



УДК 504.06

Изучение эффективности использования сапрофитного штамма бактерий *Bacillus pumilus* для утилизации ксенобиотиков I–II класса опасности



Д. М. Успанова, О. В. Нечаева, Н. Ф. Шуршалова, В. В. Каменева, А. Р. Бычков

Успанова Динара Марзагалеевна, аспирант кафедры «Экология», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., dinarka_-14@mail.ru

Нечаева Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор кафедры «Экология», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., olgav.nechaeva@rambler.ru

Шуршалова Наталья Фердинандовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и физиологии растений, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, francissella@rambler.ru

Каменева Виктория Владимировна, студент, Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., cameneva2012@yandex.ru

Бычков Александр Русланович, студент, Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., alexbychkov9756@gmail.com

На модели иловых осадков разного возраста и почв, загрязненных нефтепродуктами, изучена утилизирующая способность сапрофитной бактерии *Bacillus pumilus*. Установлено, что через 7 дней после внесения в образцы иловых отложений культуры *B. pumilus* происходило повышение содержания массовой концентрации ионов меди, кадмия и свинца с последующим снижением в динамике через 21 день экспозиции бактерий. Массовая концентрация ионов цинка в образцах илов снижалась в динамике в течение всего времени эксперимента. Внесение культуры *B. pumilus* в техногенно-измененные почвы, содержащие нефтепродукты, способствовало достоверному снижению их массовой концентрации, наиболее выраженной к 20-му дню эксперимента. Полученные результаты позволяют рассматривать *B. pumilus* в качестве эффективного и безопасного компонента при разработке комплексных биопрепаратов для реабилитации антропогенно измененных почв.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, тяжёлые металлы, нефтепродукты, биодеструкция.

Поступила в редакцию: 02.02.2020 / Принята: 20.02.2020 / Опубликовано: 01.06.2020

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-200-206>

В последние годы техногенное загрязнение является одним из ведущих факторов антропогенной нагрузки на окружающую природную среду, связанной с хозяйственной деятельностью человека. Среди множества загрязняющих

веществ особую роль играют отходы I–II класса опасности, в частности тяжелые металлы и нефтепродукты, значительная часть которых попадает в почву [1]. Это приводит к снижению продуктивности земель, нарушению структуры почвы и угнетению почвенных биоценозов [2].

Для решения данной проблемы могут быть использованы разнообразные подходы, связанные, например, с выемкой загрязненных почв и размещением их на специальных полигонах для дальнейшей рекультивации или использования физико-химических методов, которые в основном не обеспечивают полное удаление поллютантов, способствуя их стабилизации в почве [3, 4]. Кроме низкой эффективности и отсутствия экологической безопасности, данные методы экономически невыгодны [5].

Наиболее перспективной в этом отношении является биорекультивация, преимущества которой заключаются в способности микроорганизмов к полной минерализации органических ксенобиотиков и относительно низкой стоимости проводимых мероприятий [6–9]. Лимитирующими факторами биодegradации являются температура, влажность и высокая концентрация ксенобиотика, оказывающего ингибирующее действие на деятельность микроорганизмов, обеспечивающих естественное самоочищение [10].

Существует два подхода к биодegradации ксенобиотиков и восстановлению экосистем [11]:

1) активизация аборигенной микрофлоры путем создания оптимальных условий для ее развития;

2) введение в загрязненную экосистему активных микроорганизмов-деструкторов в виде биопрепаратов.

Коммерческие биопрепараты, предлагаемые на сегодняшний день, в основном направлены на утилизацию определенного поллютанта, хотя зачастую техногенно-измененные почвы содержат целый комплекс загрязняющих веществ.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение эффективности использования сапрофитного штамма бактерий *Bacillus pumilus* для утилизации тяжелых металлов и нефтепродуктов и обоснование возможности его использования в качестве компонента комплексного биопрепарата для биоремедиации.



Материалы и методы

Исследования проводили на базе НОЦ «Промышленная экология» Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю. А. (СГТУ).

Объектом исследования явились образцы илов и нефтезагрязненных почв, полученных с полигона (Московская область, с. Колонтаево). Предварительно исследуемые образцы почв и иловых осадков автоклавировали при 1 атм для уничтожения аборигенной микрофлоры, в том числе и спорогенной.

Измерение массовой концентрации ионов тяжёлых металлов проводили согласно стандартной методике на полярографе с электрохимическим датчиком «Модуль ЕМ-04» [12]. Для оценки концентрации ионов меди, кадмия, свинца и цинка исследовали шесть образцов иловых отложений: № 1–3 – хранились на иловых площадках с 2009 г., № 4 – с 2012 г., № 5 и № 6 – с 2015 г.

Пробоподготовку исследуемых образцов почв и определение в них массовой концентрации нефтепродуктов проводили с использованием концентратомера КН-2, № 17664-98 согласно стандартной методике [13]. Результат определения содержания нефтепродуктов в почве $X_{изм}$ (мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X_{изм} = C_{изм} \times V \times V_2 \times V_{элюат} / M \times V_1 \times V_{ал}, \quad (1)$$

где $C_{изм}$ – показания прибора, мг/дм³; M – масса навески образца для анализа, кг; V – суммарный объем экстракта, дм³; V_1 – объем экстракта, взятый для разбавления, дм³; V_2 – объем экстракта, полученный после разбавления, дм³; $V_{ал}$ – объем аликвоты экстракта, введенной в хроматографическую колонку, дм³; $V_{элюат}$ – объем элюата, полученного после пропускания экстракта через колонку, дм³.

Контролем служили образцы почвы, отобранные в с. Шевыревка, Татищевского района Саратовской области, так как на данной территории нет промышленных предприятий и загрязненность почв низкая.

В качестве экспериментальной модели для разработки биопрепарата для комплексной реабилитации антропогенно-измененных почв использовали штамм бактерий *Bacillus pumilus* из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского. Проведенные ранее исследования позволили установить его высокую ферментативную и антагонистическую активность, а также биологическую безопасность [14, 15]. В исследованиях использовали

суточную культуру бактерий, выращенных на мясопептонном агаре при температуре 28° С, из которой готовили взвесь в физиологическом растворе по стандарту мутности 10 ЕД (ГИСК им. Л. А. Тарасевича – ныне Научный центр экспертизы средств медицинского применения), которую в дальнейшем добавляли в исследуемые образцы почвы из расчета 1 мл на 100 г материала.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows; «Stat Soft Inc.», США), Statgraph (Version 2.6; Coulter), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Оценка массовой концентрации ионов меди, кадмия, цинка и свинца в исследуемых образцах иловых осадков показала отсутствие превышений по показателям предельно допустимой концентрации (ПДК) (рис. 1–3). Установлено, что на начальных этапах экспозиции штамма *B. pumilus* (через 7 дней) во всех пробах илов происходило повышение содержания массовой концентрации ионов меди, кадмия и свинца с последующим снижением в динамике.

Вероятно, это связано с тем, что бактерии благодаря высокой ферментативной активности сначала расщепляли сложные молекулы, что приводило к высвобождению ионов тяжёлых металлов, а затем вовлекали их в метаболические процессы, в результате чего наблюдалось постепенное снижение концентрации ионов тяжёлых металлов во всех пробах.

Анализ содержания массовой концентрации ионов цинка в иловых осадках показал, что внесение в пробы *B. pumilus* приводило к постепенному снижению их концентрации в течение времени эксперимента (рис. 4).

Содержание нефтепродуктов в исходном образце почвы составляло $2217 \pm 10,4$ мг/кг (рис. 5). Было установлено, что экспозиция штамма *B. pumilus* в течение 10 дней приводила к незначительному (в 1,18 раз) снижению массовой концентрации нефтепродуктов в почве по сравнению с контролем. Вероятно, это связано с токсическим действием нефтепродуктов на клетки микроорганизмов и их адаптацией к действию поллютанта. Через 20 дней экспозиции массовая концентрация нефтепродуктов в почве снижалась в 5,9 раза, а через 30 дней – в 10,3 раза по сравнению с контролем. Эффективное снижение массовой концентрации нефтепродуктов в почве свидетельствует об углеводородокисляющей способности данного микроорганизма.

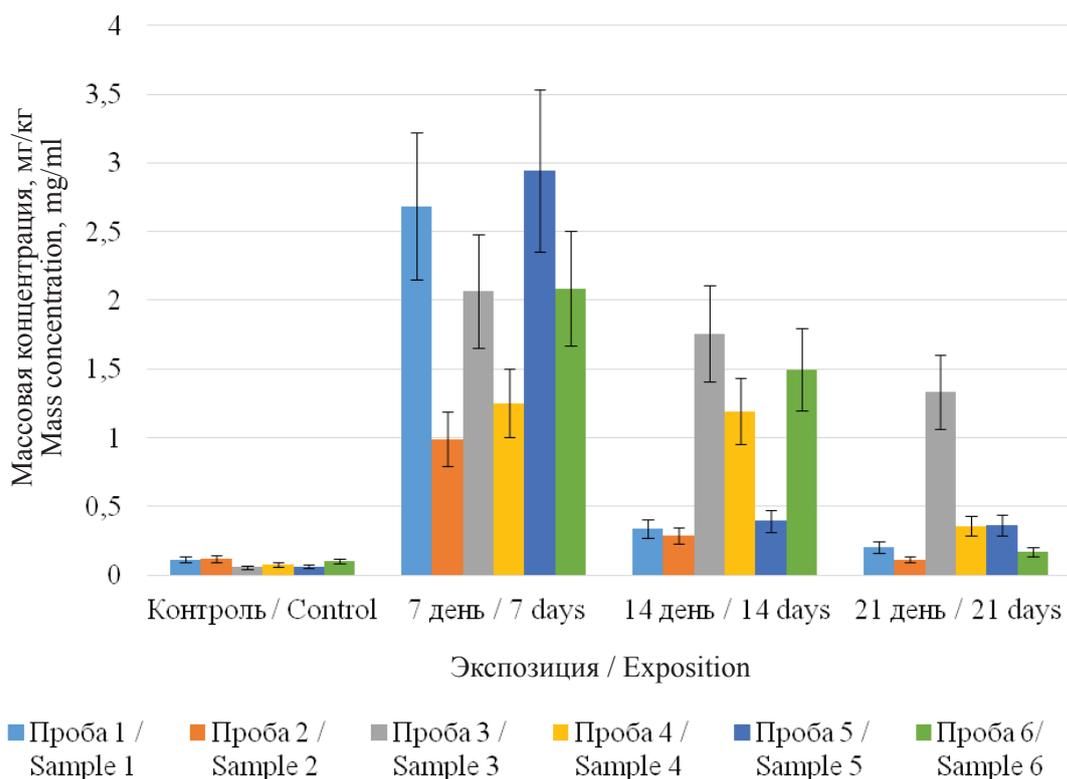


Рис. 1. Динамика изменения массовой концентрации Cu^{2+} в пробах иловых осадков (цвет online)
Fig. 1. Dynamics of changes in mass concentration of Cu^{2+} in silt sediment samples (color online)

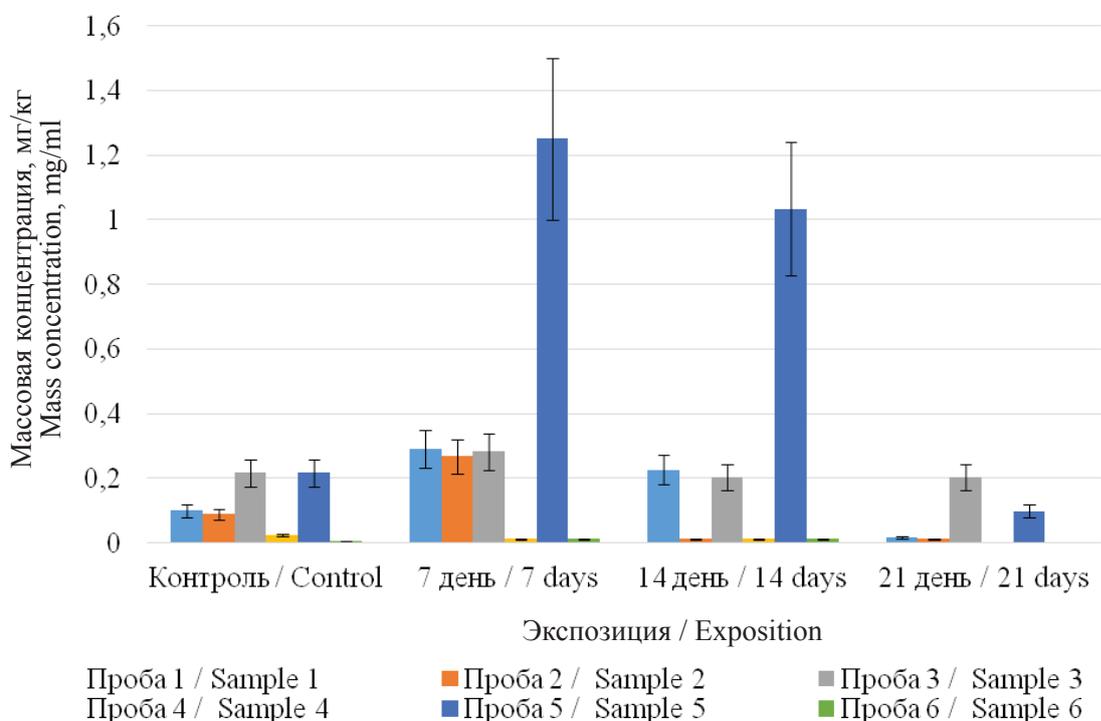


Рис. 2. Динамика изменения массовой концентрации Cd^{2+} в пробах иловых осадков (цвет online)
Fig. 2. Dynamics of changes in mass concentration of Cd^{2+} in silt sediment samples (color online)

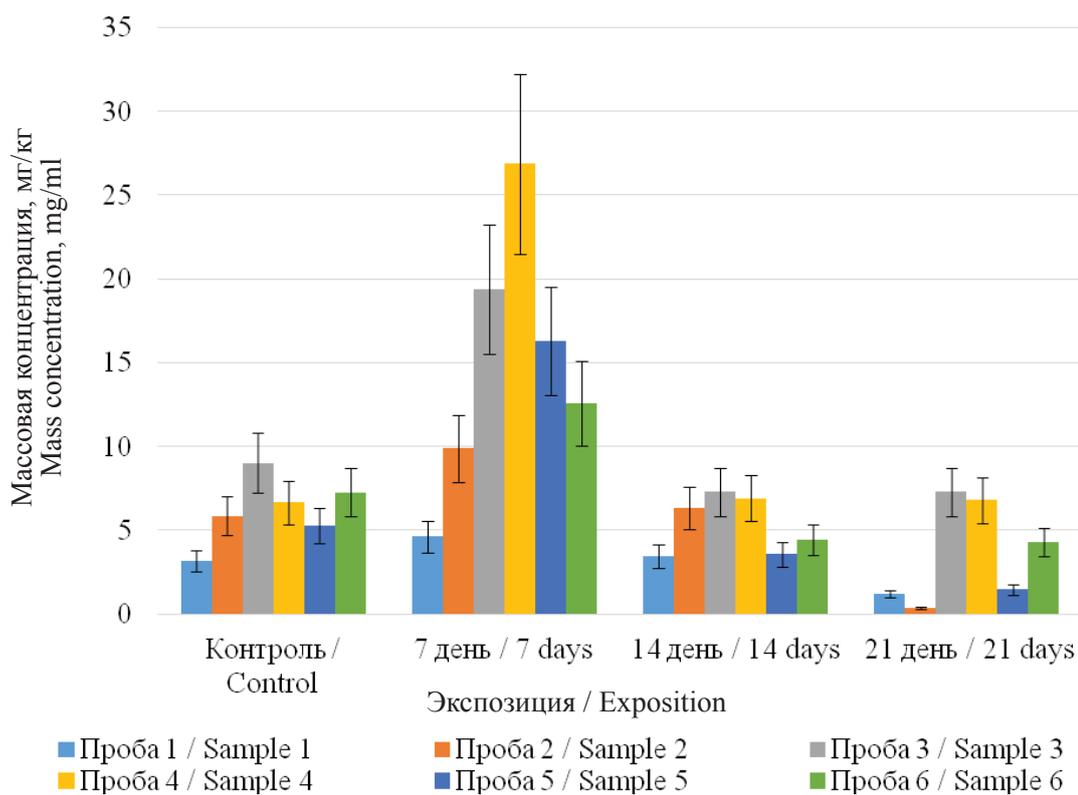


Рис. 3. Динамика изменения массовой концентрации Pb²⁺ в пробах иловых осадков (цвет online)
 Fig. 3. Dynamics of changes in mass concentration of Pb²⁺ in samples of silt sediments (color online)

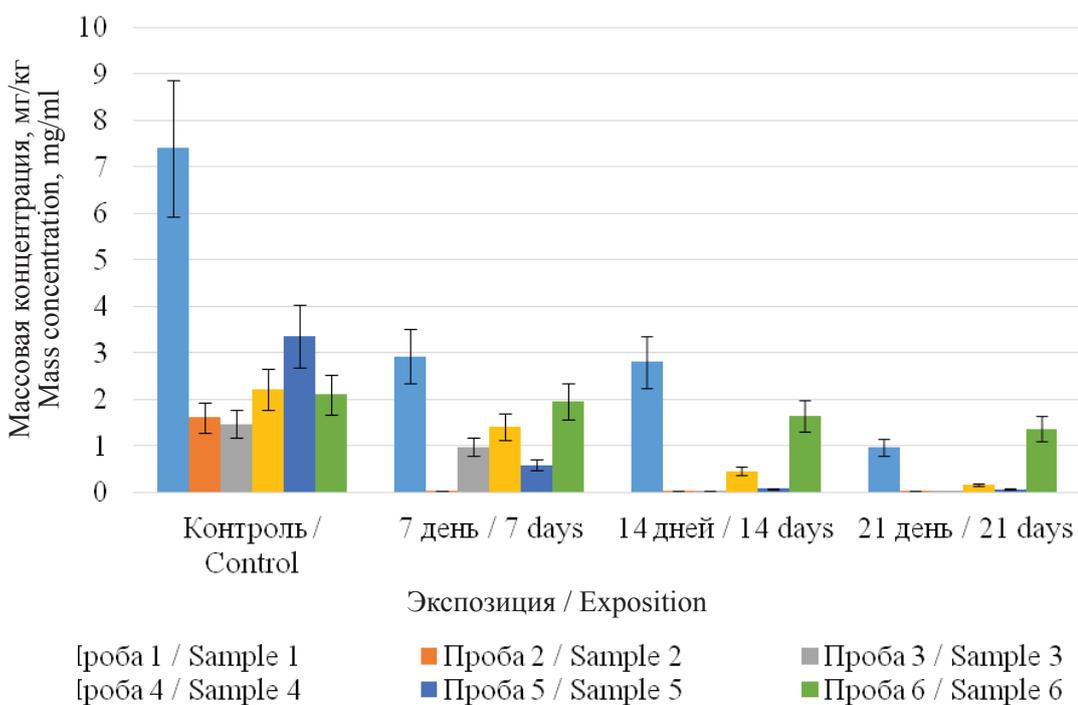


Рис. 4. Динамика изменения массовой концентрации Zn²⁺ в пробах иловых осадков (цвет online)
 Fig. 4. Dynamics of changes in the mass concentration of Zn²⁺ in samples of silt sediments (color online)

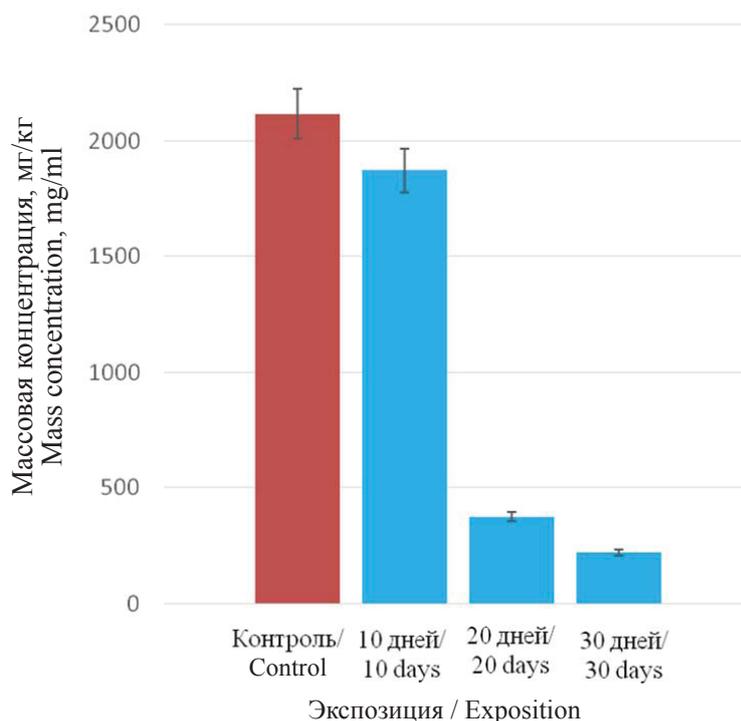


Рис. 5. Динамика изменения массовой концентрации нефтепродуктов в исследуемом образце почвы

Fig. 5. Dynamics of changes in the mass concentration of oil products in the studied soil sample

Таким образом, проведенные исследования показали, что применение штамма бактерий *B. pumilus* в качестве биодеструктора способствует достоверному снижению массовой концентрации тяжелых металлов в иловых отложениях и нефтепродуктов в нефтезагрязненных почвах в динамике. Полученные результаты позволяют рассматривать данный микроорганизм в качестве эффективного и безопасного компонента при разработке комплексных биопрепаратов для реабилитации антропогенно измененных почв.

Список литературы

1. Водяницкий Ю. Н., Ладонин Д. В. Загрязнение почв тяжелыми металлами. М. : Изд-во МГУ, 2012. 305 с.
2. Деградация и охрана почв / под общ. ред. акад. РАН Г. В. Добровольского. М. : Изд-во МГУ, 2002. 654 с.
3. Оборин А. А., Хмурчик В. Т., Илларионов С. А., Маркарова М. Ю., Назаров А. В. Нефтезагрязненные биогеоценозы (Процессы образования, научные основы восстановления, медико-экологические проблемы). Пермь, Изд-во Перм. гос. ун-та, 2008. 511 с.
4. Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review // *Engineering Geology*. 2001. Vol. 60. P. 371–380. DOI: 10.1016/S0013-7952(00)00117-4
5. Заболотских В. В., Танких С. Н., Васильев А. В. Технологические подходы к детоксикации и биовосстановлению нефтезагрязненных земель // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2018. Т. 20, № 5 (3). С. 341–351.
6. Кураков А. В., Ильинский В. В., Котелевцев С. В., Садчиков А. П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. М. : Трафикон, 2006. 336 с.
7. Мурзаков Б. Г. Экологическая биотехнология для нефтегазового комплекса. М. : Изд-во МГУ, 2005. 200 с.
8. Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y. B., Naidu R., Megharaj M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils : technological constraints, emerging trends and future directions // *Chemosphere*. 2017. № 168. P. 944–968. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.115
9. Xiong B., Zhang Y., Hou Y., Arp H. P. H., Reid B. J., Cai C. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar // *Chemosphere*. 2017. № 182. P. 316–324. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.020
10. Белоусова Н. И., Шкидченко А. Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2004. Т. 40, № 3. С. 312–316.
11. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. М. : Мир, 2006. 504 с.



12. ПНД Ф 14.1: 2:4.149-99 Методика выполнения измерений массовой концентрации ионов меди, свинца, кадмия и цинка в пробах питьевой, природных и очищенных сточных вод на полярографе электрохимическим датчиком «Модуль ЕМ-04». М., 2005. URL: <http://docs.cntd.ru/document/437151096> (дата обращения: 20.01.20).
13. ПНД Ф 14.1.272-2012 Методика (метод) измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах сточных вод методом ик-спектрофотометрии с применением концентратометров серии КН. М., 2017. URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293775/4293775499.htm> (дата обращения: 20.01.20).
14. Дементьева Н. А., Шуршалова Н. Ф., Нечаева О. В., Каменева В. В. Изучение микробного состава иловых осадков и выбор наиболее перспективных штаммов бактерий-деструкторов // Научные труды национального парка «Хвалынский»: сб. науч. ст. по материалам IV Междунар. науч.-практ. конф. Саратов; Хвалынский: ООО «Амирит», 2017. С. 103–107.
15. Филиппов И. Д., Шуршалова Н. Ф., Петерсон А. М. Антагонистическая активность штаммов *Bacillus pumilus*, выделенных из отработанных активных илов, в отношении санитарно-значимых микроорганизмов // Тенденции развития науки и образования. 2019. № 51, ч. 6. С. 30–33.

Образец для цитирования:

Успанова Д. М., Нечаева О. В., Шуршалова Н. Ф., Каменева В. В., Бычков А. Р. Изучение эффективности использования сапрофитного штамма бактерий *Bacillus pumilus* для утилизации ксенобиотиков I–II класса опасности // Изв. Саратовского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 2. С. 200–206. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-200-206>

Study of the Effectiveness of Using a Saprophytic Strain of Bacteria *Bacillus pumilus* for the Disposal of Xenobiotics of Hazard Class I–II

D. M. Uspanova, O. V. Nechaeva, N. F. Shurshalova, V. V. Kameneva, A. R. Bychkov

Dinara M. Uspanova, <https://orcid.org/0000-0002-3745-9494>, Yuri Gagarin State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia, dinarka_-14@mail.ru

Olga V. Nechaeva, <https://orcid.org/0000-0003-3331-1051>, Yuri Gagarin State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia, olgav.nechaeva@rambler.ru

Natalya F. Shurshalova, <https://orcid.org/0000-0002-8416-8649>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, francissella@rambler.ru

Viktoriya V. Kameneva <https://orcid.org/0000-0002-7676-3587>, Yuri Gagarin State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia, cameneva2012@yandex.ru

Aleksandr R. Bychkov <https://orcid.org/0000-0003-4381-4859>, Yuri Gagarin State Technical University, 77 Polytechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia, alexbychkov9756@gmail.com

Using the model of silt sediments of different ages and soils contaminated with oil products, the utilizing ability of the saprophytic bacterium *Bacillus pumilus* was studied. It was established that 7 days after the introduction of silt sediment samples of *B. pumilus* culture into the samples, there was an increase in the mass concentration of copper, cadmium and lead ions, followed by a decrease in the dynamics after 21 days of bacterial exposure. The mass concentration of zinc ions in the sludge samples decreased in dynamics over the entire duration of the experiment. The introduction of the *B. pumilus* culture into technologically altered soils containing petroleum products contributed to a significant decrease in their mass concentration, most pronounced by the

20th day of the experiment. The results obtained make it possible to consider *B. pumilus* as an effective and safe component in the development of complex biologics for the rehabilitation of anthropogenically modified soils.

Keywords: *Bacillus pumilus*, heavy metals, oil products, biodegradation.

Received: 02.02.2020 / Accepted: 20.02.2020 / Published: 01.06.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

References

1. Vodyanitsky Yu. N., Ladonin D. V. *Zagryazneniye pochvy tyazhelymi metallami* [Soil Pollution by Heavy Metals]. Moscow, Izd-vo MGU, 2012. 305 p. (in Russian).
2. Dobrovolsky G. V., ed. *Degradatsiya i okhrana pochvy* [Soil Degradation and Protection]. Moscow, Izd-vo MGU, 2002. 654 p. (in Russian).
3. Oborin A. A., Khmurchik V. T., Illarionov S. A., Markarova M. Yu., Nazarov A. V. *Neftезagryaznennyye biogeotsenozy (Pratsessy obrazovaniya, nauchnyye osnovy vosstanovleniya, mediko-ekologicheskiye problemy)* [Oil-contaminated biogeocenoses (Education processes, the scientific basis for restoration, medical and environmental problems)]. Perm, Izd-vo Perm. un-ta, 2008. 511 p. (in Russian).
4. Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 2001, vol. 60, pp. 371–380. DOI: [10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)
5. Zabolotskikh V. V., Tankikh S. N., Vasiliev A. V. Technological approaches to detoxification and bioremediation of oil-contaminated lands. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2018, vol. 20, no. 5 (3), pp. 341–351 (in Russian).
6. Kurakov A. V., Ilyinsky V. V., Kotelevtsev S. V., Sadchikov A. P. *Bioindikatsiya i reabilitatsiya ekosistem pri*



- neftyanykh zagryazneniyakh* [Bioindication and rehabilitation of ecosystems during oil pollution]. Moscow, Trafikon Publ., 2006. 336 p. (in Russian).
7. Murzakov B. G. *Ekologicheskaya biotekhnologiya dlya neftegazovogo kompleksa* [Environmental biotechnology for the oil and gas industry]. Moscow, Izd-vo MGU, 2005. 200 p. (in Russian).
 8. Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y. B., Naidu R., Megharaj M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 2017, no. 168, pp. 944–968. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.115
 9. Xiong B., Zhang Y., Hou Y., Arp H. P. H., Reid B. J., Cai C. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar. *Chemosphere*, 2017, no. 182, pp. 316–324. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.020
 10. Belousova N. I., Shkidchenko A. N. Destruction of oil products of varying degrees of condensation by microorganisms at low temperatures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2004, vol. 40, no. 3, pp. 312–316. (in Russian).
 11. Kuznetsov A. E., Gradova N. B. *Nauchnyye osnovy ekobiotekhnologii* [Scientific Foundations of Ecobiotechnology]. Moscow, Mir Publ., 2006. 504 p. (in Russian)
 12. PND F 14.1: 2:4.149-99 *Metodika vypolneniya izmereniy massovoy kontsentratsii ionov medi, svintsy, kadmiya i tsinka v probakh pit'yevoy, prirodnykh i ochishchennykh stochnykh vod na polyarografe elektrokhimicheskim datchikom "Modul' EM-04"* [PND F 14.1: 2: 4.149-99 Methodology for measuring the mass concentration of copper, lead, cadmium and zinc ions in samples of drinking, natural and purified wastewater on a polarograph using an EM-04 module electrochemical sensor]. Moscow, 2005. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/437151096> (accessed 20 January 2020). (in Russian).
 13. PND F 14.1.272-2012 *Metodika (metod) izmereniy massovoy kontsentratsii nefteproduktov v probakh stochnykh vod metodom ik-spektrofotometrii s primeneniye kontsentratomerov serii KN* [PND F 14.1.272-2012 Methodology (method) for measuring the mass concentration of oil products in wastewater samples by IR spectrophotometry using concentrators of the KN series]. Moscow, 2017. Available at: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293775/4293775499.htm> (accessed 20 January 2020) (in Russian).
 14. Dementieva N. A., Shurshalova N. F., Nechaeva O. V., Kameneva V. V. Izucheniye mikrobnogo sostava ilovykh osadkov i vybor naiboleye perspektivnykh shtammov bakteriy-destruktorov [The study of the microbial composition of sludge and the selection of the most promising strains of bacteria-destructors]. *Nauchnyye trudy natsional'nogo parka "Khvalynskiy": sb. nauch. st. po materialam IV Mezhdunar. nauchn.-prakt. konf.* [Scientific works of the national park "Khvalynsky": coll. of sci. art. on the materials of the IV International scientific-practical conference]. Saratov, Khvalynsk, OOO "Amirit" Publ., 2017, pp. 103–107 (in Russian).
 15. Filippov I. D., Shurshalova N. F., Peterson A. M. Antagonistic activity of *Bacillus pumilus* strains isolated from spent activated sludge in relation to sanitary-significant microorganisms. *Trends in the Development of Science and Education*, 2019, no. 51, part 6, pp. 30–33 (in Russian).

Cite this article as:

Uspanova D. M., Nechaeva O. V., Shurshalova N. F., Kameneva V. V., Bychkov A. R. Study of the Effectiveness of Using a Saprophytic Strain of Bacteria *Bacillus pumilus* for the Disposal of Xenobiotics of Hazard Class I–II. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 2, pp. 200–206 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-2-200-206>