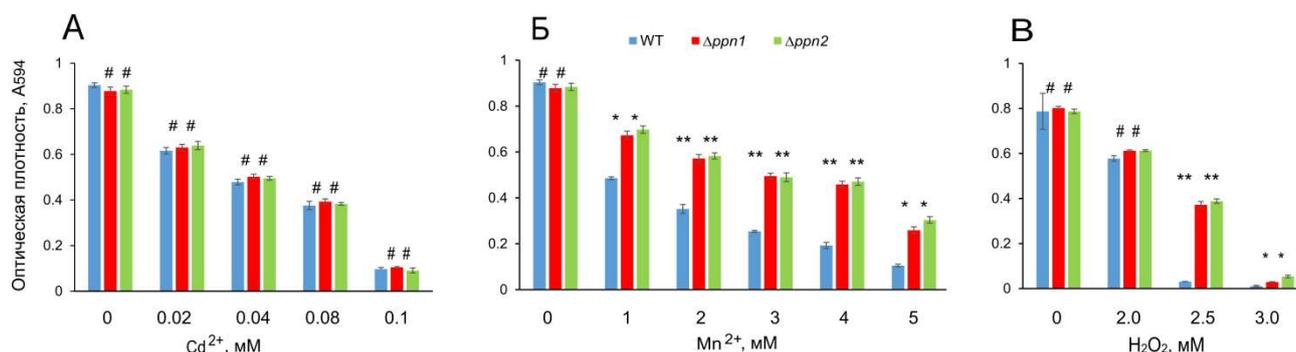
Штамм	АТФаза, Е/мг белка		АТРаза, активность в присутствии NaN <sub>3</sub> , % от контроля		Полифосфатаза, Е/мг белка	
	глюкоза	этанол	глюкоза	этанол	Глюкоза	этанол
wt	0.53 ±0.01	0.51±0.048	20	13	0.58 ±0.02	0.055 ±0.001
<i>Δppn1</i>	0.38 ±0.004	0.44 ±0.025	19	15	< 0.01	0.019 ±0.001

**Таблица 2.** Pi и polyP (мкмоль P/мг белка) в препаратах митохондрий, полученных их клеток штаммов wt and *Δppn1*.

Штамм	Pi		Кислоторастворимые polyP		Кислотонерастворимые polyP	
	глюкоза	этанол	глюкоза	этанол	глюкоза	этанол
wt	0.14 ±0.02	0.069 ±0.001	0.31 ±0.06	0.12 ±0.01	0.52 ±0.003	0.34 ±0.004
<i>Δppn1</i>	0.17 ±0.01	0.037 ±0.001	0.38 ±0.06	0.11 ±0.008	0.68 ±0.01	0.37 ±0.007

### 3.5. Устойчивость к стрессам

Поскольку polyP участвует в механизмах устойчивости к ионам тяжелых металлов [4] и перекиси [23], штаммы сравнивали по устойчивости к Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и перекиси. Устойчивость к Cd<sup>2+</sup> была одинаковой для всех протестированных штаммов (Рис. 4А).



**Рисунок 4.** Влияние  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и перекиси водорода на рост штаммов wt,  $\Delta ppn1$  и  $\Delta ppn2$  *S. cerevisiae*. Эксперименты проводили в четырех повторностях. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма wt с помощью t-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: \*\*  $p < 10^{-4}$ , \*  $p < 0,001$ , # - разница статистически незначима.

Оба штамма  $\Delta ppn1$  и  $\Delta ppn2$  продемонстрировали схожее увеличение устойчивости к  $\text{Mn}^{2+}$  (Рис. 4Б) и перекиси водорода (Рис. 4В). Мы полагаем, что эти изменения связаны с более высоким содержанием длинноцепочечных polyP.

## Обсуждение

В данной работе показано, что нокаут-мутации в генах *PPN1* и *PPN2* приводят к совокупности физиологических эффектов, наблюдаемых на стационарной стадии роста на глюкозе:

- Снижение активности полифосфатазы в субклеточных фракциях, содержащей мембранные структуры и органеллы, включая митохондриальную фракцию;
- Увеличение содержания высокомолекулярных polyP, что более выражено у нокаут-мутанта по гену *PPN2*;
- Повышение устойчивости к марганцевому и перекисному стрессу.

Можно предположить, что уровень polyP в нормальных условиях культивирования определяется в первую очередь их синтезом, который осуществляется комплексом VTC [24]. Полифосфатазы с эндополифосфатазной активностью, такие как Ppn1 и Ppn2, участвуют в уменьшении длины цепи polyP, что, вероятно, необходимо для распределения полученного polyP по органеллам и компартментам, таким как митохондрии, ядро и цитоплазма. Хотя многие авторы считают вакуоли основными компартментами, содержащими polyP в клетках дрожжей [13], было показано, что polyP присутствуют в ядре, цитоплазме и митохондриях [16]. Удлинение polyP у мутантов  $\Delta ppn1$  и  $\Delta ppn2$ , вероятно, влияет на различные клеточные процессы, включая регуляцию активности ферментов, а также способность связывать ионы токсичных металлов. Данные о влиянии этих мутаций на общее количество polyP в клетке неоднозначны. Так, в одной из публикаций сообщается, что содержание polyP увеличилось в клетках мутанта  $\Delta ppn1$ , но не  $\Delta ppn2$  [26], тогда как другие авторы [7] показали, что даже у мутанта  $\Delta ppn1ppn2ppx1ddp1$  общее содержание polyP мало отличалось от такового в клетках дикого типа [7]. В нашем случае суммарное содержание polyP у мутантов не отличалось от родительского штамма. Основной интерес представляет увеличение содержания длинноцепочечных polyP, которое отмечено как в настоящей работе, так и в работах других авторов [7, 26]. На данный момент не представляется возможным проследить прямую взаимосвязь между этим изменением и многочисленными плеiotропными эффектами мутаций  $\Delta ppn1$  и  $\Delta ppn2$ . Недавно выявлены новые эффекты этих мутаций: у обоих мутантов снижена репликативная продолжительность жизни [26], клетки мутанта  $\Delta ppn1\Delta ppn2$  *Candida albicans* характеризуются повышенной чувствительностью к стрессам и псевдогифальной морфологией [27]. Можно предполагать, что множественные эффекты этих мутаций могут быть связаны как с регулирующей ролью polyP, способных непосредственно взаимодействовать с определенными участками ДНК [9], так и со способностью Ppn1 и Ppn2 участвовать в отщеплении polyP от лизин-полифосфорилированных белков [7] или гидролизовать различные сигнальные молекулы [14].

Результаты данной работы показывают, что один из ранее обнаруженных нами эффектов мутации *Δppn1*, а именно дефект развития митохондрий и неспособность расти на неферментируемых источниках углерода [17] у мутанта CRN по гену *PPN1*, сконструированному Sethuraman и др. [11], не воспроизводится в использованном нами коммерчески доступном штамме *Δppn1*. Данные по определению полифосфатной активности свидетельствуют о том, что в данном штамме действительно отсутствует полифосфатаза Ppn1. Следовательно, наша предыдущая гипотеза о роли Ppn1 в регуляции уровня polyP и образовании митохондрий из промитохондрий [17] неверна, а дефекты функции митохондрий, наблюдаемые в мутантном штамме CRN не связаны с отсутствием Ppn1, а вероятнее всего объясняются повреждением других генов при конструировании штамма. Обратим внимание, что генотип родительского штамма BY4741 (*MATahis3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*) отличается от генотипа родительского штамма CRY (*MATade2 his3 leu2 trp1 ura3*), который был использован авторами [11] для конструирования мутанта CRN *Δppn1* (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1Δ::CgTRP1*).

Мутанты, лишённые полифосфатаз Ppn1 или Ppn2, показали как увеличение длины цепи polyP, так и увеличение устойчивости к марганцу и перекиси. Штамм со сверхэкспрессией Ppn1 также показал более высокую устойчивость к обоим типам стресса, в то время как штамм со сверхэкспрессией Ppn2 показал более высокую устойчивость к перекиси [25]. По-видимому, пути, ведущие к этому увеличению, различны при нокаут-мутациях и сверхэкспрессии этих генов. У нокаут-мутантов увеличение устойчивости к марганцу можно объяснить повышенным уровнем высокомолекулярных polyP и улучшенным связыванием этих ионов, тогда при сверхэкспрессии полифосфатаз, когда уровень высокомолекулярных polyP снижается, следует предполагать более сложные опосредованные пути, в том числе связанные с влиянием на уровень таких вторичных сигнальных молекул, как инозитополифосфаты, чей обмен тесно связан с обменом polyP [12].

### Вклад авторов

Трилисенко Л.В., Ледова Л.А., Рязанова Л.П., Кулаковская Е.В., Томашевский А.А. – выполнение и анализ экспериментов, Кулаковская Т.В. – написание рукописи. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Rao N. N., Gómez-García M. R. and Kornberg A. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Ann Rev Biochem.*, **78**, 605–647 (2009).
2. Kus F., Smolenski R. T. and Tomczyk M. Inorganic polyphosphate-regulator of cellular metabolism in homeostasis and disease. *Biomedicines*, **10** (4), 913 (2022). DOI: 10.3390/biomedicines10040913.
3. McCarthy L. and Downey M. The emerging landscape of eukaryotic polyphosphatases. *FEBS Lett.*, **597** (11), 1447–1461 (2023). DOI: 10.1002/1873-3468.14584.
4. Kulaev I. S., Vagabov V. M. and Kulakovskaya T. V. *The biochemistry of inorganic polyphosphates*, (New York USA, Wiley, 2004).
5. Bru S., Martínez-Lainez J. M., Hernández-Ortega S., Quandt E., Torres-Torronteras J., Martí R., Canadell D., Ariño J., Sharma S., Jiménez J. and Clotet J. Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.*, **101** (3), 367–380 (2016). DOI: 10.1111/mmi.13396.
6. Kalebina T. S., Egorov S. N., Arbatskii N. P., Bezsonov E. E., Gorkovskii A..A. and Kulaev I. S. The role of high-molecular-weight polyphosphates in activation of glucan transferase Bgl2p

- from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Dokl Biochem Biophys.*, **420**, 142–145 (2008). DOI: 10.1134/s1607672908030125.
7. Azevedo C., Desfougères Y., Jiramongkol Y., Partington H., Trakansuebkul S., Singh J., Steck N., Jessen H. J. and Saiardi A. Development of a yeast model to study the contribution of vacuolar polyphosphate metabolism to lysine polyphosphorylation. *J Biol Chem.*, **295** (6), 1439–1451 (2020). DOI: 10.1074/jbc.RA119.011680.
  8. McCarthy L., Bentley-DeSousa A., Denoncourt A., Tseng Y. C., Gabriel M. and Downey M. Proteins required for vacuolar function are targets of lysine polyphosphorylation in yeast. *FEBS Lett.*, **594** (1), 21–30 (2020). DOI: 10.1002/1873-3468.13588.
  9. Sanchez A. M., Garg A., Schwer B. and Shuman S. Inorganic polyphosphate abets silencing of a subtelomeric gene cluster in fission yeast. *Micro Publ Biol.*, **3**; (2023) DOI: 10.17912/micropub.biology.000744. DOI: 10.17912/micropub.biology.000744.
  10. Wurst H., Shiba T. and Kornberg A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.*, **177**: 898–906 (1995). DOI: 10.1128/jb.177.4.898-906.1995.
  11. Sethuraman A., Rao N. N., and Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** (15), 8542–8547 (2001). DOI: 10.1073/pnas.151269398.
  12. Lonetti A., Sziogyarto Z., Bosch D., Loss O., Azevedo C. and Saiardi A. Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases, *J Biol Chem.*, **286**, 31966–31974 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M111.266320.
  13. Gerasimaitė R. and Mayer A. Ppn2, a novel Zn<sup>2+</sup>-dependent polyphosphatase in the acidocalcisome-like yeast vacuole. *J Cell Sci.*, **130** (9), 1625–1636 (2017). DOI: 10.1242/jcs.201061.
  14. Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T. and Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddpl polyphosphatases. *Biochimie*, **163**, 101–107 (2019). DOI: 10.1016/j.biochi.2019.06.001.
  15. Andreeva N. A., Kulakovskaya T. V., and Kulaev I. S. High molecular mass exopolyphosphatase from the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the *PPN1* gene. *Biochemistry (Moscow)*, **71** (9), 975–977 (2006). DOI: 10.1134/s0006297906090045.
  16. Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N. and Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes. *Biosci Rep.*, **26** (1), 45–54 (2006). DOI: 10.1007/s10540-006-9003-2.
  17. Pestov N. A., Kulakovskaya T. V. and Kulaev I. S. Effects of inactivation of the *PPN1* gene on exopolyphosphatases, inorganic polyphosphates and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **5** (9), 823–828 (2005). DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.03.002.
  18. Vagabov V. M., Trilisenko L. V. and Kulaev I. S. Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 349–355 (2000).
  19. Heinonen J. K. and Lahti R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal Biochem.*, **113** (2), 313–317 (1981). DOI: 10.1016/0003-2697(81)90082-8.
  20. Zinzer E. and Daum G. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 493–536 (1995). DOI: 10.1002/yea.320110602.
  21. Tkach J. M., Yimit A., Lee A. Y., Riffle M., Costanzo M., Jaschob D., Hendry J. A., Ou J., Moffat J., Boone C., Davis T. N., Nislow C. and Brown G. W. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol.*, **14** (9), 966–976 (2012). DOI: 10.1038/ncb2549.
  22. Andreeva N. A., Kulakovskaya T. V., Kulakovskaya E. V. and Kulaev I. S. Polyphosphates and exopolyphosphatases in cytosol and mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose or ethanol under phosphate surplus. *Biochemistry (Moscow)*, **73** (1), 65–69 (2008). DOI: 10.1134/s0006297908010094.

- 
23. Culotta V. C. and Daly M. J. Manganese complexes: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast. *Antioxid Redox Sign*, **119** (9), 933–944 (2013). DOI: 10.1089/ars.2012.5093.
  24. Hothorn M., Neumann H., Lenherr E.D., Wehner M., Rybin V., Hassa P.O., Uttenweiler A., Reinhardt M., Schmidt A., Seiler J., Ladurner A. G., Herrmann C., Scheffzek K. and Mayer A. Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science*, **324** (5926), 513–516 (2009). DOI: 10.1126/science.1168120.
  25. Andreeva N., Ryazanova L., Ledova L., Trilisenko L. and Kulakovskaya T. Stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing yeast polyphosphatases. *Stresses*, **2**, 17–25 (2022). DOI: 10.3390/Stresses2010002.
  26. Umeda C., Nakajima T., Maruhashi T., Tanigawa M., Maeda T. and Mukai Y. Overexpression of polyphosphate polymerases and deletion of polyphosphate phosphatases shorten the replicative lifespan in yeast. *FEBS Lett.*, **597** (18), 2316–2333 (2023). DOI: 10.1002/1873-3468.
  27. Ahmed Y., Ikeh M. A. C., MacCallum D. M., Day A. M., Waldron K. and Quinn J. Blocking polyphosphate mobilization inhibits *pho4* activation and virulence in the pathogen *Candida albicans*. *mBio.*, **13** (3), e0034222 (2022). DOI: 10.1128/mbio.00342-22.



УДК 577.3

Статья

# Вязкость витрифицирующего раствора этиленгликоля в присутствии клатратообразующих газов Хе и Кг, измеренная методом динамического светорассеяния

Пеньков Н. В.<sup>1</sup>, Крассова Н.Е., Швирст Н.Э.<sup>1</sup>, Фесенко Е.Е. (мл.)<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН; admin@icb.psn.ru

\* Ответственный за переписку: eugeny.ef@gmail.com

## Цитирование:

Пеньков Н. В., Крассова Н.Е., Швирст Н.Э., Фесенко Е.Е. (мл.). Вязкость витрифицирующего раствора этиленгликоля в присутствии клатратообразующих газов Хе и Кг, измеренная методом динамического светорассеяния. *Biologia et Biotechnologia* 2024, 1, 5. <https://doi.org/10.61847/pbcgas.bbt.2024.1.5>.

Получено: 10.09.2004

Принято: 01.11.2024

Опубликовано: 07.11.2024

**Авторские права:** © 2024

год от авторов.

Представлено для публикации в открытом доступе на условиях открытой лицензии.

**Реферат:** Текущее состояние криобиологии характеризуется интенсивным развитием методов криоконсервации, основанных на витрификации (стекловании) водной фазы замораживаемого объекта. Одной из актуальных проблем является поиск путей снижения концентрации витрифицирующих агентов (криопротекторов), обеспечивающих стеклование, с целью минимизации токсического воздействия на замораживаемые клетки или ткани. В данной работе предложен новый экспериментальный подход, позволяющий повысить вязкость витрифицирующих растворов за счёт насыщения их инертными газами. В основе повышения вязкости лежит процесс гидратообразования, реализующийся при низких температурах и приводящий к переходу части воды в кристаллы газового гидрата. Снижение общего содержания воды в растворе приводит к концентрированию витрифицирующего агента и повышению вязкости. В работе экспериментально подтверждено увеличение вязкости 56,4 об.% водного раствора этиленгликоля, реализуемое в условиях повышенного давления Хе (9 атм.) и Кг (50 атм.) в диапазоне температур от -20 до -40°C. Для измерения вязкости под давлением при низких температурах впервые был адаптирован метод динамического светорассеяния.

**Ключевые слова:** криоконсервация; витрификация; витрифицирующий раствор, газовые гидраты; вязкость; ксенон; криптон; динамическое светорассеяние.

## Введение

Текущее состояние криобиологии характеризуется интенсивным развитием методов криоконсервации, основанных на витрификации (стекловании) водной фазы замораживаемого объекта. Охлаждение с высокими скоростями до температур стеклования позволяет свести к минимуму или полностью нивелировать основной повреждающий фактор, заключающийся в образовании кристаллов льда [1-3]. Поскольку скорость охлаждения макрообъектов лимитирована конечными значениями температуропроводности, для осуществления витрификации необходимо повышать вязкость среды, поскольку ее высокое значение замедляет процесс образования кристаллов [4-5]. Чем больше вязкость среды, тем медленнее можно охлаждать витрифицируемый объект. На практике для витрификации используют специальные растворы криопротекторов, повышающие вязкость среды, – витрифицирующие растворы. В качестве криопротекторов используют этиленгликоль, пропиленгликоль, ДМСО и др. Эти вещества или их композиции в используемых для витрификации высоких концентрациях, суммарно 8-9М, проявляют высокую токсичность [6,7]. Таким образом, для достижения эффективной витрификации необходимо повышать концентрацию криопротектора, в то время как для минимизации токсического эффекта концентрацию криопротекторов, наоборот, требуется снижать. Следует отметить, что токсичность криопротекторов при одной и той же концентрации, как правило, уменьшается с понижением температуры, поэтому насыщение объекта криопротектором стремятся проводить в несколько стадий с постепенным снижением температуры в интервале от +20°C – до -20°C и ступенчатым повышением концентрации. Понижение температуры насыщения замораживаемого объекта лимитировано как его холодовым повреждением, так и снижением диффузии криопротектора, что сказывается на эффективности его распределения в объеме объекта. Исходя из этого, актуальной представляется задача поиска способа снижения концентрации криопротектора в растворе при начальных температурах насыщения и повышения концентрации на более низких температурах с целью обеспечения требуемых значений вязкости.

Нами была выдвинута гипотеза [8], что достичь этого можно путём связывания части воды из раствора за счёт образования клатратных гидратов инертных газов, таких как ксенон, криптон и аргон. Для этого нужно охлаждать витрифицирующий раствор под внешним давлением гидратообразующих газов и при достижении соответствующих термобарических условий начнёт происходить образование газогидратов. В течение этого процесса будет снижаться концентрация воды в растворе и увеличиваться вязкость. Присутствие в растворе растворённых инертных газов, в отличие от подавляющего большинства других веществ, влияющих на вязкость, не оказывает токсического эффекта.

Каждому газу соответствуют определённые термобарические условия гидратообразования, причём эти условия надёжно установлены лишь для чистой воды и некоторых растворов [9-11]. Для водных растворов с высоким содержанием криопротекторов (витрифицирующие растворы) они неизвестны. Можно лишь утверждать, что образование гидратов будет происходить на температурах существенно более низких по сравнению с водой при одних и тех же давлениях газа.

Целями настоящей работы были (1) разработка методологии, обеспечивающей определение вязкости растворов под давлением при пониженных температурах в «реальном времени»; (2) оценка термобарических условий, при которых происходит образование газогидратов в растворах с высоким содержанием витрифицирующих агентов; (3) проверка гипотезы о повышении вязкости витрифицирующего раствора в условиях давления инертного газа.

## Материалы и методы

### *Реактивы и условия измерений*

Были проведены эксперименты по определению вязкости водного раствора одного из наиболее часто используемых криопротекторов – этиленгликоля (Sigma-Aldrich, США) под давлением криптона и ксенона («НИИ КМ», Россия, чистота не менее 4.0). Для экспериментов был выбран водный раствор с объёмным содержанием этиленгликоля 56,4 об.% (одна из стандартных концентраций, используемых для приготовления витрифицирующих растворов). Измерения проводились в температурном диапазоне от +20 до -40°C. Давление криптона в серии экспериментов составляло 50 атм., ксенона 9

атм. Контрольный эксперимент проводили без приложения давления.

#### *Метод измерения вязкости*

Для измерения вязкости был использован оптический метод динамического рассеяния света (DLS), который ранее был опробован для измерения вязкости воды, насыщенной углекислым газом [12].

Метод DLS изначально создавался для измерения размеров частиц в жидких средах, и суть его заключается в измерении корреляционной функции интенсивности рассеянного лазерного луча от среды, содержащей частицы. Поскольку частицы подвержены броуновскому движению, то возникают флуктуации их концентрации и, следовательно, флуктуации коэффициента преломления. Рассеянное на этих флуктуация излучение регистрируется под определённым углом и определяется временная корреляционная функция интенсивности. Временные корреляции полностью определяются коэффициентами диффузии частиц. Для монодисперсного распределения частиц корреляционная функция  $G(\tau)$  связана с коэффициентом диффузии следующим образом:

$$\sqrt{G(\tau) - b} = a \exp(-q^2 D \tau), \quad (1)$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\varphi}{2}\right),$$

где  $\tau$  – время задержки,  $a$  и  $b$  – экспериментальные константы,  $q$  – вектор рассеяния,  $D$  – коэффициент диффузии частиц,  $\lambda_0$  – длина волны лазерного излучения в вакууме,  $n$  – коэффициент преломления жидкой фазы,  $\varphi$  – угол рассеяния.

Таким образом, метод позволяет определить коэффициент диффузии частиц (в более общем случае распределение коэффициентов диффузии), а после этого на основании соотношения Стокса-Эйнштейна рассчитывается гидродинамический радиус частиц, в предположении их сферической формы:

$$R = kT / 6\pi\eta D \quad (2)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – динамическая вязкость. При этом, как следует из формулы (2), для корректного определения размера необходимо точное задание динамической вязкости  $\eta$ . Однако возможна постановка обратной задачи: использовать измеренные значения коэффициентов диффузии частиц известного размера для расчета вязкости среды по формуле:

$$\eta = kT / 6\pi R D \quad (3)$$

Поскольку метод DLS является бесконтактным, то можно в широких пределах температур и давлений производить измерения вязкости среды. Единственным условием является оптическая прозрачность рабочей камеры.

#### *Конструкция измерительной кюветы-барокамеры*

Нами была сконструирована кювета, схематично изображённая на рисунке 1А. Корпус кюветы изготовлен из бериллиевой бронзы. Оптическое окно изготовлено из лейкосапфира в форме цилиндрического кольца с внутренним диаметром 10 мм, внешним диаметром 30 мм и высотой 10 мм. Пространство внутри кольца составляет область, заполненную исследуемым раствором, в которую направлен лазерный луч. В кювету подаётся газ под давлением, которое измеряется манометром непосредственно перед кюветой с точностью 0,5 атм. Сверху в кювету вводится термopара, которая измеряет температуру жидкости с точностью 0,1 °C.

### *Подбор эталонных частиц для измерения вязкости методом DLS*

Как следует из формулы (3), для измерения вязкости методом DLS необходимо использовать частицы с известным радиусом  $R$ . Материал частиц сам по себе не имеет значения в контексте используемого метода, однако необходимо соблюдение ряда условий: 1 – распределение размеров частиц должно быть близким к мономодальному; 2 – частицы должны обладать агрегационной стабильностью в течение времени проведения эксперимента; 3 – размер частиц должен быть не очень велик – менее 10 микрометров (верхний предел применимости метода DLS) и в то же время не очень мал (более 50 нанометров) для обеспечения достаточной интенсивности рассеяния при небольших концентрациях частиц; 3 – частицы не должны обладать химической активностью к среде, в которой они диспергированы.

В работе использовали опытные наночастицы производства «Биовакс», Россия. Заявленный производителем средний радиус частиц составил  $52 \pm 2$  нм. Размер частиц, определённый нами с помощью метода DLS, составил  $53 \pm 2$  нм. Исходный образец, содержащий указанные частицы, представлял собой суспензию в воде. Для получения сильного сигнала рассеяния было достаточно добавить в исследуемый раствор 1 об.% суспензии. Данная добавка водной суспензии не оказывала влияния на вязкость исследуемого раствора.

### *Система охлаждения*

Охлаждение осуществлялось с помощью специально разработанной системы подачи испаряющегося азота в рубашку держателя кюветы. Схема системы охлаждения представлена на рисунке 1Б. В сосуд Дьюара, заполненный жидким азотом, введена трубка с нагревателем. Пространство между внешней стороной трубки и горловиной сосуда Дьюара герметизировано. После включения нагревателя происходило интенсивное испарение азота и выход его под давлением по трубке, которая соединена шлангом с рубашкой кюветы. Поток холодного азота регулировался напряжением, подаваемым на нагреватель. Существенной деталью системы охлаждения служило то, что азот из охлаждающей рубашки кюветы по трубке направлялся в кюветное отделение анализатора частиц для обдува оптической части кюветы. Это позволило предотвратить конденсацию воды на окнах кюветы и повысить эффективность охлаждения кюветы, сделав его более равномерным.

### *Измерение вязкости*

Измерение вязкости производили на анализаторе размеров частиц Photocor Complex («Photocor», Россия). Использовали лазер с длиной волны 451 нм, мощностью 25 мВт. Кювету устанавливали в кюветное отделение прибора. Лазерное излучение, рассеянное в образце, регистрировали лавинным фотодиодом под углом  $120^\circ$  к направлению падающего луча.

Измерение вязкости выполняли в процессе охлаждения исследуемого раствора. Скорость охлаждения составляла  $0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Время одного измерения вязкости составляло 2 мин. Таким образом, изменение температуры во время единичного процесса измерения вязкости не превышало  $1^\circ\text{C}$ . Эксперименты проводили в 10 повторностях.

Для контрольного раствора (56,4 об.% раствора этиленгликоля при температуре  $+20^\circ\text{C}$  без внешнего давления) было проведено сравнение значений вязкости, полученных методом DLS и измеренных с помощью синусоидального вибро-вискозиметра SV-10 (A&D Company Limited, Япония). Эксперимент проводили в 3 повторностях.

### *Статистическая обработка*

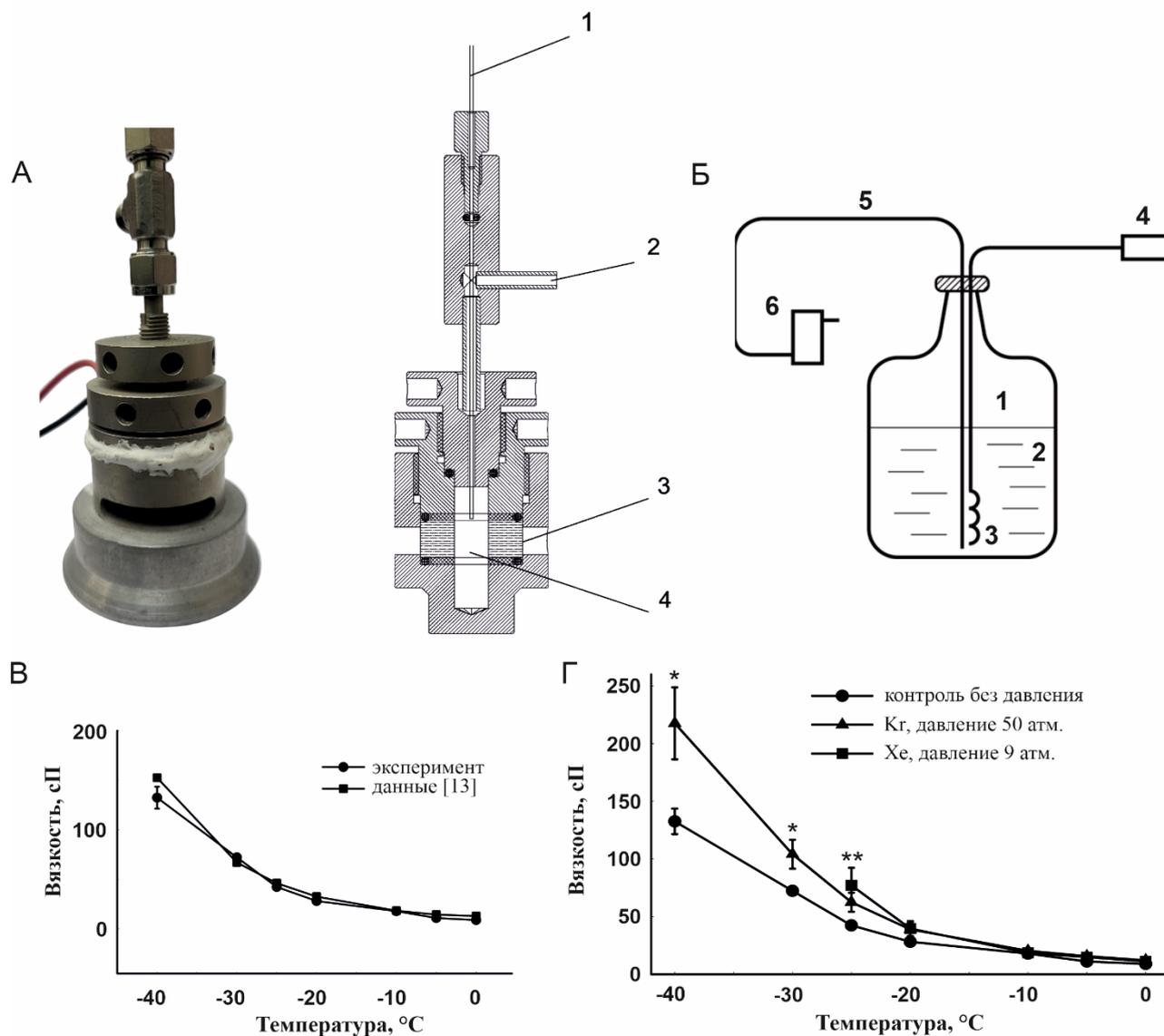
Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, США); данные выражали в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение. Значимость различий определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. Значения с  $p < 0.05$  считались статистически значимыми.

## **Результаты**

### *Проверка корректности измерения вязкости методом динамического светорассеяния*

Для проверки корректности применяемого метода определения вязкости был проведён эксперимент по измерению вязкости 56,4 об.% раствора этиленгликоля при температуре  $+20^\circ\text{C}$  без

внешнего давления методом DLS и с использованием синусоидального вибро-вискозиметра. Значение динамической вязкости, полученное обоими методами, составило  $4,8 \pm 0,2$  сП. Также было проведено сравнение измеренной нами температурной зависимости вязкости 56,4 об.% раствора этиленгликоля без подачи газов и аналогичной зависимости, приведенной в [13] (рис. 1В).



**Рисунок 1.** Динамическая вязкость водного раствора этиленгликоля 56,4 об.% под давлением ксенона и криптона. А – фотография и эскиз кюветы-барокамеры для измерения вязкости среды методом динамического светорассеяния под давлением и с контролем температуры: 1 – датчик температуры, 2 – подача газа, 3 – лейкосапфировое окно, 4 – исследуемый раствор; Б – схема системы охлаждения кюветы-барокамеры: 1 – сосуд Дьюара, 2 – жидкий азот, 3 – нагреватель, 4 – блок управления нагревателем, 5 – термоизолированный канал, 6 – рубашка охлаждения кюветы; В – зависимости вязкости водного раствора этиленгликоля 56,4 об.% от температуры без подачи газа, полученные экспериментально с помощью метода DLS (круг) и приведенные в работе [13] (квадрат). Г – экспериментальные значения динамической вязкости водного раствора этиленгликоля 56,4 об.% без давления (круг), под давлением 9 атм. ксенона (квадрат), под давлением 50 атм. криптона (треугольник). Данные представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=10$ . Различия достоверны (U-критерий) по отношению к группе «контроль без давления»: \* $p < 0.05$  для группы «Кг», \*\* $p < 0.05$  для группы «Хе».

### *Вязкость раствора этиленгликоля под давлением ксенона и криптона*

На рисунке 1Г представлены зависимости вязкости 56,4 об.% водного раствора этиленгликоля от температуры под давлением криптона и ксенона, а также контрольная зависимость без подачи газа. Минимальная температура, до которой удавалось измерять вязкость, – это температура, при которой начиналось активное кристаллообразование (предположительно массивное образование гидрата). При этом на пути лазерного луча появлялось большое количество крупных оптических неоднородностей, которые не позволяли далее использовать метод DLS. Поскольку кристаллообразование (образование газового гидрата либо льда) – процесс стохастический, в последовательности однотипных экспериментов оно реализовывалось при разных температурах в диапазоне от -25 до -40°C.

### **Обсуждение**

Точность метода измерения вязкости с помощью DLS оказалась не хуже стандартного вискозиметрического метода. Совпадение значений экспериментальных и литературных данных, представленное на рисунке 1В также свидетельствуют о точности определения вязкости данным методом. Преимуществом использования метода динамического светорассеяния для определения вязкости является его применимость в широких диапазонах температур и давлений. Отмечено его применение для определения вязкости растворов биологических макромолекул [14, 15].

Из представленных на рис. 1Г зависимостей следует, что при понижении температуры до -20°C и ниже вязкость растворов, находящихся под давлением, начинает превышать вязкость растворов без давления. По нашим представлениям, это объясняется начальной стадией процесса образования газогидратов, что приводит к снижению концентрации воды и, соответственно, увеличению концентрации этиленгликоля в растворе. В результате этого вязкость раствора увеличивается. Увеличение вязкости под давлением газов оказалось заметным – на 60% выше контроля при -40°C.

Для использования данного явления в криоконсервации важно оценить, насколько можно понизить концентрацию криопротектора под давлением газа для достижения вязкости такой же, как в контрольном растворе без газа. Концентрация этиленгликоля в растворе, вязкость которого без подачи газа соответствует вязкости 56,4 об.% под давлением газа в диапазоне температур -20 – -30°C составила 60 об.% Таким образом, разница вязкости криозащитного раствора без подачи газа и с подачей газа составила 3,6 об.%. Необходимо отметить, что рост вязкости с повышением концентрации ускоряется. Поэтому концентрация раствора этиленгликоля, при которой вязкость под давлением газов будет близка к вязкости раствора 56,4 об.% без давления, может быть уменьшена более чем на 3,6 об.%. По нашим оценкам можно уменьшить концентрацию на значение до 4,5 об.%. С точки зрения борьбы с токсичностью — это значимое уменьшение концентрации. Важно, что вязкость увеличивается при вымораживании воды в газогидрат за счёт увеличения концентрации криопротектора при низких температурах, поэтому данный эффект не должен приводить к повышению токсичности. Равно как и при повышении температуры будет происходить разложение гидрата, повышение содержания воды и разбавление токсического агента.

При исследовании влияния на вязкость витрифицирующих растворов инертных газов, мы ограничились рассмотрением ксенона и криптона. Подбор давлений осуществлялся из соображений обеспечения условий для образования гидрата на экспериментально достижимых температурах (выше -40°C). Однако при меньших давлениях можно добиться снижения температуры гидратообразования. Кроме ксенона и криптона, интерес может представлять аргон. Отличие его в том, что для образования гидратов необходимы либо существенно большие давления, либо существенно меньшие температуры. Интересной также представляется концепция использования смеси гидратообразующих газов.

Проведенное нами экспериментальное исследование позволяет акцентировать внимание на некоторых важных проблемах, которые требуют своего решения в контексте предложенного подхода к оптимизации методов витрификации. Так, например:

1. Может ли так случиться, что образующиеся кристаллы газогидратов станут нуклеаторами для кристаллов льда, что сделает невозможной витрификацию растворов? Есть основания полагать, что кристаллические структуры газогидратов и льда принципиально различны, следовательно, газогидрат не может служить нуклеатором льда и наоборот. Артюхов и коллеги [16] смоделировали поведение

водного раствора ксенона при различных температурах и давлениях. Симуляция показала, что в присутствии льда в водном растворе нуклеация кристаллов гидратов происходит не на границе вода/лед, а внутри толщ жидкой фазы. Аналогичным образом нуклеация кристаллов льда происходит независимо от газогидрата. Экспериментальным подтверждением этих симуляций являются результаты Нестерова [17], который зафиксировал устойчивое сосуществование кристаллов гидрата пропана и переохлажденной воды во время диссоциации газогидратов пропана. Если бы кристаллы гидрата пропана были эффективными нуклеаторами льда, их устойчивое сосуществование было бы невозможно.

2. Какое разрушительное действие окажут образующиеся кристаллы газогидратов? Предположительно, как и в случае с кристаллами льда, основным фактором, влияющим на целостность замораживаемого объекта, будет размер этих кристаллов. Согласно некоторым оценкам, этот размер не должен превышать 300–400 нм [18]. Теоретически, при образовании газогидратов появляется больше возможностей влиять на формирование кристаллов, в частности, на их размер, чем при образовании кристаллов льда. К традиционному выбору температурного режима следует добавить давление, соотношение количества воды и газа, использование газовых смесей и другие факторы. При выборе условий витрификации необходимо избегать кристаллообразования (предположительно массового образования гидратов), подобного тому, что фиксировалось на терминальных стадиях охлаждения в наших экспериментах.
3. В данной работе мы рассмотрели вопрос о повышении вязкости раствора криопротектора из-за образования газогидратов. Скорости охлаждения были выбраны низкими (0.5°C/мин), чтобы обеспечить надежное измерение вязкости и продемонстрировать эффекты, которые могут быть использованы для витрификации. При непосредственной реализации процедуры витрификации, очевидно, скорости охлаждения должны быть выше, что позволит процессу формирования кристаллов сместиться в область более низких температур и дополнительно снизить концентрацию криопротектора. Таким образом, вопрос выбора оптимальных скоростей охлаждения, начальных концентраций криопротекторов и самих криопротекторов остается открытым.

Экспериментально обоснованный ответ на эти вопросы является предметом дальнейших исследований.

### **Заключение**

Экспериментально показано увеличение вязкости 56,4 об.% раствора этиленгликоля при действии повышенного давления Хе и Кг. Обоснованы подходы к использованию этого эффекта при разработке методов криоконсервации, основанных на витрификации. Разработан метод регистрации вязкости криозащитных растворов в режиме «реального времени», основанный на динамическом рассеянии света.

### **Финансирование**

Работа выполнена в рамках реализации государственного задания Министерства образования и науки РФ №075-00609-24-01.

### **Благодарности**

Подготовка данной публикации была омрачена смертью нашего соавтора, талантливого инженера Николая Эдуардовича Швирста. Посвящаем эту работу его памяти.

Выражаем искреннюю благодарность сотруднику ИТЭБ РАН Крамаровой Л.И. за помощь при подготовке статьи.

Работа выполнена на оборудовании Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

### Список литературы

1. Stiles W. On the cause of cold death of plants, *Protoplasma* 9, 459–468, (1930). DOI:10.1007/BF01943364
2. Luyet B. The vitrification of organic colloids and of protoplasm, *Biodynamica* 1, 1–14, (1937)
3. Fahy G.M., Wowk B. Principles of Cryopreservation by Vitrification, in: *Methods Molecular Biology: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Ed. by W.F. Wolkers & H. Oldenhof (UK, Humana Press, 2015) pp.305-320
4. Gonzales F., Luyet B. Resumption of heart beat in chick embryo frozen in liquid nitrogen, *Biodynamica* 7, 1–5, (1950)
5. Fahy G.M., Hirsh A. Prospects for organ preservation by vitrification, in: *Organ preservation, basic and applied aspects*, Ed. by D.E. Pegg, I.A. Jacobsen, N.A. Halasz (Lancaster, MTP Press, 1982) pp. 399–404.
6. Davidson A.F., Glasscock C., McClanahan D.R., Benson J.D., Higgins A.Z. Toxicity Minimized Cryoprotectant Addition and Removal Procedures for Adherent Endothelial Cells, *Plos One* 10, e0142828, (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0142828
7. Best B.P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions, *Rejuvenation Res* 18, 422-436, (2015). DOI: 10.1089/rej.2014.1656
8. Shishova N. V., Fesenko E. E. (Jr). The Prospects of the Application of Gases and Gas Hydrates in Cryopreservation, *Biophysics* 60, 782–804, (2015). DOI:10.1134/S0006350915050218
9. Istomin V.A., Yakushev V.S. Gas Hydrates at Natural Conditions, (Nedra, Moscow, 1992 (in Russian)).
10. Dyadin Yu.A., Larionov E.G., Mirinskij D.S., Mikina T.V., Aladko E. Ya, Starostina L.I. Phase Diagram of the Xe–H<sub>2</sub>O System up to 15 kbar, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 28, 271–285, (1997). DOI:10.1023/A:1007911123739
11. Ohgaki K., Sugahara T., Suzuki M., Jindai H. Phase behavior of xenon hydrate system, *Fluid Phase Equilibria* 175, 1–6, (2000). DOI:10.1016/S0378-3812(00)00374-5
12. Uchida T., Ohmura R., Nagao J., Takeya S., Ebinuma T., Narita H. Viscosity of Aqueous CO<sub>2</sub> Solutions Measured by Dynamic Light Scattering, *J. Chem. Eng. Data* 48, 1225-1229, (2003). DOI: 10.1021/je034041x
13. Ethylene Glycol Product Guide. Доступен по ссылке: [https://www.meglobal.biz/wp-content/uploads/2024/03/MEG\\_Guide\\_Rev\\_2024\\_W2.pdf](https://www.meglobal.biz/wp-content/uploads/2024/03/MEG_Guide_Rev_2024_W2.pdf) (дата посещения: 07.07.2024).
14. He F., Becker G.W., Litowski J.R., Narhi L.O., Brems D.N., Razinkov V.I. High-throughput dynamic light scattering method for measuring viscosity of concentrated protein solutions. *Anal Biochem.* Apr 1;399(1),141-3, (2010). DOI: 10.1016/j.ab.2009.12.003
15. Gilroy EL, Hicks MR, Smith DJ, Rodger A. Viscosity of aqueous DNA solutions determined using dynamic light scattering. *Analyst.* Oct 21;136(20),4159-63, (2011). DOI: 10.1039/c1an15475c
16. Artyukhov V. I., Pulver A. Y., Peregudov A., Artyuhov I. Can xenon in water inhibit ice growth? Molecular dynamics of phase transitions in water-Xe system, *J. Chem. Phys.* 141, 034503, (2014). DOI: 10.1063/1.4887069
17. Нестеров А.Н. Кинетика и механизм гидратообразования газов в присутствии поверхностно-активных веществ. Дисс. на соискание доктора химических наук (Институт криосферы Земли СО РАН, Тюмень, 2006).
18. Takahashi T., Hirsh A., Erbe E., Williams R.J. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes, *Biophys. J.* 54, 509–518, (1988). DOI: 10.1016/S0006-3495(88)82983-7.