

На правах рукописи

ТРЕТЬЯКОВА СВЕТЛАНА ЭДУАРДОВНА

**СОЗДАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ–ДЕСТРУКТОРОВ
ПЕСТИЦИДОВ ПРОМЕТРИНА И ПАРАТИОН–МЕТИЛА
И ИСПЫТАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ РЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Тихомирова Елена Ивановна

кандидат биологических наук, доцент
Ксенофонтова Оксана Юрьевна

Официальные оппоненты: **Сергеева Ирина Вячеславовна**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,
заведующая кафедрой ботаники и экологии

Богатырев Владимир Александрович
доктор биологических наук, старший научный
сотрудник, ФГБУН Институт биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории нанобиотехнологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина

Защита диссертации состоится «18» декабря 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 на базе ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335

Автореферат диссертации разослан «__» ноября 2013 года.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание биопрепаратов на основе штаммов–деструкторов ксенобиотиков, выделенных из аборигенной микрофлоры, для решения комплекса задач, связанных с реабилитацией загрязненных почв в результате возрастающей техногенной нагрузки (Ксенофонтова, 2004; Турковская и др., 2002, 2003; Плешакова и др., 2005; Плешакова, 2010, Shimp et al., 1993; Turkovskaya et al., 2000). Растущий дефицит пригодных для хозяйственной деятельности человека земель возникает при активном использовании почв непосредственно в качестве природного ресурса в сельскохозяйственном секторе экономики (Рева, 1978; Григорян, 1980; Муравьев, 1999; Герасимова, 2003). Особенно сильно деградируют почвы вследствие интенсивного применения пестицидов с нарушением норм и правил их использования, что приводит к их значительному накоплению в почвах. Так же особую опасность представляют полигоны захоронения неиспользованных или запрещенных химикатов (Ивлев, 2003; Колесников и др., 2006; Решетов и др., 2008). Естественные процессы самоочищения почв неспособны справиться с такими объемами загрязнений.

Известно, что плодородие и самоочищение почв напрямую зависит от активности микробиологических процессов, однако в результате высокой интоксикации почвы ингибируется автохтонная микрофлора (Звягинцев, 1978; Кауричев, 1979; Бабьева, 1989; Вальков, 1995, 2004; Ананьева, 2007). Необходимость рекультивации нарушенных земель определяет комплекс задач по разработке, освоению и оптимизации технологий ремедиации, применения комплекса мелиоративных и рекультивационных мероприятий, оправданных экологическими и экономическими оценками. (Беспмятников, 1985; Алексеев, 1987; Александров, 1990; Орлов, 1991; Колесников, 2001; Казеев, 2003; Латышевская, 2010).

Изучение состава микробоценозов загрязненных почв, его изменений в процессе ремедиации после внесения штамма–деструктора или консорциума микроорганизмов, динамики адаптации и развития внесенного биодеструктора в условиях взаимодействия с аборигенной микрофлорой и под влиянием естественных и антропогенных факторов, представляет значительный научный интерес как для теоретической, так и для прикладной микробиологии.

Актуальность разработки комплексных технологий, направленных на восстановление основных функций почв и повышение их плодородия, связана с решением крупной народно–хозяйственной проблемы, имеющей государственное значение.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время для решения проблем очистки загрязненных почв биологические методы ремедиации рассматриваются в качестве приоритетных. Биодеструкция считается наиболее перспективным направлением в технологиях рекультивации почвенных систем, зараженных органическими поллютантами, в том числе и пестицидами (Вельков, 1995; Головлева, Головлев, 1980; Кузнецов и др., 2012).

Известно, что структура и состав почвы являются ведущими факторами, влияющими как на стабилизацию пестицидов, так и на их биодоступность (Галлиулин и др., 1990; Чканников, 1983; Dieguez–Carbonell, Rodrigues Pascual, 1975; Hamaker, Tomson, 1972; Kuwatsura, Igarashi, 1975; Providenti et al., 1973; Vigar, Kiss, 2009).

В работах ряда авторов показано, что снижение pH почвы приводит к увеличению адсорбции прометрина, атразина и двух его метаболитов гумусом почвы, что приводит к замедлению их деструкции (Oliver et al., 2003). Для различных видов за-

грязнений почв используют соответствующие специфичные штаммы–биодеструкторы. Доказано, что выделение микроорганизмов, устойчивых к экотоксикантам, целесообразно проводить из почвы, длительно содержащей высокие концентрации ксенобиотиков (Анкудинова, 2010; Ахметов, 2006; Колупаев, 2010; Ксенофонтова, 2004; Любунь, 2004; Орлова, 2007; Плешакова и др., 2006; Пунтус, 2000). На настоящий момент выделено и депонировано большое количество штаммов пестицид–деструкторов как в виде монокультур, так и в консорциумах (Анкудинова, 2010; Афанасьев и др., 2002; Иллялетдинов, 1990; Колупаев, 2010; Любунь, 2004; Макаренко, 2007; Орлова, 2007; Плешакова, 2010). Однако практическое их применение в целях биоремедиации почв возможно только после изготовления из них биопрепаратов.

Одним из перспективных направлений является применение комбинированных физико–биологических методов, основанных на деструкционном потенциале почвенных микроорганизмов и высокой аккумулярующей способности сорбентов в отношении загрязнителей, в частности, пестицидов (Ивлев, 2003; Колесников и др., 2006; Тихомирова и др., 2011; Олискевич и др., 2013). Многими учеными показано, что иммобилизация бактерий, предназначенных для биоремедиации загрязненных почв, на различных носителях: вермикулите, опилках, торфе, соломе, активированных углях и других, способствует повышению жизнеспособности и активности бактерий, улучшая качество очистки (Алексеева и др., 2000; Могилевич, 1995; Grawford, 1994; Levinson et al., 1994; Obuekwe, Al–Muttawa, 2001).

Существует большое количество запатентованных биотехнологических разработок, основанных на внесении биодеструкторов в различных препаративных формах (свободных и иммобилизованных), называемых биопрепаратами, в сочетании с агро–мелиоративным комплексом обработки почвы (Афанасьев и др., 2002; Завгороднев, 2006; Калюжин, Лушников, 2006; Маркушева и др., 1999). Однако на сегодняшний день практически отсутствуют коммерческие биопрепараты на основе штаммов–деструкторов пестицидов в иммобилизованной форме для задач биоремедиации загрязненных почв сельскохозяйственного назначения.

Таким образом, актуальность, теоретическая и практическая значимость обусловили выбор темы, определили цель, задачи и структуру исследования.

Цель работы: создание биопрепаратов на основе штаммов пестицид–деструкторов, выделенных из аборигенной микрофлоры хронически загрязненных почв и иммобилизованных на микрокапсулах, и испытание технологии ремедиации экспериментально загрязненных почв в лабораторных и полевых условиях на примере чернозема южного.

Задачи исследования:

1. Выделение из хронически загрязненных пестицидами почв штаммов микроорганизмов, устойчивых к прометрину и паратион–метилу, и выбор из них наиболее перспективных биодеструкторов.

2. Исследование активности отобранных биодеструкторов на экспериментально загрязненных почвенных системах в лабораторных условиях для выбора наиболее оптимальных условий ремедиации.

3. Оптимизация биотехнологических параметров получения биомассы модельного биодеструктора на лабораторном ферментере.

4. Создание биопрепаратов на основе модельного биодеструктора, иммобилизованного на микрокапсулах, и испытание его деструктивных свойств в лабораторных условиях на экспериментально загрязненных почвенных системах.

5. Испытание технологии ремедиации экспериментально загрязненных почв в полевых условиях на примере чернозема южного с использованием модельного биодеструктора, разработанного биопрепарата и традиционных агротехнических приемов.

6. Оценка эффективности ремедиации экспериментально загрязненных прометрином почв при разных способах применения биодеструктора по данным химико-аналитических, токсикологических и микробиологических исследований.

Научная новизна работы.

Впервые экспериментально обоснованы условия выделения консорциума бактерий, устойчивых к 100 ПДК прометрина и паратион-метила. Охарактеризованы штаммы-деструкторы пестицидов: прометрина – *Pseudomonas putida* П2, *Ps. putida* 1.1.2 и *Ps. putida* 6.7.2; паратион-метила — *Bacillus subtilis* МФ1; *Ps. putida* 8.3.2; *Ochrobactrum thiophenivorans* 6.2.3; *B. megaterium*; *B. fastidiosus*; *B. laterosporus*, использующие пестицид в концентрации 100 ПДК в качестве единственного источника углерода.

Отобраны для создания биопрепаратов штаммы *Ps. putida* П2 и *B. subtilis* МФ1, которые характеризуются наибольшей деструктивной активностью на модельных средах: за 7 суток разрушают 80 % прометрина и 97 % паратион-метила, соответственно. Штамм обладал высокими адаптационными и деструктивными характеристиками в условиях загрязнения почвы 100 ПДК прометрина.

Впервые обосновано использование наиболее активного штамма деструктора прометрина *Ps. putida* П2 для создания биопрепарата, иммобилизованного на микрокапсулах из полимочевины диаметром 40–60 мкм. Изучена деструктивная способность вариантов биопрепарата на основе некапсулированного штамма *Ps. putida* П2 и иммобилизованного на микрокапсулах в лабораторных и полевых условиях на модели почвенной системы, экспериментально зараженной 100 ПДК прометрина. Доказано, что применение микрокапсулированного препарата биодеструктора в 10 раз эффективнее, чем внесение суспензии чистого штамма.

Теоретическая и практическая значимость.

Выделены и депонированы штаммы-деструкторы прометрина и паратион-метила *Ps. putida* П2 (рег. № ВКМ В-2811D) и *B. subtilis* МФ1 (рег. № ВКМ В-2812D).

Оптимизированы параметры ферментации и сроки выхода культуры деструктора в стационарную фазу для получения наибольшей биомассы. Определены оптимальные варианты применения комбинаций приемов ремедиации (полив, рыхление и интродукция биодеструкторов), обеспечивающих максимальное снижение концентрации пестицида прометрина и не вызывающие нарушения микробиологического равновесия в почве типа чернозем южный.

В рамках ОКР (шифр «Почва») № госрегистрации 01200960905 разработаны рекомендации по ремедиации почвы, загрязненной промышленным пестицидным препаратом «Гезагард» на примере чернозема южного.

Полученные данные по оптимизации параметров ферментации открывают перспективы использования для промышленного производства биопрепаратов для ремедиации почв, загрязненных пестицидом прометрин. Результаты изучения деструктивной активности микрокапсулированного биопрепарата в лабораторных и полевых условиях могут быть использованы при разработке проектов ликвидации источников накопленного экологического ущерба, связанных с хранением пестицидов, при проведении биологического этапа рекультивации почв.

Результаты диссертационной работы внедрены в ЗАО «БНТ» при выполнении ОКР (шифр «Почва») № госрегистрации 01200960905 в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)» и реализованы при разработке универсальных технологий биологическим и сорбционно–биологическим методами, обеспечивающими рекультивацию (санацию) земель в соответствии с темой ОКР «Почва», а также при разработке опытной Установки УППР 10/15, предназначенной для промышленного производства разработанных в ходе выполнения диссертационной работы биопрепаратов для рекультивации почв, загрязненных пестицидами, что подтверждается актом о внедрении 09.06.2013 г.

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения из аборигенной микрофлоры хронически загрязненных почв штаммов–деструкторов пестицидов и оценки их деструктивных свойств; условий иммобилизации клеток штаммов–деструкторов; биотехнологических условий выращивания микробной биомассы; условий биоремедиации почв, загрязненных пестицидами, и методам индикации штаммов–интродуцентов на фоне аборигенной микрофлоры почв. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы.

При проведении исследования и изложения материала автором были применены общенаучные методы: теоретико–методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно–сопоставительного анализа.

Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделены и охарактеризованы штаммы–деструкторы пестицидов: прометрина – *Ps. putida* П2, *Ps. putida* 1.1.2 и *Ps. putida* 6.7.2.; паратион–метила – *B. subtilis* МФ1; *Ps. putida* 8.3.2; *Ochrobactrum thiophenivorans* 6.2.3, *B. megaterium*; *B. fastidiosus*; *B. laterosporus*, использующие пестицид в концентрации 100 ПДК в качестве единственного источника углерода.

2. Отобраны для создания биопрепаратов штаммы *Ps. putida* П2 и *B. subtilis* МФ1, которые характеризуются наибольшей деструктивной активностью, способностью за 7 суток разрушать 80% прометрина и 97% паратион–метила соответственно, высокими адаптационными и деструктивными характеристиками в условиях загрязнения почвы 100 ПДК прометрина.

3. Применение микрокапсулированного препарата биодеструктора в 10 раз эффективнее, чем внесение суспензии чистого штамма биодеструктора в загрязненную 100 ПДК прометрина почву на фоне проведения агроприемов в полевых условиях.

Работа выполнена в период с 2009 по 2013 гг. в научной биологической лаборатории и научно–образовательном центре «Промышленная экология» кафедры экологии Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. в рамках НИР СГТУ 13 В «Разработка методов оценки и реабилитации загрязненных природных сред» (2009–2010 гг.), а также в лаборатории биотехнологии ООО «НИИТОНХиБТ» в рамках ОКР «Почва» № госрегистрации 01200960905. Исследования поддержаны грантом Федеральной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (государственный контракт СГТУ–7, 2012–2013).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференциях различного уровня: Международной конференции «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2010); Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2010); Международной научно–практической конференции «Вавиловские чтения 2010» (Саратов, 2010); XLIX 1–3 Всероссийских научно–практических конференциях «Экология: синтез естественно–научного, технического и гуманитарного знания» (Саратов, 2010–2012); Международной Пушкинской школе–конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011); 5–6 Всероссийских конференциях с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2011, 2013); Международной научно–практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (Саратов, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих объекты, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждения, а также из выводов, списка литературы и приложения. Содержит 15 таблиц и 24 рисунка. Список литературы включает 202 наименования, из них 53 на иностранных языках.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы бактерий, выделенные из почв с мест несанкционированных захоронений пестицидов, запрещенных для использования в настоящее время, и музейный штамм *Ps. putida* П2, полученный из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений ГБОУ ВПО «СГУ им. Н.Г. Чернышевского» в качестве прометрин–деструктора.

В качестве носителя (подложки) для микроорганизмов в составе биопрепарата использовали пористые микрокапсулы, разработанные ЗАО «БНТ» и изготовленные из полимочевины ЗАО «ПироХимика».

Определение количественного и качественного состава аборигенной микробиоты проводили с использованием стандартных методик на селективных средах (Нетрусов и др., 2005).

Для культивирования штаммов использовали питательные жидкие и агаризованные среды производства ФГУН «ГНЦПМиБ», Оболенск. Опыты по изучению деструкции пестицидов проводили с использованием минеральной среды М9 (Маниатис, 1984), в которую при необходимости добавляли глюкозу в качестве косубстрата в концентрации 0,1%. Для приготовления агаризованной среды М9 в базовый состав дополнительно вносили агар в количестве 2 масс. %.

Изучение культуральных, морфологических и биохимических признаков микроорганизмов и их идентификацию проводили согласно общепринятым методам с использованием определителя бактерий Берджи (Берджи, 1997; Bergey, 2005; Bergey, 2009) и определителя Красильникова (Красильников, 1949).

Подтверждение идентификации осуществляли секвенированием ДНК выделенных штаммов и определением нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

Определение концентрации бактериальных клеток в культуральной жидкости проводили на спектрофотометре СФ–102 (НПО ИНТЕРФОТОФИЗИКА) при постоянных параметрах: длина волны $\lambda = 630$ нм, длина кюветы $l = 10$ мм (ОП₆₃₀). Количество клеток определяли по калибровочному графику, выражающему зависимость оптической плотности ОП₆₃₀ культуральной жидкости от количества клеток, определенного по Стандарту Мутности БАК–10 (производство ООО «ОРМЕТ»).

Индикацию интродуцированного штамма–деструктора в составе общей микробиоты почвы проводили на твердой среде М9 с добавлением в нее пестицида в качестве источника углерода и 0,01% 2,3,5–трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) в качестве индикатора дегидрогеназной активности бактерий (Гранатская и др., 1996).

Определение концентрации пестицидов проводили на хромато–масс–спектрометре Agilent Technologies (GN 7820A, MS 5975) с низкополярной колонкой HP–5MS. Условия программы и режима прибора подбирали для каждого из веществ индивидуально в соответствии с данными библиотеки спектров MS Search v.2.0. Пробоподготовку и экстракцию проводили в соответствии со стандартными методиками (РД 52.18.188–2001; РД 52.24.411–2009).

Токсичность почвы определяли с использованием стандартных тест–объектов *Daphnia magna* Straus и *Chlorella vulgaris* Beijer в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.12–06 Т 16.1:2:3:3.9–06, ФР.1.31.2009.066410 и ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10–04 16.1:2.3.7–04.

Выделение штаммов–биодеструкторов на прометрин и паратион–метил осуществляли из хронически загрязненной почвы с места захоронения пестицидов. Селекцию микроорганизмов проводили методом накопительных культур на жидкой среде М9 с постепенно возрастающей концентрацией пестицидов (Анкудинова, 2010). Культивирование проводили в термостатируемом шейкере течение 2–5 суток при температуре 28 °С. Из жидкой селективной среды с максимальной концентрацией пестицида, соответствующей 100 ПДК, проводили серию пассажей путем многократных пересевов культур на плотную селективную среду с такой же концентрацией пестицидов в двух вариантах – с глюкозой и без нее. Посевы культивировали в термостате при температуре 28 °С. Изоляты из последнего пассажа, способные расти на твердой минеральной среде в присутствии 100 доз ПДК без кометаболитов и проявившие в этих условиях дегидрогеназную активность, были исследованы на способность к биодеструкции прометрина и паратион–метила. Культивирование микроорганизмов проводили в жидкой среде М9, содержащей пестициды в концентрациях, соответствующих 100 ПДК в термостатируемом шейкере в течение 7 суток при 28 °С. Контролем служили среды такого же состава без засевов. Результаты оценивали по проценту убыли количества ДВ пестицида по отношению к первоначальному уровню (степень деструкции $D_{дв}$). Прирост биомассы исследуемой культуры оценивали по изменению оптической плотности ОП₆₃₀ в процессе культивирования. Увеличение концентрации клеток в среде выражали как коэффициент прироста биомассы (КПБ).

Оценка деструктивных свойств штаммов в пробах почв в лабораторных условиях. Подготовленную почву помещали в контейнеры по 3 кг и вносили в нее водно–спиртовые растворы ГСО модельных пестицидов прометрин и паратион–метил с таким расчетом, чтобы их конечная концентрация в почве соответствовала 100 ПДК (прометрина 50 мг/кг, паратион–метила 10 мг/кг). Концентрация и объем вносимой бактериальной суспензии были рассчитаны так, чтобы конечная концентрация микроорганизмов была порядка 10^8 клеток на 1 г воздушно–сухой почвы, а увлажненность почвы составляла не более 60% от ПВ. В качестве жидкой фазы суспензии ис-

пользовали минеральную среду М9 с 0,1% сахарозой (сахарозу использовали вместо глюкозы для возможности масштабирования в полевом эксперименте). Контейнеры инкубировали при естественных климатических условиях, соответствовавших летнему периоду. Отбор проб и определение концентрации пестицидов проводили на 7, 14 и 30 сутки.

Изучение сорбционных свойств микрокапсул проводили на модельном агрохимикате «Гезагард», содержащем в качестве действующего вещества прометрин в концентрации 500 г/л. Водную суспензию препарата с концентрацией прометрина 50 мг/л (100 ПДК) наливали в стаканы по 100 мл и вносили микрокапсулы в количествах: 0,025 г; 0,050 г; 0,057 г; 0,100 г. В качестве контроля служил идентичный раствор «Гезагарда», но без добавления микрокапсул. Стаканы с опытными образцами экспонировались на качалке при температуре 28 °С при 170 об/мин. Отбор проб и определение концентрации прометрина проводили на 1, 2, 3, 5, 7 и 21 сутки.

Выращивание биомассы модельного штамма прометрин–деструктора *Ps. putida* П2 проводили методом глубинного культивирования в лабораторном ферментере в модифицированной нами питательной среде КГКДА (Филонов и др., 2008). Процесс ферментации проводили в 3 цикла в лабораторном ферментере с общим объемом 1 л. Рабочий объем среды составлял 600 мл (60% от общего объема). Параметры культивирования подбирались экспериментально. Полученный концентрат биомассы хранили в холодильнике в стерильной емкости при 4 °С не более недели. Приготовление жидкого микрокапсулированного биопрепарата проводили в соответствии с рекомендациями производителей микрокапсул и опираясь на результаты собственных исследований.

Оценка деструктивных свойств штаммов в пробах почв в полевых условиях. Полевые испытания эффективности сконструированного биопрепарата проводили на специально оборудованной территории, расположенной вблизи п. Строитель Саратовского района в естественных условиях в период с июня по сентябрь 2012 года. На участках применяли агротехнические приемы ремедиации (полив, рыхление, внесение удобрений) и их комбинирование с использованием препаративных форм модельного биодеструктора.

Отбор образцов почв на все виды исследований проводили согласно нормативным документам (ГОСТ 28168–89; ГОСТ 17.4.3.01–83; ГОСТ 17.4.4.02–84). Эффективность применения вариантов агротехнологий ремедиации оценивали на 30 сутки.

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам с использованием программ статистического пакета Excel (MS Office 2007). Повторность всех экспериментов трехкратная.

Результаты исследований и их обсуждение

Выбор способа внесения пестицидов в качестве субстратов для микроорганизмов в экспериментальные среды

На предварительном этапе работы был отработан способ внесения пестицидов в качестве субстратов для микроорганизмов в экспериментальные среды, при этом были учтены следующие условия:

– для исследования деструктивной активности микроорганизмов экспериментальные лабораторные среды должны быть стерильными, гомогенными, с контролируемым содержанием в них веществ;

– исходные среды должны быть прозрачными, поскольку прирост биомассы изучаемого деструктора при глубинном жидкофазном культивировании с целевым субстратом оценивается спектрофотометрически;

– добавление водных суспензий пестицидов, приготовленных из агрохимических промышленных препаратов, приводит к обсеменению, образованию неоднородного помутнения и неоправданному внесению в среды компонентов, входящих в состав агрохимикатов.

Изучение этих обстоятельств позволило сделать вывод о целесообразности внесения пестицидов в стерильные среды в виде спиртовых растворов ГСО. При таком способе внесения субстрата среды соответствовали вышеизложенным требованиям.

Селекционирование штаммов в жидкофазной накопительной культуре и отбор деструкторов по наличию дегидрогеназной активности

Из почвы, хронически загрязненной пестицидами, методом накопительных культур с поэтапно возрастающей концентрацией ДВ пестицидов были получены микробиологические консорциумы на прометрин и паратион–метил, из которых были выделены чистые культуры. Культуры, проявившие способность к росту на агаризованной среде в присутствии 100 ПДК пестицидов с косубстратом (с глюкозой) и без косубстрата, дополнительно были исследованы на наличие у них дегидрогеназной активности, которая свидетельствовала об их деструктивных возможностях. Для обнаружения у бактерий дегидрогеназной активности (ДГ–активность) использовали среду М9 с пестицидом в количестве 100 ПДК и 0,01% ТТХ. В результате проведенных экспериментов были получены две группы микроорганизмов, использующие пестицид как косубстрат и как единственный источник углерода. Для дальнейших исследований были отобраны штаммы с хорошим ростом на среде с пестицидами и использующие их в качестве единственного источника углерода.

На основании морфологических, культуральных и биохимических признаков отобранные штаммы были идентифицированы как деструкторы прометрина: Пн3 – *Ps. putida* 1.1.2; Пн5 – *Ps. putida* 6.7.2; деструкторы паратион–метила: МФ1 – *B. subtilis* МФ1; МФ2 – *Ps. putida* 8.3.2; МФ5 – *Ochrobactrum thiophenivorans* 6.2.3; МФ6 – *B. megaterium*; МФ7 – *B. fastidiosus*; МФ8 – *B. laterosporus*.

Идентификация наиболее перспективных штаммов была подтверждена методами ПЦР и секвенирования ДНК, в результате которых были определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК у штаммов: Пн3 – *Ps. putida* 1.1.2, Пн5 – *Ps. putida* 6.7.2, МФ1 – *B. subtilis* МФ1, МФ2 – *Ps. putida* 8.3.2, МФ5 – *Ochrobactrum thiophenivorans* 6.2.3.

Выбор наиболее эффективных пестицид–деструкторов по деструктивной активности

Следующим критерием отбора наиболее эффективных штаммов являлось изучение скорости разложения пестицида в среде культивирования. Эффективность выделенных штаммов и музейного штамма–деструктора прометрина *Ps. putida* П2 оценивали по степени деструкции пестицидов в культуральной жидкости и приросту в ней биомассы в условиях периодического культивирования по сравнению с чистой селективной средой М9. Конечную концентрацию пестицида в среде и прирост биомассы ОП₆₃₀ определяли через 7 суток (Рисунок 1).

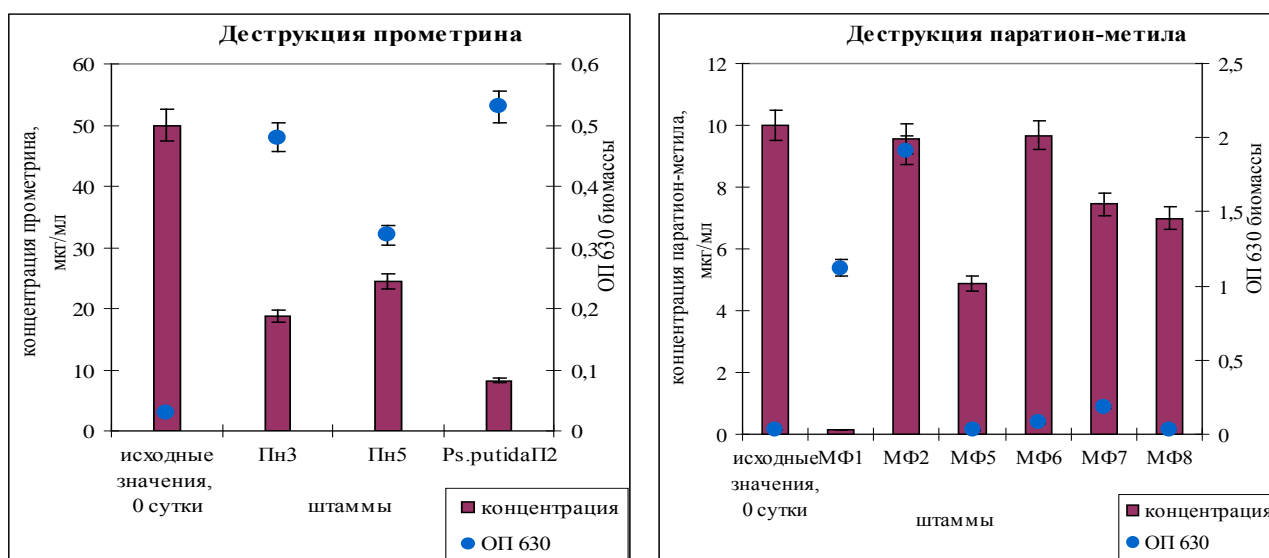


Рисунок 1 — Динамика концентрации пестицидов и прироста биомассы в жидкой среде

Установлено, что наилучшими показателями обладал штамм *Ps. putida* П2, у которого на 7 суток степень деградации прометрина составила 80,83 %, а биомасса выросла в 17,6 раз. При изучении деградации паратион–метила лучший результат показал штамм *B. subtilis* МФ1 – за 7 суток степень деградации составила 98,6 %, а биомасса выросла в 38,6 раза. Полученные результаты позволили выбрать в качестве модельных штаммы: *Ps. putida* П2 – как деструктор прометрина и *B. subtilis* МФ1 – как деструктор паратион–метила. Эти штаммы в последствии были депонированы.

Изучение в лабораторных условиях деградации пестицидов в почве

Изучение свойств чистой модельной почвы с экспериментального участка (физико–химических, почвенно–гидрологических, микробиологических и санитарно–гигиенических) было проведено перед постановкой экспериментальных исследований. Агрохимический анализ провели на базе аккредитованной лаборатории в ФБГУ Государственная Станция Агрохимической Службы «Саратовская»; санитарные показатели были определены в аккредитованной лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области». Почва на экспериментальном участке была классифицирована как чернозем южный, характерный для Саратовской области; изначально не загрязненная техногенными поллютантами; соответствовала требованиям санитарно–гигиенических норм. Нами были проведены агротехнические расчеты, на основании которых получены почвенно–гидрологические константы.

В результате изучения в исходной почве состава автохтонной микробиоты были выделены основные группы микроорганизмов, участвующих в почвообразовательном процессе, и определены их количественные показатели.

Изучение процесса деструкции пестицида

В результате лабораторных исследований деградации пестицидов в стерильной и нестерильной почве было выяснено, что процессы их самораспада и биодеструкции аборигенной микрофлорой в течение 30 суток практически отсутствуют или пренебрежительно малы, т.к. концентрация обоих поллютантов в течение эксперимента оставалась практически без изменения. В результате применения технологии активизации почвенной микрофлоры классическими агротехническими приемами (внесение минерально–углеводных добавок, увлажнение, рыхление) степень деструкции к

30 суткам составляла для прометрина – 16 %, а для паратион–метила – 9 %. В почвах, инкубированных соответствующими биодеструкторами, деградация пестицидов была значительно выше и составляла для прометрина – 70 % (Рисунок 2), а для паратион–метила – 95 % (Рисунок 3).

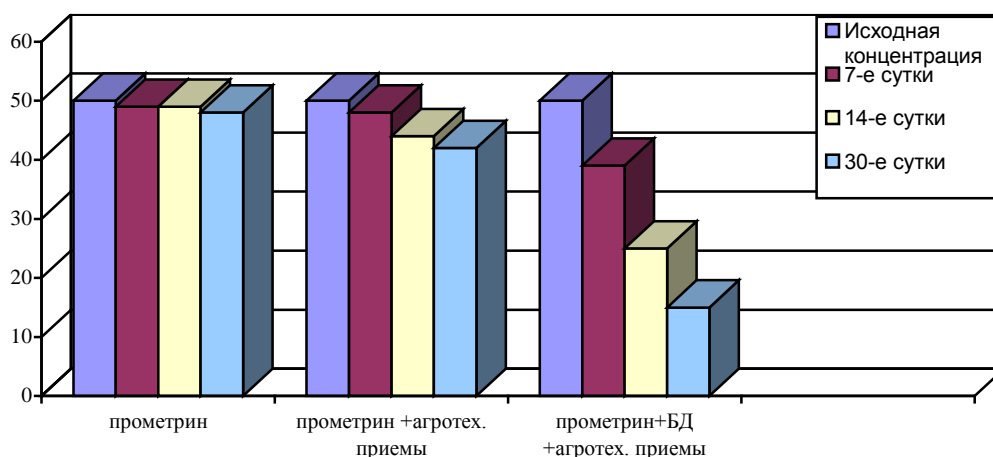


Рисунок 2 – Динамика деградации прометрина

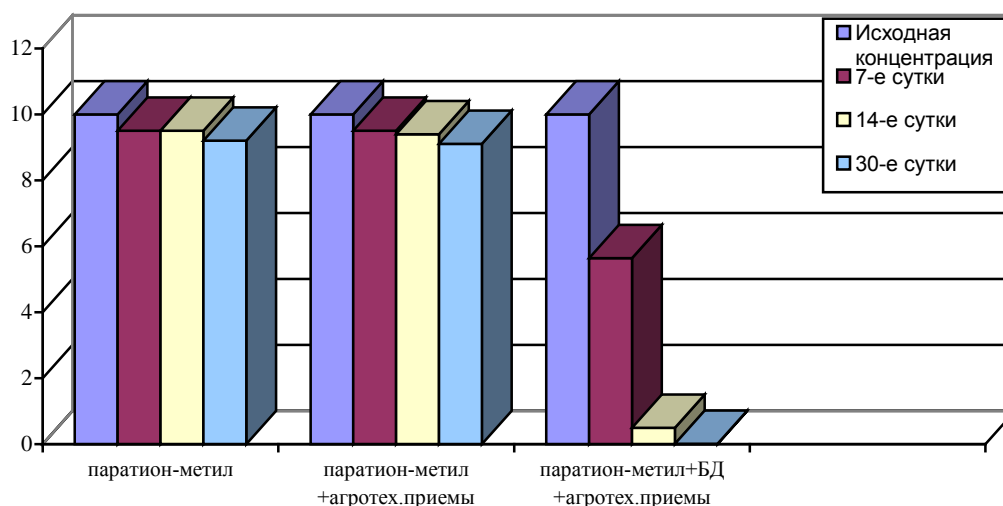
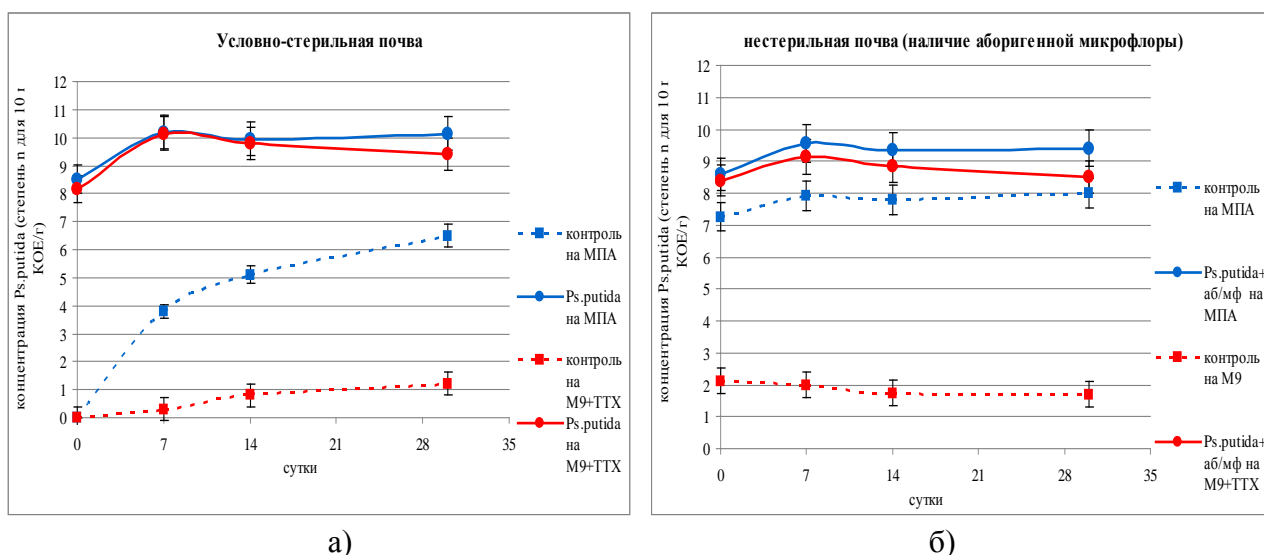


Рисунок 3 – Динамика деградации паратион–метила

Опыты по применению **способа индикации деструкторов** с использованием синтетической среды М9 с прометрином и ТТХ (элективная среда) проводили на единственном модельном деструкторе *Ps. putida* П2. Это было связано с тем, что Метафос и другие агропрепараты на основе паратион–метила запрещены к производству, применению, продаже и ввозу на территории РФ.

Внесение штамма *Ps. putida* П2 в стерильную и нестерильную почву с последующими периодическими высевами на два варианта сред (питательную МПА и элективную М9) показало его конкурентоспособность и сохранение деструктивных свойств в присутствии аборигенной микрофлоры. Концентрация интродуцированного штамма *Ps. putida* П2 на протяжении 30 суток оставалась стабильно высокой, причем на 1–2 порядка выше, чем концентрация аборигенной микрофлоры. Результаты подсчета колоний деструктора, выросших на элективной среде и на МПА, коррелировали между собой (Рисунок 4а и 4б).



а) в стерильной почве; б) в нестерильной почве
Рисунок 4 – Динамика численности микроорганизмов в почве
(на средах МПА и М9)

Создание биопрепарата на основе штамма *Ps. putida* П2 и микрокапсул

Биопрепарат был приготовлен по методике, рекомендованной ЗАО «БНТ», и представлял собой жидкую суспензию штамма–деструктора с концентрацией 10^8 кл/мл, инкубированных с микрокапсулами в количестве 2,5 масс.% в сбалансированном растворе минеральных солей с 0,1 % углевода.

Исследование сорбционных свойств микрокапсул

Для решения задачи иммобилизации клеток модельного штамма на носителе были исследованы пористые микрокапсулы из полимочевины, разработанные ЗАО «БНТ», которые могли обладать способностью к сорбции. Поэтому прежде, чем вносить их в экспериментальные почвы, было проведено исследование их сорбционных свойств (жидкофазная сорбция). В результате инкубирования микрокапсул в растворе «Гезагарда» (агрохимикат с ДВ прометрин) в течение 21 суток выяснили, что они обладают относительной сорбционной емкостью в среднем 11,7 мг ДВ прометрина на 1 г капсул, и что сорбционное равновесие наступает не позднее 3–х суток (Рисунок 5).

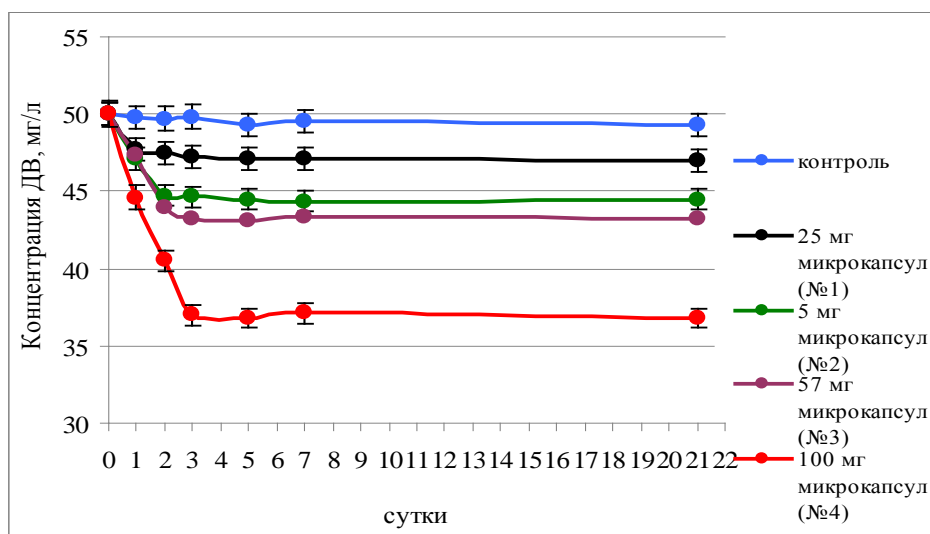


Рисунок 5 – Динамика концентрации прометрина в растворе в зависимости от количества микрокапсул

Однако это не влияло на определение степени биодеструкции, которая оценивалась по уменьшению количества остаточного прометрина в почве, поскольку в процессе пробоподготовки проб почв хлороформом экстрагировался не только свободный прометрин, оставшийся после сорбции, но и связанный с сорбентом, находящимся в образцах почвы (Таблица 1). Следовательно, уменьшение концентрации суммарного прометрина в почве с микрокапсулированным биопрепаратом свидетельствовало исключительно о процессе биодеструкции.

Таблица 1 – Сравнительная динамика изменения концентрации прометрина в почвах с микрокапсулами и без микрокапсул

Образцы	Концентрация прометрина, мг/кг			
	<i>Ex tempore</i>	7 сутки	14 сутки	21 сутки
почва без капсул (контроль)	45,7±2,5	45,3±2,5	44,9±2,5	44,7±2,4
почва с капсулами	45,8±2,5	45,5±2,5	45,1±2,5	44,3±2,4

Далее проводили **инокулирование микрокапсул штаммом–деструктором.**

После инкубирования микрокапсул со штаммом *Ps. putida* П2 нативный препарат был изучен методом микроскопии, результаты фиксировались в виде микрофотографий (Рисунок 6). Выявлено, что клетки бактерий штамма *Ps. putida* П2 инокулируются на внутренних и внешних поверхностях микрокапсул.

Разработка параметров культивирования штамма–деструктора в ферментере

Для приготовления необходимого количества рабочей суспензии штамма–биодеструктора *Ps. putida* П2 его биомасса нарабатывалась на лабораторном ферментере методом глубинного аэробного культивирования в режиме: непрерывном по твердой фазе; периодическом — по жидкой фазе. При изучении процесса роста культуры было замечено, что внесение дополнительного количества питательной добавки в виде раствора глюкозы в середине экспоненциальной фазы роста (Филонов и др., 2008) не приводило к увеличению выхода биомассы и, более того, задерживало время выхода культуры в стационарную фазу. В связи с этим культивирование проводили без дополнительного внесения питательных веществ (Рисунок 7).

Стационарная фаза 1 цикла наступала через 12–14 часов ферментации, во 2 и 3 циклах культивирования выход культуры в стационарную фазу наблюдали на 9–10 часу ферментации. Показатели оптической плотности при таком режиме культивирования в среднем достигали 25–27 оптических единиц, что соответствовало $(4,6±0,2)×10^{10}$ кл/мл. Выход сырой биомассы с каждого этапа составлял (70,4–79,2) г/л. Общий объем наработанной за 3 цикла биомассы после объединения составил около 170 мл с концентрацией клеток $(4,6±0,2)×10^{11}$ кл/мл, что было подтверждено результатом контрольных высевов на МПА.

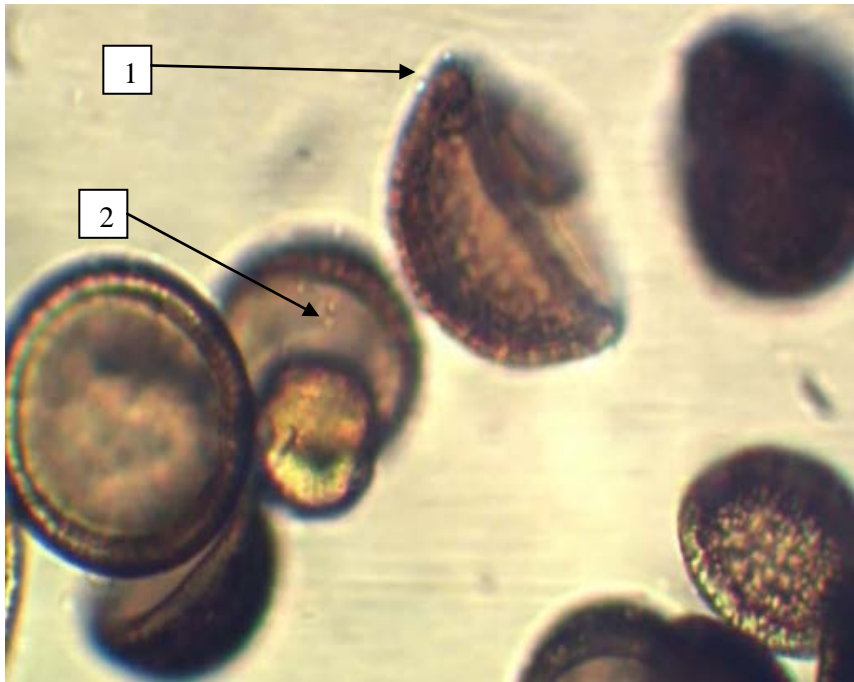


Рисунок 6 — Результат инокуляции микрокапсул бактериями штамма *Ps. putida* П2:
1 – бактерии *Ps. putida* П2, инокулированные на внешней поверхности микрокапсул;
2 – бактерии *Ps. putida* П2, инокулированные на внутренней поверхности микрокапсул

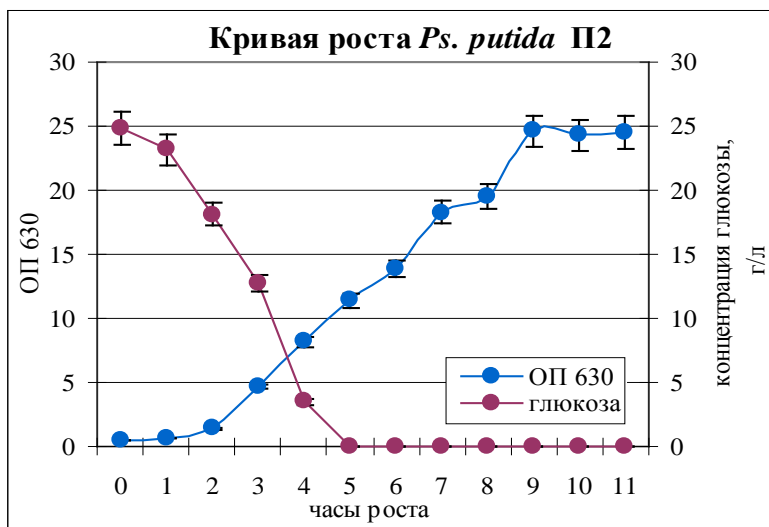


Рисунок 7 – График кривой роста биодеструктора *Ps. putida* П2 при глубинном культивировании в ферментере

Изучение в полевых условиях технологии ремедиации почвы, загрязненной прометрином

Для проведения полевого эксперимента были подготовлены 4 экспериментальных участка площадью по 20 м², оборудованные тентованными навесами для укрытия от дождя, изолированные от прилегающей территории и друг от друга. При помощи специально оснащенной агротехники почва была окультурена на глубину 10–12 см, на все участки был внесен агрохимикат «Гезагард» в качестве модельного пестицида до конечной концентрации прометрина в почве 50 мг/кг (100 ПДК). В соответствии с задачами эксперимента на участках оценивали эффективность технологий ремедиации земель, загрязненных «Гезагардом». Назначение участков и приемы ремедиации приведены в таблице 2.

Для внесения в почву водную бактериальную суспензию штамма деструктора готовили из концентрированной биомассы *Ps. putida* П2 (10^{11} кл/мл) с таким расчетом, чтобы конечная концентрация составляла 10^8 клеток в 1 г сухой почвы для внесения на участок №3, и 10^7 клеток в 1 г сухой почвы для инкубирования с микрокапсулами и внесением этого состава на участок №4.

Таблица 2 — Назначение участков для проведения полевого эксперимента по оценке эффективности применяемых технологических агроприемов внесения разработанных биопрепаратов

№ участка	Задачи эксперимента	Приемы ремедиации загрязненной почвы	Внесенные компоненты
1	Деструкция пестицида под воздействием естественных факторов окружающей среды. Загрязненный контроль	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением)	Гезагард, вода водопроводная
2	Деструкция пестицида в почве под воздействием естественных факторов окружающей среды с применением агротехнических приемов	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением), стимулирование автохтонной микрофлоры	Гезагард, вода водопроводная, углеводно-минеральные добавки
3	Деструкция пестицида в почве под воздействием естественных факторов окружающей среды, с применением агротехнических приемов и влиянием внесенного деструктора в виде водной суспензии	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением), стимулирование автохтонной микрофлоры, внесение суспензии деструктора	Гезагард, вода водопроводная, углеводно-минеральные добавки, водная суспензия биомассы штамма-деструктора <i>P. putida</i> П2 (10^9 кл/мл)
4	Деструкция пестицида в почве под воздействием естественных факторов окружающей среды, с применением агротехнических приемов и влиянием внесенного деструктора в виде микрокапсулированного препарата	агротехнические приемы (полив и аэрация почвы рыхлением), стимулирование автохтонной микрофлоры, внесение капсулированного биопрепарата	Гезагард, вода водопроводная; углеводно-минеральные добавки; водная суспензия биомассы штамма-деструктора <i>Ps. putida</i> П2 (10^8 кл/мл) с микрокапсулами

На протяжении всего эксперимента влажность полевой почвы поддерживали на уровне около 40% от ПВ; участки № 2, 3 и 4 регулярно рыхлили, ежедневно измеряли влажность и температуру почвы на всех участках с регистрацией в полевом журнале. Эффективность проведенных технологических агроприемов оценивали по совокупности показателей, полученных при анализе химических, микробиологических и токсикологических данных.

Изучение степени деструкции прометрина при использовании различных приемов ремедиации

Наибольшая степень деструкции отмечена на участке № 4; значительный эффект снижения концентрации ксенобиотика был и на участке № 3. Применение биодеструктора в составе микрокапсулированного препарата с концентрацией бактерий в почве 10^7 КОЕ/кг оказалось более эффективным, чем внесение суспензии биоде-

структура, концентрация которой была в десять раз больше. При этом на участках № 1 и № 2 концентрация ДВ прометрина снизилась незначительно по сравнению с данными для участков № 3 и № 4. Применение агроприемов без использования биодеструкторов (участок № 2) не оказало заметного влияния на изменение концентрации ДВ прометрина в почве по сравнению с контрольным участком № 1 (Рисунок 8).

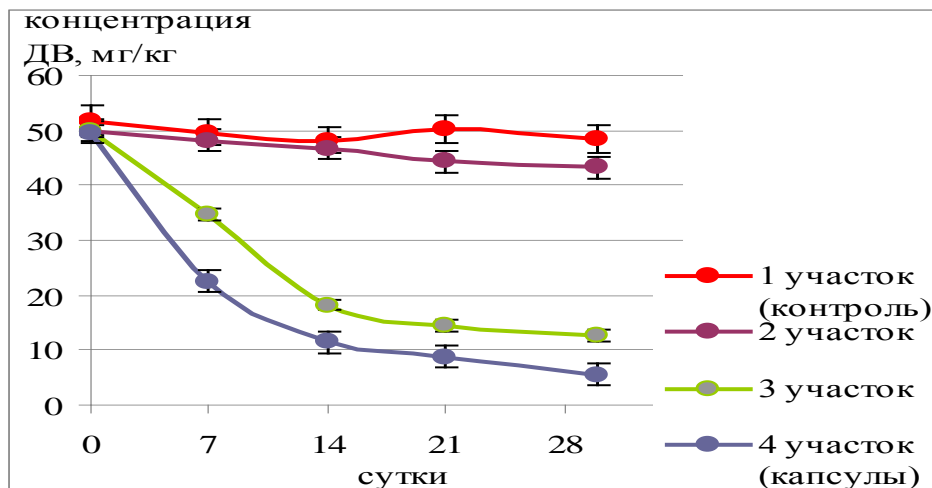


Рисунок 8 — Динамика изменения концентрации ДВ прометрина в почве экспериментальных участков

В связи с тем, что сорбционные свойства микрокапсул не влияют на результаты химического анализа образцов почвы, эффект снижения концентрации пестицида был следствием применения биотехнологических агроприемов и не связан с сорбцией загрязнителя. На основании полученных результатов химического анализа образцов почв, можно констатировать, что применение микрокапсулированного биопрепарата в сочетании с технологическими агроприемами наиболее эффективно по сравнению с другими вариантами процессов биоремедиации.

Изучение численности почвенных микроорганизмов и деструктора при использовании различных приемов ремедиации

Для контроля баланса пула исходных микроорганизмов экспериментальной почвы после внесения интродуцента в высокой концентрации провели сравнительные исследования общего микробиологического состава на начальном этапе и на завершающей стадии эксперимента (Рисунок 9). Была также исследована динамика адаптации и развития внесенного биодеструктора в условиях взаимодействия с аборигенной микрофлорой и под влиянием естественных и антропогенных факторов.

Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из почвы с экспериментальных участков, на которых проводили приемы ремедиации, было идентично по составу доминирующих видов контрольного участка, но различно по численности. Установлено, что 100 ПДК прометрина в почве вызывало угнетение всех изученных микроорганизмов (участок №1). Проведение агроприемов и внесение удобрения слабо стимулировало рост почвенной микрофлоры (участок №2) и их численность была ниже по сравнению с участками №3 и №4, на которых кроме стимулирования биологической активности, вносили деструктор прометрина. При учете на селективной среде численности деструкторов в почве экспериментальных участков выявлено доминирование интродуцированного штамма деструктора над аборигенными культурами, способными использовать препарат (Рисунок 10). Даже стимулирование естественной микрофлоры агроприемами не приводило к размножению деструкторов, их адаптация

происходила очень медленно и в таком количестве они не способны были самостоятельно справиться с загрязнением.

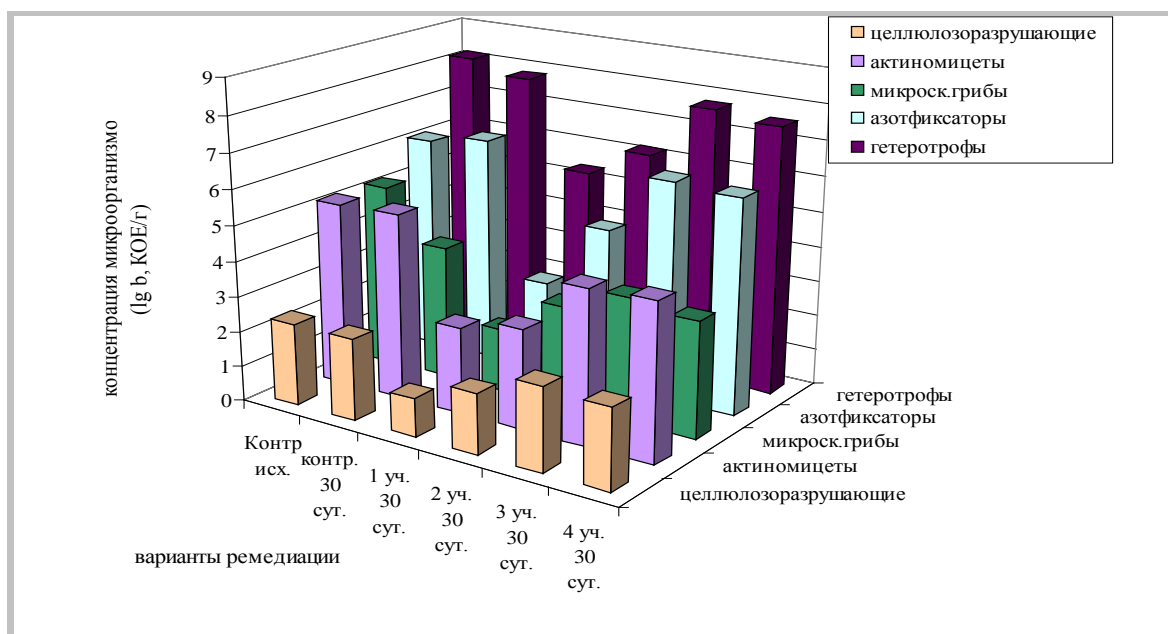


Рисунок 9 — Численность микроорганизмов в почве экспериментальных участков

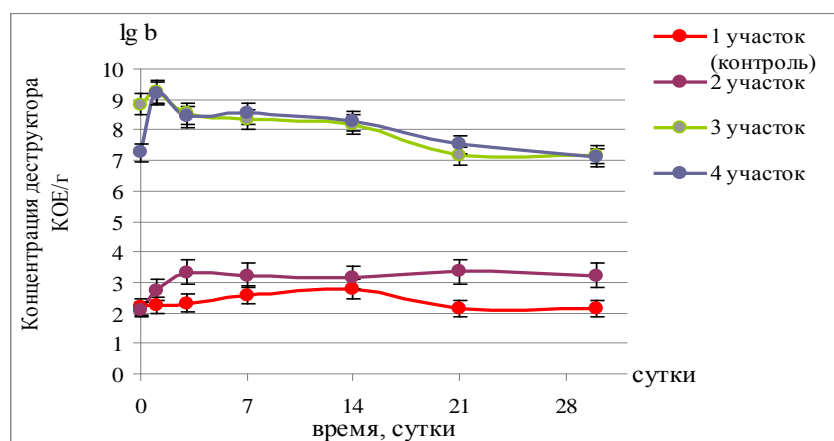


Рисунок 10 — Численность штаммов деструкторов на селективной среде в почве экспериментальных участков

Оценка токсичности почвы после проведенных мероприятий по ремедиации почвы

Сразу после загрязнения почвы «Гезагардом», но до внесения биопрепаратов, с каждого участка были отобраны обобщенные образцы почв для определения исходной токсичности. Через 30 суток для определения остаточной токсичности были отобраны обобщенные образцы почв индивидуально с каждого участка. Результаты расчетов показателей токсичности почв представлены в виде диаграмм на рисунке 11.

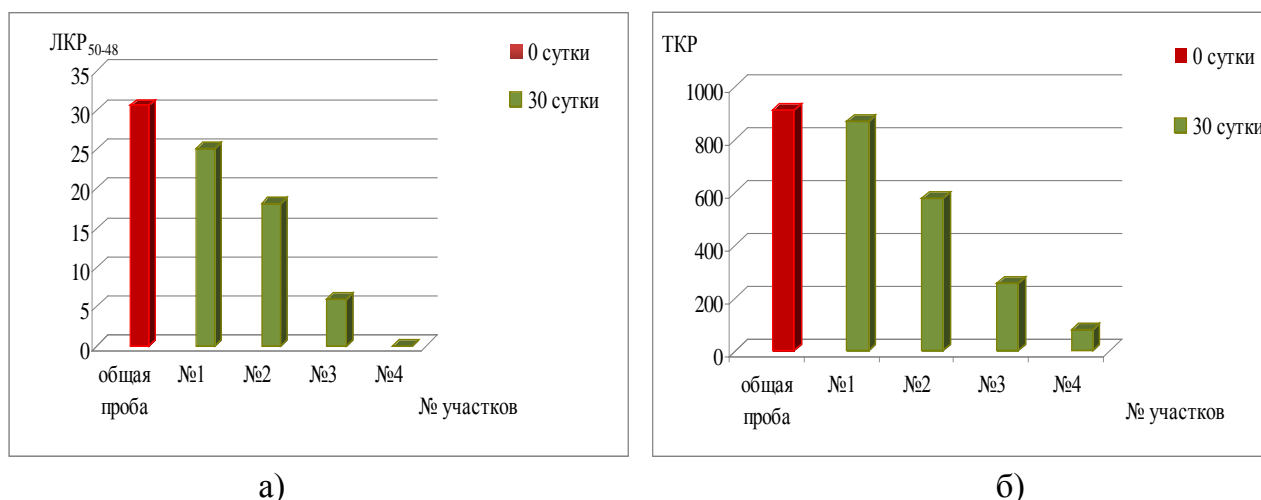


Рисунок 11 — Динамика изменения токсичности экспериментальных почв, загрязненных прометрином, по результатам биотестирования на *Daphnia magna* Straus (а) и на *Chlorella vulgaris* Beijer (б)

Установлено острое токсическое действие на оба тест-объекта почвенных вытяжек исходных загрязненных почв экспериментальных участков. В результате проведенных мероприятий по биоремедиации токсичность почвы участка № 4 значительно снизилась по сравнению с контрольным участком № 1.

Таким образом, при анализе совокупности исследованных показателей выявлено, что под воздействием биотических и абиотических факторов в полевых условиях, но без проведения агротехнических и биоремедиационных мероприятий, концентрация прометрина в почве практически не изменилась. Применение технологических агроприемов без проведения биоремедиации стимулировало активность аборигенной микрофлоры по естественной биодеструкции пестицида, однако ее степень была незначительной. Применение технологических агроприемов в сочетании с внесением штамма-биодеструктора в почву оказало значительное влияние на активность процессов биоремедиации; улучшение экологического состояния почв происходило по всем полученным показателям:

- степень деструкции прометрина в почве составляла почти 70 %;
- внесенные количества биодеструктора не нарушали состава доминирующих видов исходного микробоценоза экспериментальной почвы;
- токсикологические показатели экспериментально загрязненных почвенных систем в процессе ремедиации были значительно ниже, чем в контрольных образцах загрязненных почв.

Наиболее эффективным оказалось применение технологических агроприемов при внесении микрокапсулированного биопрепарата на основе штамма-биодеструктора – степень деструкции прометрина в почве составила 80 %. При этом концентрация клеток биодеструктора в составе микрокапсулированного препарата (и, соответственно, в почве) была в десять раз меньше, чем в суспензии биодеструктора без микрокапсул.

ВЫВОДЫ

1. Из почвы, хронически загрязненной пестицидами, выделены и охарактеризованы штаммы микроорганизмов *Ps. putida* 1.1.2, *Ps. putida* 6.7.2, устойчивые к 100 ПДК (50 мг/кг почвы) прометрина, и *B. subtilis* МФ1, *B. laterosporus*, *B. megaterium*,

B. fastidiosus, *Ps. putida* 8.3.2, *Ochrobactrum thiophenivorans* 6.2.3 – устойчивые к 100 ПДК (10 мг/кг почвы) паратион–метила, которые способны использовать пестицид в качестве единственного источника углерода.

2. Наиболее активными штаммами–деструкторами в экспериментально загрязненных почвенных системах на 7 сутки в лабораторных условиях оказались *Ps. putida* П2 со степенью деградации прометрина 80,83% и *B. subtilis* МФ1 со степенью деградации паратион–метила 98,6%

3. Определены параметры получения биомассы штамма–биодеструктора *Ps. putida* П2 на лабораторном ферментере методом глубинного аэробного культивирования в 3 этапа с выходом культуры в стационарную фазу на 10–14 часу ферментации и получением объема биомассы 168 мл с концентрацией клеток $(4,6 \pm 0,2) \times 10^{11}$ кл/мл.

4. На основе штамма–биодеструктора *Ps. putida* П2, иммобилизованного на микрокапсулах, создан биопрепарат, состоящий из 2,5 масс.% микрокапсул и 97,5 масс.% бактериальной суспензии с концентрацией 10^8 кл/мл. Доказано, что клетки бактерий при инокуляции располагаются на внутренних и внешних поверхностях микрокапсул.

5. В полевых условиях на экспериментальных участках показано, что при использовании только технологии активизации почвенной микрофлоры агротехническими приемами (внесение минерально–углеводных добавок, увлажнение, рыхление) степень деструкции прометрина к 30 суткам составила 16%, а паратион–метила – 9%. При внесении в загрязненную почву соответствующих биодеструкторов степень деградации пестицидов была значительно выше и составляла для прометрина – 70 %, а для паратион–метила – 95 %.

6. Применение микрокапсулированного препарата биодеструктора и внесение его в почву в концентрации 10^7 КОЕ/кг почвы по деструкции пестицида в 10 раз эффективнее, чем внесение суспензии чистого биодеструктора в концентрации 10^8 КОЕ/кг почвы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Определение пестицид–деструктирующей активности бактерий с помощью индикатора дегидрогеназной активности микроорганизмов 2,3,5–трифенилтетразолия хлорида /В.В. Олискевич, С.Э. Третьякова, Н.В. Веденева [и др.] // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества имени Д.И. Менделеева). – 2012. – № 5. – С. 56–61.

2. Оптимизация технологий биоремедиации сельско–хозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагард» / В.В. Олискевич, Н.М. Талаловская, С.Э. Третьякова [и др.] // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2013. – Вып. 2, Т. 13. – С. 101–107.

3. Оценка эффективности комбинированной сорбционной технологии ремедиации разных типов почв, загрязненных тяжелыми металлами / Е.И. Тихомирова, Е.С. Трояновская, С.Э. Третьякова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11, Ч. 2. – С. 137–142.

Публикации в других изданиях

4. Создание биопрепарата на основе штамма–деструктора прометрина *Pseudomonas putida* П2, иммобилизованного на микрокапсулах, для ремедиации загрязненных прометрином почв / С.Э. Третьякова, О.Ю. Ксенофонтова // Экология: синтез

естественнонаучного, технического и гуманитарного знания: Материалы III Всерос. науч.–практ. форума. – Саратов: СГТУ, 2012. – С. 114–118.

5. Использование комбинированной сорбционно–биологической технологии для ремедиации почв, загрязненных пестицидами / С.Э. Третьякова, В.В. Олискевич, Н.М. Талаловская [и др.] // Актуальные проблемы экологии промышленных городов: Материалы Всерос. научно–практ. конф. с международ участием. – Саратов, 2013. – Т.2. – С. 167–171.

6. Оценка токсичности разных типов почв, загрязненных тяжелыми металлами, в процессе ремедиации / Е.С. Трояновская, Е.И. Тихомирова, О.В. Абросимова, Н.В. Веденева, Е.Ф. Соболева, С.Э. Третьякова // Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания: Материалы II Всерос. науч.–практ. форума. – Саратов: СГТУ, 2011. – С. 115–119.

7. Влияние сорбентов на содержание тяжелых металлов в разных типах почв в процессе ремедиации / О.В. Абросимова, Е.С. Трояновская, Е.И. Тихомирова, А.В. Косарев, Е.Ф. Соболева, С.Э. Третьякова // Экология: синтез естественнонаучного, технического и гуманитарного знания: Материалы II Всерос. науч.–практ. форума. – Саратов: СГТУ, 2011. – С. 124–128.

8. Использование комбинаций сорбентов в технологии ремедиации различных типов почв, загрязненных тяжелыми металлами / Е.И. Тихомирова, Е.С. Трояновская, С.Э. Третьякова [и др.] // В сб. материалов международной научно–практической конференции «К 100–летию СГАУ им. Н.И. Вавилова». – Саратов, 2013. – С. 176–180.

9. Разработка методических подходов к использованию комбинированной сорбционно–биологической технологии ремедиации почв, загрязненных пестицидами / Е.И. Тихомирова, С.Э. Третьякова, В.В. Олискевич [и др.] // В сб. материалов I Кавказского экологического форума. – Грозный, 2013. – С. 112–114.