

УДК 635:656.632

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ УСТАРЕВШИМИ ПЕСТИЦИДАМИ ПОЧВ В *IN SITU* УСЛОВИЯХ

Доолоткелдиева Тинатин Доолоткелдиевна (ORCID 0000-0002-1633-6217)¹,
Конурбаева Махабат Уларбековна²,
Бобушева Сайкал Токтосуновна (ORCID 0000-0002-5823-0541)²

¹Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, Бишкек, Кыргызстан

²Кыргызско-Турецкий университет «Манас», Бишкек, Кыргызстан

E-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

Аннотация. В статье приведены результаты полевого испытания технологии био- и фиторемедиации на загрязненном устаревшими пестицидами участке (село Чым Коргон, Чуйская область, КР, N 42049'23,9", E 75031'49,8" и высотой 974 м над уровнем моря). Для эффективного выполнения биоаугментации и биоремедиации 19 типов пестицидов, обнаруженных вокруг склада, использовались ферментированные продукты на основе трех активных бактерий. Эти бактерии - *Stenotrophomonas* sp. (штамм Ps-B), *L. fusiformis* (штамм SA-4) и *E. cloacae* (штамм SB-2), которые содержат ген P450 отвечающий за активность ферментов цитохрома. Данный биопродукт разлагал 19 типов пестицидов в концентрации от 4 до 15 мг на кг почвы в течение шести месяцев до 99,0 ± 0,05% (P < 0,05). Хроматографические анализы подтвердили эффективность применения фиторемедиации после микробиологической ремедиации, так как за 5-6 месяцев вегетационного периода растения смогли удалить оставшиеся концентрации в почве пестицидов.

Ключевые слова: загрязнение почвы пестицидами, микробиологическая ремедиация, фиторемедиация

ЭСКИРГЕН ПЕСТИЦИДДЕР МЕНЕН БУЛГАНГАН КЫРТЫШТАРДЫ ЖЕРИНДЕ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫК ЖАНА ФИТОРЕМЕДИАЦИЯЛОО

Дөөлөткелдиева Тинатин Дөөлөткелдиевна (ORCID 0000-0002-1633-6217)¹,
Конурбаева Махабат Уларбековна²,
Бобушева Сайкал Токтосуновна (ORCID 0000-0002-5823-0541)²

¹К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети, Бишкек, Кыргызстан

²Кыргыз-Түрк «Манас» университети, Бишкек, Кыргызстан

E-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

Аннотация. Макалада эскирген пестициддер менен булганган участкакто (Чүй району, Чым Коргон айылы, КР, N 42049'23,9", жана E 75031'49,8" жана деңиз деңгээлинен 974 м бийиктикте) био жана фиторемедиация технологиясын талаа сыноосунун жыйынтыгы берилген. Кампанын айланасынан табылган пестициддердин 19 түрүн биоаугментациялоо жана биоремедиациялоону эффективдүү жүргүзүү үчүн үч активдүү бактериянын негизинде ферменттелген биопродукт колдонулган. Бул бактериялар *Stenotrophomonas* sp. (Ps-B штаммы), *L. fusiformis* (SA-4 штаммы) жана *E. cloacae* (SB-2 штаммы), аларда цитохром ферменттеринин активдүүлүгү үчүн жооптуу P450 гени бар. Бул биопродукт алты ай бою топурактын 1 кг да 4 мг дан 15 мг га чейинки концентрацияда кармалган пестициддердин 19 түрүн 99,0 ± 0,05% (P < 0,05) чейин ыдыратып ажырткан. Хроматографиялык анализдер микробиологиялык ремедиациядан кийин фиторемедиацияны колдонуунун эффективдүүлүгүн ырастады, анткени вегетация мезгилинин 5-6 айынын ичинде өсүмдүктөр топурактагы пестициддердин калган концентрациясын тазалай алышкан.

Өзөктүү сөздөр: топурактын пестициддер менен булганышы, микробиологиялык ремедиация, фиторемедиация

MICROBIOLOGICAL AND PHYTOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH OBSOLETE PESTICIDES *IN SITU* CONDITIONS

Doolotkeldieva Tinatin Doolotkeldievna (ORCID 0000-0002-1633-6217)¹,
Konurbaeva Mahabat Ularbekovna²,
Bobusheva Saykal Toktosunovna (ORCID 0000-0002-5823-0541)²

¹Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Kyrgyzstan

²Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

E-mail: tdoolotkeldieva@gmail.com

Abstract. The article presents the results of a field trial of bio- and phytoremediation technology at a site contaminated with obsolete pesticides (Chym Korgon village, Chui region, KR, N 42049'23.9", E 75031'49.8" and an altitude of 974 m above sea level). Fermented products based on three active bacteria were used to effectively perform bioaugmentation and bioremediation of 19 types of pesticides found around the warehouse. These bacteria are *Stenotrophomonas* sp. (strain Ps-B), *L. fusiformis* (strain SA-4) and *E. cloacae* (strain SB-2), which contain the P450 gene responsible for the activity of cytochrome enzymes. This bioproduct decomposed 19 types of pesticides at a concentration of 4 to 15 mg per kg of soil for six months to 99.0 ± 0.05% (P < 0.05). Chromatographic analyses confirmed the effectiveness of phytoremediation after microbiological remediation, as within 5-6 months of the growing season, plants could remove the remaining concentrations of pesticides in the soil.

Keywords: soil pollution by pesticides, microbiological remediation, phytoremediation

Введение

Плодородие и деградация почв являются основными проблемами в Кыргызстане, вызванными засолением, загрязнением, опустыниванием, заболоченностью, каменистостью и эрозией. Деградация почвы обычно снижает урожайность сельскохозяйственных культур на 20-60%. В каждом регионе Кыргызстана имеются бывшие склады и свалки устаревших пестицидов. В настоящее время существует 50 хранилищ устаревших запрещенных пестицидов, которые серьезно угрожают населению и окружающей среде. Загрязнение пестицидами может напрямую влиять на состав и функциональность почв, поскольку оно уничтожает полезные микробы, снижает содержание органических веществ в почве и вызывает дисбаланс питательных веществ, что ставит под угрозу продовольственную безопасность. Они вредны для здоровья человека и являются известными канцерогенами, мутагенами и тератогенами [1-2]. Хлорорганические пестициды липофильны и устойчивы к разложению в окружающей среде, поэтому они имеют тенденцию к биоаккумуляции в тканях живых организмов и остаются в трофических связях экосистемы в течение длительного периода [3-6].

Для удаления загрязнения пестицидами используются различные технологии и подходы; среди них физическая и химическая обработка считаются более дорогими и оказывают вредные побочные эффекты на окружающую среду, где они используются [7]. Для удаления остаточных пестицидов и восстановления загрязненных экосистем необходимо использовать эффективные, экономически выгодные и экологически чистые методы.

Одним из таких методов является микробная ремедиация, которая использует метаболизм определенных групп микроорганизмов, использующих пестициды в качестве питательных веществ для своих метаболических реакций и полностью минерализующих пестициды или превращающих их в продукты разложения [8-9]. Ферменты, вырабатываемые микроорганизмами, такие как гидролазы, пероксидазы и оксигеназы, играют ведущую роль в механизмах, используемых для биотрансформации пестицидов [10-11]. Уникальную роль играет цитохром P450, который разлагает ксенобиотики с помощью методов химической трансформации, таких как дегалогенирование, эпоксидирование, деалкилирование и алифатическое гидроксидирование [12].

Целью исследования явилось проведение микробиологической ремедиации (биоаугментации) в полевых условиях на загрязненном пестицидами участке с использованием селективированных ассоциаций бактерий с геном P450, с процедурами улучшения параметров почвы (рН, влажность, аэрация и доступность питательных веществ).

Материалы и методы исследования

Селективированные штаммы бактерий, использованные для биоаугментации загрязненной почвы пестицидами в полевых условиях. Штаммы бактерий были выделены из загрязненных почв (хвостохранилища: Сузак А, Сузак Б и Балыкчи) и были селективированы за деградирующую активность в лабораторных тест экспериментах. Через проводимые последовательные скрининги следующие виды бактерий были отобраны для использования в полевых условиях: *Stenotrophomonas sp.*, *Ps-B*; *Lysinibacillus fusiformis*, SA-4; *Enterobacter cloacae*, SB-2.

Молекулярные анализы доказали наличие в их геноме P450 фермента, ответственного за биотрансформации пестицидов (Рис.1)

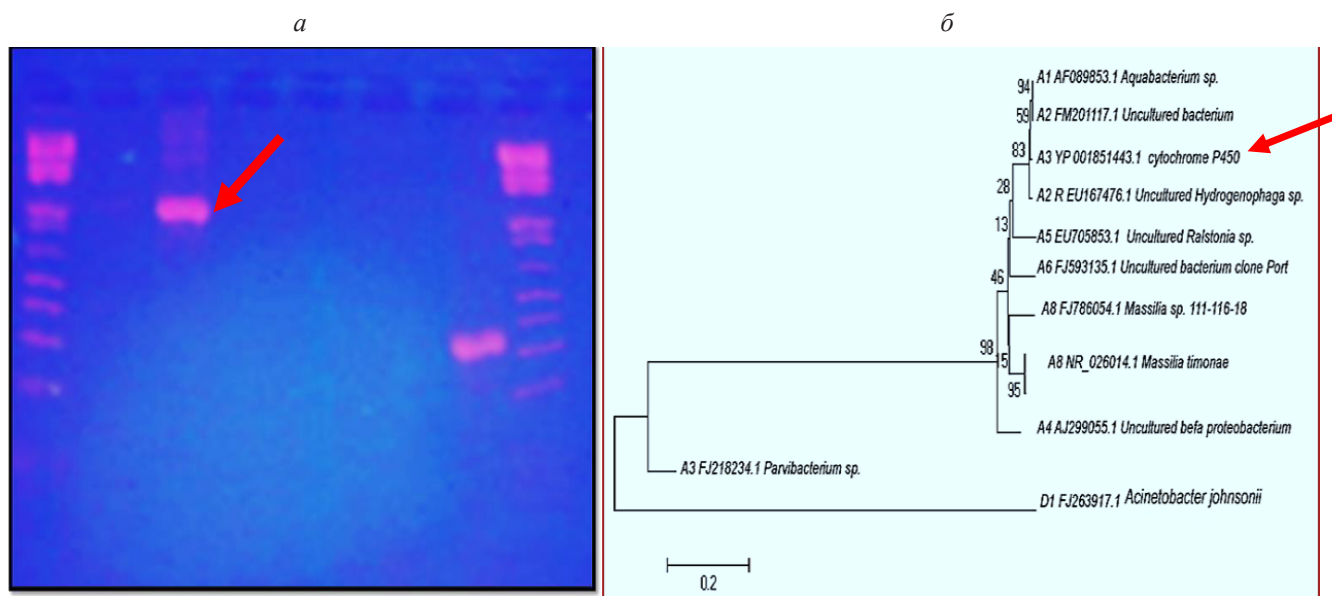


Рис. 1. Электрофоретический профиль гена P450 (а) и филогенетическое дерево бактерий с P450 геном (б)

Полевой экспериментальный дизайн. Полевой участок представлял собой бывшую свалку, которая использовалась во время дозаправки самолетов и распыления пестицидов с воздуха, а также в качестве склада пестицидов. Он расположен в селе Чым-Коргон, N 42049'23,9" и E 75031'49,8" и высотой 974 м над уровнем моря (Рис.2).

Сильно деградированный участок был вспахан на глубину 10–30 см с помощью трактора для создания подходящих агрохимических условий для биоаугментации и активации местной микрофлоры.

Опытный участок был разделен на три части:

Участок с сильным загрязнением, с внесением плодородной почвы и биопрепарата (14 × 15 м²).

Контрольный участок 1 с плодородной почвой и без внесения биопрепарата (25 × 2 м²).

Контрольный участок 2 без плодородной почвы и без внесения биопрепаратов (10 × 10 м²).

Для достижения средней влагоемкости загрязненной почвы на площадь 280 м² было внесено 18 000 кг плодородной почвы.

Полив осуществляли вечером каждые два дня (трижды в неделю, поскольку средняя температура воздуха составляла 29–32 °С, перемешивая слой почвы).



Рис. 2. Общий вид загрязненного пестицидами участка, где были захоронены устаревшие и запрещенные к использованию инсектициды и проведена биоремедиация для очистки территории (2021-2023)

Дизайн исследования. Биопродукт наносили непосредственно на загрязненную почву. Для биоаугментации использовали три вида бактерий: *Stenotropomonas sp.* (штамм Ps-B), *L. fusiformis* (штамм SA-4) и *E. cloacae* (штамм SB-2). За шесть месяцев биопрепарат применялся девять раз, а пробы для хроматографического и микробиологического анализа собирались до и после каждой обработки. Перед применением биопродукта контролировались условия биоремедиации, такие как влажность (60–75%), температура (26–27 °С) и pH (7,4–7,62) почвы.

Получение биопродукта, используемого в биоремедиации. Бактериальные штаммы культивировали отдельно в биореакторе (LAMBDA Laboratory Instruments, Чехия, 7L) методом погруженного культивирования. Полученные бактериальные суспензии смешивали для получения единого биопродукта, который затем вносили в почву.

Полевые опыты по фиторемедиации. Для проведения фиторемедиации различные виды семян с/х культур: пшеницы, кукурузы, фасоли, свеклы, ячмень, овсяницы и тыквы были использованы в эксперименте. Перед посадкой семена замачивали в суспензии биоудобрения РОСТИН в течение 2 часов. В конце апреля 2022 года обработанные семена были высеяны в почву отведенных опытных площадей.

В течение вегетационного периода у растений изучали ризосферную микрофлору и проводили хроматографический анализ частей растений для определения содержания пестицидов. Эти наблюдения проводились в фазы – в начале кущения и колошения. В каждой точке было собрано по семь растений, в результате примерно 20–25 растений с каждого участка. Корни, стебли отбирали раздельно. Каждый образец был упакован отдельно и высушен при низких температурах в лаборатории. Средний образец измельчали и отправляли на хроматографический анализ.

Краткое описание биоудобрения Ростин. Основой этого биоудобрения является культура почвенных бактерий (*Streptomyces fumanus*). Продукт оказывает ростстимулирующее и антагонистическое действие в отношении фитопатогенных грибов и может сохраняться в грунте очень длительное время. Исследования показали, что его метаболиты оказывают жизнеобеспечивающее действие на почвенные микроорганизмы, особенно на азотфиксирующие бактерии и аммонификаторы [13].

Метод статистического анализа. Для сравнения средних значений были проведен однофакторный дисперсионный анализ и множественные сравнения на уровне вероятности 0.05. Статистический анализ был выполнен с использованием Statistica 10 (StatSoft). Изменчивость характеристик определялась путем расчета стандартного отклонения выборки и коэффициента вариации 3.

Результаты исследования

Состояние почвы и местная почвенная микрофлора до внесения биопрепарата и через 10 дней после первого внесения биопрепарата. Представленная микрофлора почвы до биоремедиации была бедной, состоящей всего из двух видов спорообразующих бактерий родов *Bacillus* and *Streptomyces*.

Микробиологический анализ после внесения плодородной почвы и внесения биопрепарата показал существенное изменение видового состава биоразнообразия в течение десяти дней, а также увеличение количества колониеобразующих единиц в 1 г почвы, рН почвы достигал $7,2 \pm 0,79$ (Рис.3).

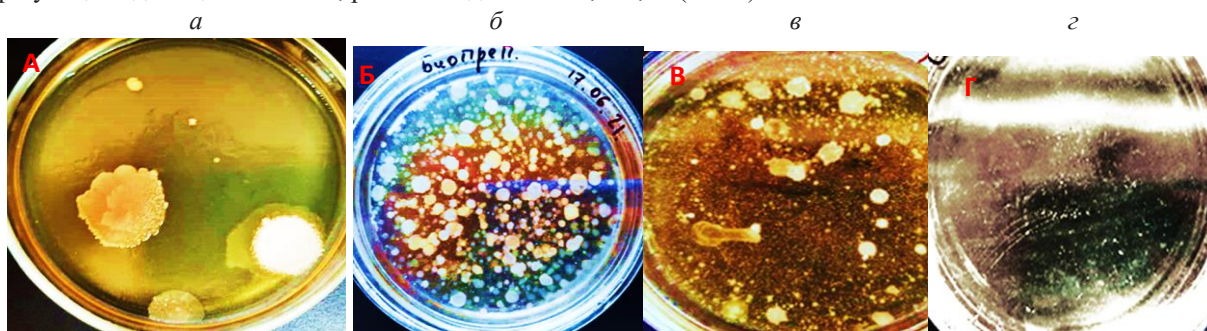


Рис. 3. а - местная микрофлора перед применением биопрепарата; б - микрофлора через 10 дней после внесения плодородной почвы и биопрепарата; в - микрофлора через 10 дней после внесения плодородной почвы, без биопрепарата; з - почва контрольного участка

Количество бактерий на опытных делянках через 10 дней после первой обработки биопрепаратом представлено в диаграмме, их количество измерялось с подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) в г/ почвы; значения показаны как среднее \pm SD, $n = 3$ и $P \leq 0,05$ (рис. 4).

Как показал микробиологический анализ, внесение плодородной почвы создало благоприятные условия для роста местной микрофлоры и бактерий, что привело к их повышенной выживаемости. Контрольная почва, которая получила только плодородную почву (без биопродукта), показала почти половину количества КОЕ по сравнению с почвой, которая получила и плодородную почву, и биопродукт. В контрольной почве, которая не получила ни плодородной почвы, ни биопродукта, были обнаружены только единичные колонии местной микрофлоры. Содержание бактерий на участке, который получил биопродукт, было в два раза выше, чем на участке, который получил только плодородную почву, и в 12 раз выше, чем на контрольной почве, которая не получила ни плодородной почвы, ни биопродукта с аэрацией.

Почвенные бактерии на опытных участках после 3 и 6 месяцев применения биопрепарата. ПЦР-анализ гена 16SrRNA почвенных бактерий через три и шесть месяцев применения биопрепарата выявил наличие бактериального сообщества, основанного на интродуцированных видах биопрепарата (*L. fusiformis*, *E. cloacae* и *Stenotrophomonas* sp.) и более богатой местной микрофлоры, представленной бактериями родов *Delfia*, *Alcaligenes*, *Lysinibacillus*, *Bacterium*, *Bacillus* и *Stenotrophomonas* (Рис. 5).

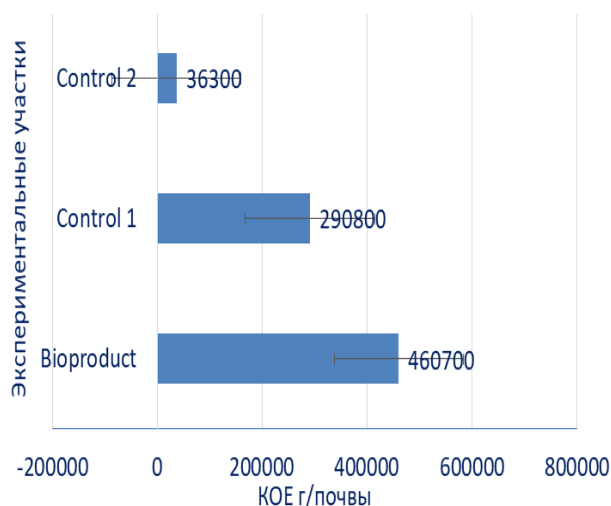


Рис. 4. Количество бактерий на опытных делянках через 10 дней после первой обработки биопрепаратом в 1 г сухой почвы

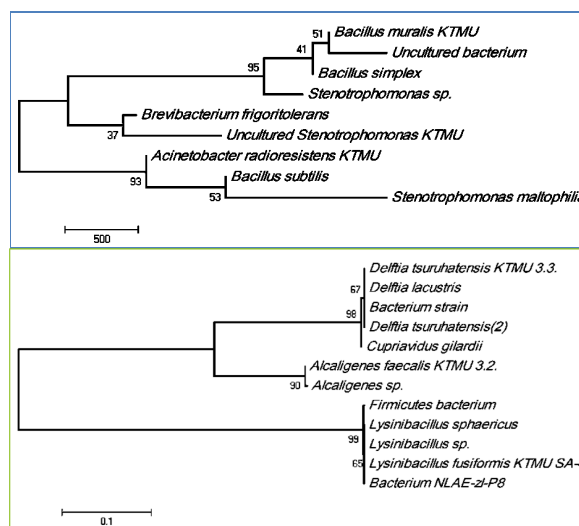


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное по принципу объединения соседей на основе последовательностей генов 16SrRNA, показывающее положение изолированных штаммов бактерий из почв экспериментальных участков.

Деградация пестицидов на глубине 10–12 см в почве в течение трех месяцев. Мы использовали результаты хроматографии для анализа и сравнения содержания пестицидов в почве до и после обработки на глубине 10–12 см. После внесения плодородной почвы и обработки почвы пятью применениями биопрепарата (в течение трех месяцев) содержание большинства пестицидов заметно снизилось.

После пяти применений биопродукта содержание большинство пестицидов снизилось; их разложение достигло до 86,23–97,23%. Некоторые пестициды, такие как В-ВНС и гептахлор-эпокс, показали 72,37–62,43% разложения, что указывает на умеренную устойчивость к активности разлагающих бактерий (Рис.6). Деградация большинства пестицидов до 86,23-97,23% в верхнем слое загрязненной почвы свидетельствует о высокой активности бактерий. Эти бактерии выступают в составе биопродукта как активные деградирующие и присутствуют во внесенной плодородной почве.

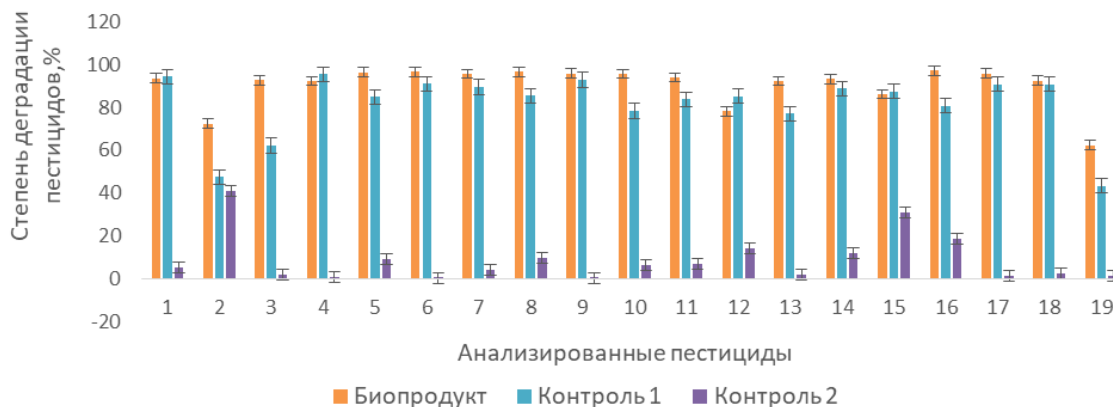


Рис. 6. Степень деградации устаревших пестицидов на глубине 10-12 см при внесении биопродукта на контрольных участках 1 и 2 в течение 3 месяцев: 1-А-ВНС; 2-В-ВНС; 3-Г-ВНС; 4-Д-ВНС; 5-Heptachlor; 6-Aldrine; 7-G-Chlordane; 8-Endosul -1-A-Chlordane; 9- 4,4-DDE; 10-Dieldrine; 11-Endrine; 12-Endosulfane-2; 13- 4,4- DDD; 14- Endrine-Aldehyd ; 15- Endosulfan-sulfat; 16 - 4,4-DDT; 17-Enrine -Ketone; 18-Metixochlor; 19-Heptochlor-epox. Значения приведены как среднее значение \pm SD, n = 3, значительно различающиеся при $P \leq 0.05$ по скорости разложения пестицидов в различных экспериментальных условиях.

Деградация пестицидов на глубине 20-35 см в почве в течение шести месяцев. Образцы почвы были взяты с глубины 20-35 см через шесть месяцев. Было взято семь образцов из разных точек на каждом экспериментальном участке. Результаты, полученные после трех применений биопродукта (в конце мая), сравнивались с результатами, полученными после девяти применений биопродукта (в начале декабря). За этот период почти все пестициды, которые были обнаружены ранее, были разложены до $99.0 \pm 0.05\%$, $P \leq 0.5$ (Рис.7). Как показывают полученные данные, что на экспериментальных участках, которые получили биопродукт, пестициды не были обнаружены, тогда как в контрольной почве, которая не получила биопродукт, но была улучшена другими агрохимическими подходами, некоторые пестициды, такие как эндрин и эндосульфат 2, все еще были обнаружены в значительных количествах в почве. С другой стороны, в контроле 2 большинство пестицидов сохранилось в почве в высоких концентрациях (4,4 ДДЕ - 1.003 ± 0.05 мг/кг; Дильдрин - 1.022 ± 1.07 мг/кг; Эндрин - 0.710 ± 0.14 мг/кг; Эндосульфат-2 - 1.578 ± 1.02) (Рис.7). Эти результаты подтверждают, что регулярно проводимые агротехнические процедуры, такие как перемешивание, аэрация и полив, позволяют вовлекать пестициды в нижние слои почвы для деградации посредством биоаугментации и биостимуляции, что является необходимым звеном для высококачественной биоремедиации. Однако в почве остались следы некоторых пестицидов, которые можно было удалить с помощью фиторемедиации (Рис.8).

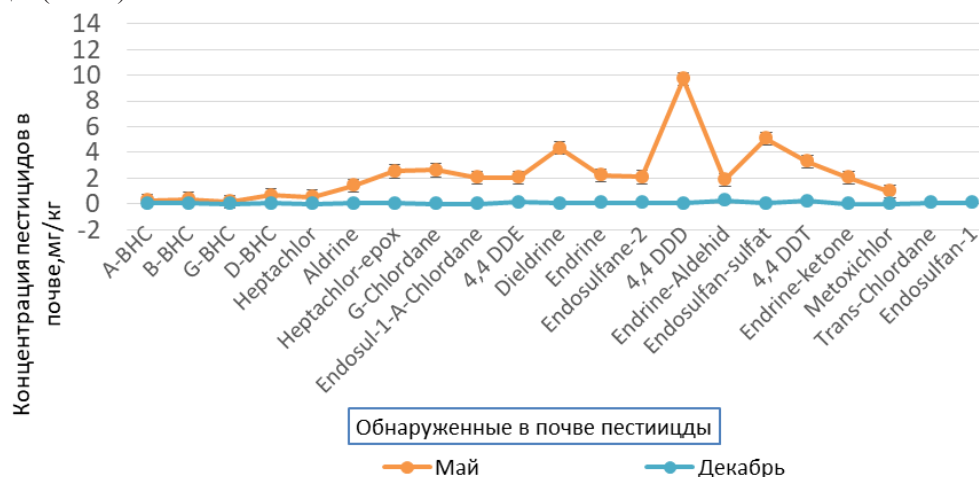


Рис. 7. Остаточное содержание пестицидов через шесть месяцев после начала биоремедиации на опытных участках, где был внесен биопродукт

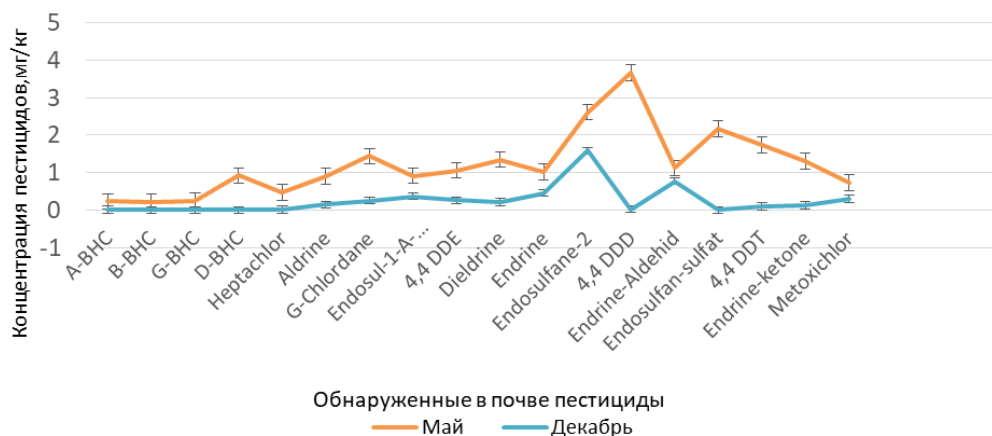


Рис. 8. Остаточное содержание пестицидов через шесть месяцев после начала биоремедиации на контрольном участке (внесена плодородная почва + биопродукт отсутствует)

Результаты фиторемедиации на опытных участках. Для полного очищения почвы после микробиологической ремедиации от пестицидов было решено, применять метод фиторемедиации. Фиторемедиация может быть использована для очищения почвы от металлоидов, нефтяных углеводородов, пестицидов, хлорированных растворителей и ряда промышленных побочных продуктов. Этот метод считается безопасным, так как основан на естественных механизмах, на использовании живых растений. Различают следующие механизмы фиторемедиации: ризофильтрация – корни растений всасывают загрязнителей из почвы; фитоэкстракция – накопление в организме растения опасных загрязнений (например, тяжелых металлов, пестицидов и других). Вдобавок, использование метода фиторемедиации позволяет определить токсичности оставшихся концентраций пестицидов в почве после микробной ремедиации и выявление эффективных видов растений для удаления пестицидов.

При наличии в почвенном растворе токсичных веществ (тяжелых металлов, пестицидов и т. п.) значительная их часть задерживается уже в корнях, та часть из них, которая все же проникает в стебли и листья задерживается в свою очередь в этих надземных органах и лишь незначительная часть токсикантов поступает в семена. Таким образом, механизмы, ограничивающие поступление и накопление токсичных веществ в репродуктивные органы присутствуют не только в корнях, но и в вегетативных органах, что очень важно с точки зрения использования растительной продукции.

Отслеживание роста семян на полях для контроля за их прорастанием. Опытные делянки отличались по всхожести семян. В делянках, где деградация пестицидов достигалась до 82 и 90 % после внесения биопродукта и плодородной почвы семена всех растений, кроме тыквы, проросли и показали средний рост. Тогда как в контроле 2, где ни биопродукт, ни почва не было внесено, посеянные семена не проросли, т. е. всхожесть была нулевой (Рис.9). При проверке слоев почвы было видно, что семена начали набухать, но не смогли прорасти или ростки погибли. Это говорит о том, что здесь почва фитотоксична, т.е. содержание пестицидов не позволяет семенам растений прорасти и развиваться.



Рис. 9. Слева – всходы на опытной делянке; справа – непроросшие, погибшие семена на контрольном участке 2

Внесение биоудобрения путем замачивания семян положительно повлияло на всхожесть семян и развитие всходов. По всхожести семян и развитию проростков наблюдалась значительная разница между участками, где семена были обработаны в суспензии биоудобрений и без обработки. Обработанные в биоудобрении семена дали начало хорошо развитой корневой системе и побегам. Эти данные указывают на то, что для усиления эффективности фиторемедиации необходимо применение биоудобрений, которое будет способствовать повышению всхожести семян и прорастания всходов в загрязненных почвах.

Адсорбирующая способность органов растений в фазе кушения. У растений в течение вегетации брали образцы надземных и подземных органов для хроматографического анализа, чтобы выявить сколько концентраций накопило в себе эти органы, для отбора виды растений с наибольшей адсорбирующей способностью, т.е. какое растения в какой части – в надземной и подземной части больше накапливают пестициды из почвы (Рис.10).

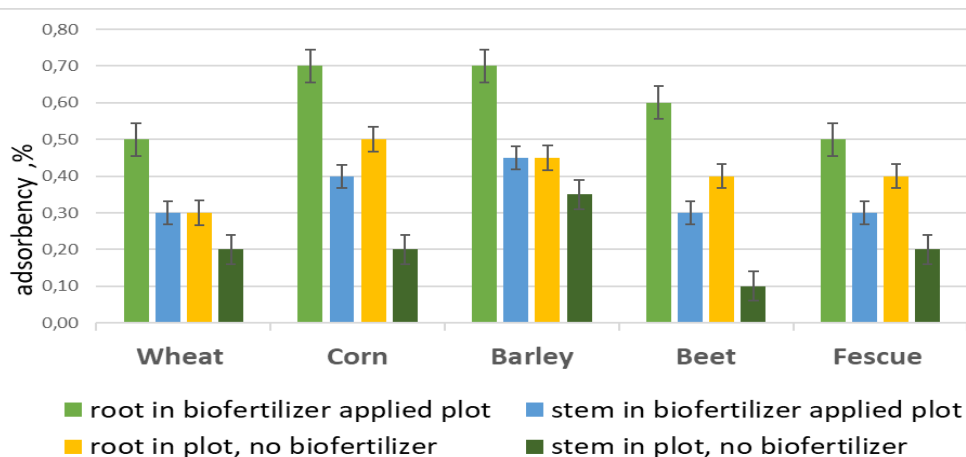


Рис. 10. Адсорбирующая способность корневой системы и стебли пшеницы, кукурузы, ячменя, сахарной свеклы и овсянки, культивируемых на загрязненной пестицидами почве, после микробиологической ремедиации (фаза кушения)

Как показали результаты хроматографического анализа, наиболее сильную адсорбирующую активность показали корни таких растений, как кукуруза, ячмень, сахарная свекла, среднюю активность проявили пшеница и овсянка. Вышеуказанные адсорбирующие растения сильно отличались по активности с применением биоудобрения, те растения которые были выращены из семян, обработанных биоудобрением имели сильно развитую корневую систему и соответственно больше поглощали пестицидов из почвы, по сравнению с теми, которые выростали из семян без обработки с биоудобрением. Следует отметить другую особенность у растений, стебли у всех растений меньше поглощали пестицидов из почвы, по сравнению с корневой системой.

Роль ризосферной микрофлоры у растений в процессе фиторемедиации. Многочисленные исследования подчеркнули жизненно важную роль ризосферных микробов в адсорбции и мобилизации тяжелых металлов и пестицидов, микроэлементов в почве, что имеет решающее значение для восстановления здоровья почвы [14].

Ризосферные микроорганизмы могут улучшить адсорбцию и экстракцию растений за счет увеличения доступность ТМ и пестицидов в растениях и увеличение биомассы растений. Такие бактерии могут снижать pH почвы, вырабатывая органические кислоты, путем секреции вторичных метаболитов, что способствует удалению ионов ТМ, углеводов. У разных растений разная доминирующая ризосферная микрофлора, что это влияет на ремедиацию различных видов загрязнений.

Ризосферная микрофлора в фазе кушения у растений была представлена с разными функциональными группами почвенных микроорганизмов. В этой фазе у ячменя была зарегистрирована высокая численность аммонифицирующих бактерий и сапрофитных микромицетов в отличие от других видов растений. Эти обе группы микробов активно участвуют в разложении органических остатков, в том числе и растительных. А также у свеклы и пшеницы было обнаружено в значительном количестве аммонифицирующие бактерии, олиготрофы.

Ризосферная микрофлора в фазе колошения у растений была богаче и по численности выше чем в фазе кушения и представлена с разными функциональными группами почвенных микроорганизмов. Например, у пшеницы, кукурузы и ячменя в ризосфере олиготрофные бактерии доминировали, их характерными представителями являются актинобактерии, стрептомицеты. Аммонифицирующие бактерии, участвующие в активном разложении органических соединений в почве доминировали в ризосфере пшеницы, ячменя и сахарной свеклы. Численность микромицетов была значительна только у сахарной свеклы. Таким образом, микрофлора почвы заметно изменилась после фиторемедиации. Если сравнивать почвенную микрофлору до биоремедиации и после микро и фиторемедиации, то она стала более богаче и многочисленна (Рис.11).

Сравнение микрофлоры деградированной почвы до и после био и фиторемедиации

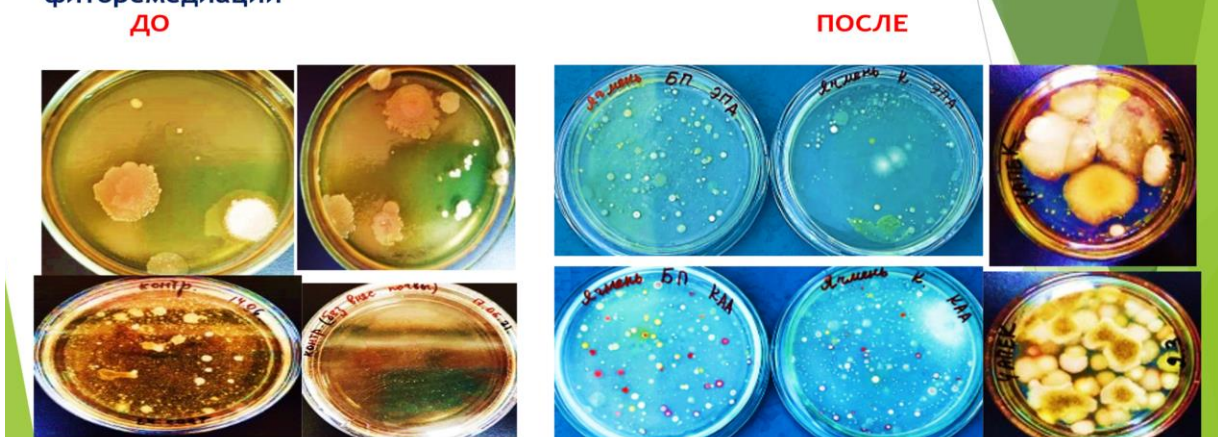


Рис. 11. Микрофлора деградированной почвы до и после био- и фиторемедиации

Дискуссия

В этом исследовании была применена технология биоаугментации и биоремедиации *in situ* на загрязненных участках. Эффективность технологии биоремедиации была проверена в полевых условиях на бывшем складе пестицидов, расположенном в селе Чем-Коргон. Было обнаружено, что почва вокруг склада деградировала из-за более чем 50-летнего воздействия запрещенных пестицидов. Она была лишена растительности, покрыта безжизненной глиняной коркой и выжжена высокими концентрациями пестицидов.

Экспериментальные почвы представляли собой микрофлору с очень бедным биоразнообразием и низким количеством функционирующих клеток, как показано на рисунках 3 и 4. Это указывает на необходимость введения извне разлагающих бактерий и дополнительных питательных веществ для стимуляции процесса удаления пестицидов из почвы. Для эффективного выполнения биоаугментации и биоремедиации 19 типов пестицидов, обнаруженных вокруг склада, использовались ферментированные продукты на основе трех активных бактерий. Эти бактерии - *Stenotrophomonas sp. (штамм Ps-B)*, *L. fusiformis (штамм SA-4)* и *E. cloacae (штамм SB-2)*, которые содержат ген P450, отвечающий за активность ферментов цитохрома. Эти штаммы были выбраны из обширной коллекции штаммов, выделенных из сильно загрязненных пестицидами почв, и протестированы в лабораторных и модельных экспериментах против различных концентраций хлорорганических пестицидов.

Как отмечено в других исследованиях, несколько штаммов бактерий способны разлагать пестициды в почве. Основные виды микроорганизмов относятся к таким родам, как *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Actinomycetes*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* и *Trichoderma*, и используются в целях биоремедиации [15-18]. В частности, бактерии *Stenotrophomonas sp.*, *Lysinibacillus sp.* и *Enterobacter cloacae* рассматривались в качестве активных деструктивных агентов для разложения углеводов и трансформации тяжелых металлов, таких как свинец, хром и никель [19-20].

Выводы

- Наши исследования показали, что биопродукт, содержащий (*Stenotrophomonas sp. (штамм Ps-B)*, *L. fusiformis (штамм SA-4)* и *E. cloacae (штамм SB-2)*), является эффективным инструментом разложения пестицидов, который разлагал 19 типов пестицидов в концентрации от 4 до 15 мг на кг почвы в течение шести месяцев до $99,0 \pm 0,05\%$ ($P < 0,05$).
- Мы рекомендуем использовать данный агротехнический и биотехнологический подход на умеренно загрязненных пестицидами пахотных почвах и вокруг складов хранения пестицидов.
- Эффективность процесса разложения зависит от оптимальных климатических условий, таких как температура, pH почвы и влажность.
- Необходимы дальнейшие исследования для оптимизации разложения пестицидов в различных типах почв и условиях *ex-situ* с использованием бактериальных штаммов, выбранных для этого исследования.
- Применение технологии фиторемедиации после биоаугментации показало жизнеспособность почвы для всхожести семян и роста растений на участках, где биопродукт и плодородная почва была добавлена в деградированную почву.
- А также эта технология доказала токсичность контрольной почвы, где не проводилась биоремедиация. То есть фиторемедиация является индикатором токсичности пестицидов для растительного организма.
- Корневая система таких растений как ячмень, кукуруза, свеклы отличалась повышенной адсорбирующей способностью пестицидов из почвы. Пшеница и овсяница показали среднюю активность.

• Биодоброение Ростин (*Streptomyces fumanus*) при замачивании семян растений, используемых для фиторемедиации показал рост стимулирующий эффект на всхожесть семян и на рост всходов, это указывает на дополнительный рычаг улучшения механизма ризофильтрации и фитоэкстракции пестицидов подземными и надземными органами растений.

• Увеличение численности гетеротрофных микроорганизмов- аммонифицирующих, олигонитрофилов и почвенных микромицетов вокруг корневой системы указывает на создание растительно- микробной системы, обогащение почвы полезными микроорганизмами.

• Хроматографические анализы подтвердили эффективность применения фиторемедиации после микробиологической ремедиации, так как за 5-6 месяцев вегетационного периода растения смогли удалить оставшиеся концентрации в почве пестицидов.

Благодарности

Данная работа была поддержана «Проектом технической помощи в реализации маршрутов по биоремедиации почв, загрязненных ПТП» (номера грантов [GCP/SEC/011/GFF]). Автор Тинатин Доолоткельдиева получила исследовательскую поддержку от Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО).

Использованная литература

1. Abdel-Shafy, H. I., and M. S. M. Mansour. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (1):107–23. doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011
2. Kim, K. H., S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. C. Brown. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International* 60:71–80. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.01
3. Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury A. 2009. “Impact of pesticide use in agriculture: their benefits and hazards”. *Interdiscip Toxicol* 2 (1):1-12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
4. Egbea, C.C., Oyetitoba, G.O., Iloria M.O. 2021. “Ecological impact of organochlorine pesticides consortium on autochthonous microbial community in agricultural soil”. *Ecotox Environ Safe* 207:111319. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111319
5. He, T.T., Zuo, A.J., Wang, J.G., Zhao P. 2017. “Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study”. *Tumor Biol* 39:1010428317699114. doi: 10.4103/sajc.sajc_427_18
6. Yang, L., Weber, R., Liu G. 2022. “Science and policy of legacy and emerging POPs towards Implementing International Treaties” *Emerging Contaminants* 8: 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2022.06.002>
7. Riser-Roberts, E. 2020. *Remediation of petroleum contaminated soils: Biological, physical, and chemical processes*. Boca Raton, Florida, United State: *CRC Press*
8. Raffa, C.M., Chiampo F. 2021. “Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review”. *Bioengineering* 8: 92. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8070092>
9. Chawla, N., Sunita, S., Kamlesh, K., Kumar R. 2013. “Bioremediation: an emerging technology for remediation of pesticides”. *Res J Chem Environ* 17 (4): 88-105
10. Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye Z., Wassie M. 2017. “Application of microorganisms in bioremediation-review”. *J Environ Microbiol* 1:2-9. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>
11. Vyas, C., Wao A.A. 2020. “Prognostication of bioremediation requisite around industrially contaminated environment – a review”. *Curr Biotechnol* 9:3-14. doi:10.2174/2211550109666200305092457
12. Bhandari, S., Poudel, D. K., Marahatha, R., Dawadi, S., Khadayat, K., Phuyal, S., et al. 2021. “Microbial enzymes used in bioremediation”. *Journal of Chemistry* 1–17. doi:10.1155/2021/8849512
13. Dooltokeldieva T, Bobusheva S, Konurbaeva M. Effects of Streptomyces Biofertilizer to Soil Fertility and Rhizosphere’s Functional Biodiversity of Agricultural Plants. *Advances in Microbiology*. Vol.5 No.7(2015), Paper ID 58385, 17pages DOI:10.4236/aim.2015.57058
14. Subramaniyam, V., Subashchandrabose, S. R., Ganeshkumar, V., Thavamani, P., Chen, Z., Naidu, R., et al. (2016). Cultivation of *Chlorella* on Brewery Wastewater and Nano-Particle Biosynthesis by its Biomass. *Bioresour. Technol.* 211, 698–703. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.154
15. Szyrka, E., Podbielska, M., Zwolak, A., Piechowicz, B., Siebielec, G., Słowik-Borowiec M. 2020. “Influence of a commercial biological fungicide containing *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 on dissipation kinetics and degradation of five herbicides in two types of soil”. *Molecules* 25:1391. doi: 10.3390/molecules25061391
16. Korkmaz, V., Yildirim, N., Erguven, G.O., Durmus, B., Nuhoglu Y. 2021. “The bioremediation of glyphosate in soil media by some newly isolated bacteria: The COD, TOC removal efficiency and mortality assessment for *Daphnia magna*.” *Environmental Technology & Innovation*, 22: 101535
17. Książek-Trela, P., Szyrka E. 2022. “The effect of natural and biological pesticides on the degradation of synthetic pesticides”. *Plant Protect. Sci.* 58: 273–291. doi: 10.17221/152/2021-PPS
18. Erguven, G. Ö., Serdar, O., Tanyol, M., Yildirim, N.C., Durmus B. 2022. “The Bioremediation Capacity of *Sphingomonas melonis* for Methomyl-Contaminated Soil Media: RSM Optimization and Biochemical Assessment by *Dreissena polymorpha*”. *Chemistry Select* 7: e202202105. Doi: 10.1002/slct.202202105
19. Chikere, C. B., Tekere, M., and Adeleke, R. 2019. “Enhanced microbial hydrocarbon biodegradation as stimulated during field-scale landfarming of crude oil-impacted soil”. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 14: 100177. doi: 10.1016/j.scp.2019.100177
20. Sarma, H., Sonowal, S., and Prasad, M. 2019. “Plant-microbiome assisted and biochar amended remediation of heavy metals and polyaromatic compounds – a microcosmic study”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176: 288–299. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.081