

РАЗРАБОТКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ КОМПОНЕНТАМИ РАКЕТНЫХ ТОПЛИВ

Г. А. Жариков¹ ✉, О. А. Крайнова¹, М. Р. Хайтов², А. И. Марченко¹

¹ Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, п. Большевик, Московская область, Россия

² Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Ракетное топливо, гептил и авиационный керосин, широко используют в двигательных установках космических кораблей «Протон» и «Союз». При падении отделяющихся первых ступеней ракет и в случае аварийных ситуаций компоненты ракетных топлив (КРТ) попадают в окружающую среду, вызывая сильные токсические эффекты. Целью исследования было выделить штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ и изучить их безопасность для биоремедиации загрязненных почв. Из природных почв выделены микроорганизмы, способные разлагать гептил, формалин и авиационный керосин. Получена ассоциация из двух штаммов бактерий *Pseudomonas putida* 5Г и *Rhodococcus erythropolis* 62М/3, отработана методика их применения для рекультивации загрязненной КРТ почвы. Результаты лабораторных и полевых испытаний показали высокую эффективность микробной деструкции загрязнителей, снижение интегральной токсичности и фитотоксичности очищаемой почвы до безопасных уровней, повышение ее биологической активности. Так, было отмечено повышение дегидрогеназной активности в 2,4 раза, гидролазной — в 2,1 раза, целлюлазной — в 5,1 раза. Ассоциацию микроорганизмов можно рекомендовать для рекультивации почв, загрязненных КРТ.

Ключевые слова: ракетное топливо, гептил, диметилгидразин, формальдегид, авиационный керосин, компоненты ракетных топлив, микроорганизмы-деструкторы, биоремедиация почв

Финансирование: исследования проводили в рамках государственных заказов Федерального медико-биологического агентства России (№ 26.008.02.0, № 22.009.21.800).

Вклад авторов: М. Р. Хайтов — общее руководство исследованиями; Г. А. Жариков — планирование и руководство лабораторными и полевыми исследованиями, проведение экспериментов, анализ полученных результатов; О. А. Крайнова — микробиологические исследования (выделение и селекция бактерий-деструкторов ракетных топлив, наработка микробных суспензий для экспериментов, поддержание музея биодеструкторов); А. И. Марченко — микробиологические и биохимические исследования (ферментативная активность почвы), биотестирование почвы на токсичность, статистическая обработка данных.

Соблюдение этических стандартов: работы с животными выполняли в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. Ветеринарные протоколы № 669 и № 677 по штаммам 5Г и 62М/3 утверждены комиссией по биоэтике (протокол № 165/2019 от 19 февраля 2019 г., протокол № 169/2019 от 16 апреля 2019 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Геннадий Алексеевич Жариков
ул. Ленина, д. 102А, п. Большевик, Серпуховский городской округ, Московская область, 142253, Россия; Zharikov@toxicbio.ru

Статья получена: 22.06.2022 **Статья принята к печати:** 18.08.2022 **Опубликована онлайн:** 15.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.031

DEVELOPMENT OF MICROBIAL PREPARATION FOR BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH ROCKET FUEL COMPONENTS

Zharikov GA¹ ✉, Krainova OA¹, Khaitov MR², Marchenko AI¹

¹ Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations of the Federal Medical Biological Agency, Bolshevik, Moscow region, Russia

² National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Heptyl rocket fuel and aviation kerosene are widely used in the propulsion systems of the Proton and Soyuz spacecraft. The propellant components (RFC) enter the environment, causing strong toxic effects, when the separating first stages of rockets fall away or in case of emergencies. The study was aimed to isolate strains of microorganisms-destructors of RFC, as well as to assess their safety for bioremediation of contaminated soils. Microorganisms capable of decomposing heptyl, formalin, and aviation kerosene were isolated from natural soils. An association of two strains of bacterial destructors *Pseudomonas putida* 5G and *Rhodococcus erythropolis* 62M/3 was obtained, and a method of their use in recultivation of soil contaminated with RFC was developed. The results of laboratory and field tests showed high efficiency of the microbial destruction of pollutants, the decrease in integral toxicity and phytotoxicity of the cleaned soil to safe levels, and an increase in the soil biological activity. Thus, dehydrogenase activity increased by 2.4 times, hydrolase activity by 2.1 times, and cellulase activity by 5.1 times. Microbial association can be recommended for recultivation of soil contaminated with RFC.

Keywords: rocket fuel, heptyl, dimethylhydrazine, formaldehyde, aviation kerosene, rocket fuel components, degrading microorganisms, soil bioremediation

Funding: the study was carried out under state orders of the Federal Medical Biological Agency of Russia (№ 26.008.02.0, № 22.009.21.800).

Author contribution: Khaitov MR — general research management; Zharikov GA — planning and management of laboratory and field research, experimental procedure, data analysis; Krainova OA — microbiological testing (isolation and selection of bacterial destructors of rocket fuel, preparation of microbial suspensions for experiments, biodestructor collection maintenance); Marchenko AI — microbiological and biochemical testing (enzyme activity of soil), biotests for assessment of soil toxicity, statistical data processing.

Compliance with ethical standards: animals were treated in accordance with the principles of Good Laboratory Practice. Veterinary protocols № 669 and № 677 for strains 5G and 62M/3 were approved by the Bioethics Commission (protocol № 165/2019 of 19 February 2019, protocol № 169/2019 of 16 April 2019).

✉ **Correspondence should be addressed:** Gennady A. Zharikov
Lenina, 102A, Bolshevik, Serpukhov city district, Moscow region, 142253, Russia; Zharikov@toxicbio.ru

Received: 22.06.2022 **Accepted:** 18.08.2022 **Published online:** 15.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.031

Гептил (несимметричный диметилгидразин — НДМГ) используют в качестве жидкого топлива для вывода на орбиту космических кораблей типа «Протон», «Циклон», «Космос», «Рокот», «Стрела» и автоматических спутников Земли. Широкое использование НДМГ в ракетно-космической технике обусловлено его особыми эксплуатационными свойствами, и замены ему, как горючему, в ближайшем будущем не предвидится [1]. Благодаря его физико-химическим свойствам (высокая летучесть и растворимость в водных растворах) диметилгидразин мигрирует в природной среде, разлагается на ряд высокотоксичных продуктов, длительно сохраняется в почве. НДМГ относится к 1 классу опасности, он обладает канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим («желтые дети») и тератогенным (нарушения эмбрионального развития) действием, вызывая развитие злокачественных опухолей у работающих с ним людей или проживающих на загрязненных территориях [1, 2]. Авиационный керосин, который применяют в пилотируемых кораблях типа «Союз», также высокотоксичен [1].

К настоящему моменту не разработаны действенные, экологически безопасные и дешевые методы очистки почв, загрязненных гептилом и авиационным керосином. Все существующие технологии можно условно разделить на три группы: термические (сжигание); методы глубокого окисления НДМГ с применением водных растворов, содержащих активные вещества, которые реагируют с НДМГ и в одном случае образуют нерастворимые или малорастворимые комплексы, а в другом — способствуют разложению до более простых по своему составу соединений. В основном применяют химические средства (перекись водорода, растворы марганцовокислого калия, негашеную известь), что дорого, экологически вредно и приводит к потере плодородия рекультивируемых почв. Другая разновидность методов включает использование водных растворов, содержащих активные вещества, в частности мета-нитробензойную кислоту, которая при определенных значениях pH среды образует с НДМГ комплексное соединение в виде твердой фазы. Далее, согласно предложенному методу, загрязненные НДМГ растворы подвергают термическому обезвреживанию в специальной печи. Применяют также связывание НДМГ в почве составами, содержащими гуминовые кислоты, торф, шунгит. Однако этот метод не обеспечивает очистку грунта до уровня ПДУ (0,1 мг/кг) [3].

Для детоксикации почвы и нейтрализации НДМГ на поверхности металлоконструкций, стен укрытий и т. д. применяют пероксид кальция, при разложении которого выделяется атомарный кислород, участвующий в реакции распада НДМГ. Недостатком данного способа является низкая степень очистки загрязненных участков, длительный процесс детоксикации [3].

Биологические технологии рекультивации загрязненных территорий являются наиболее предпочтительными ввиду экологической безопасности, низкой себестоимости работ и достаточно высокой эффективности, что было неоднократно продемонстрировано при решении различных экологических задач. Известно большое количество содержащих в своем составе набор бактериальных штаммов с аэробным типом дыхания биологических препаратов экологического назначения, предназначенных для биохимической деструкции и утилизации загрязнителей в основном углеводородной природы (нефти и продуктов ее промышленной переработки) [4–7]. Известны биологические способы, в основе которых

лежит метод управляемого биокомпостирования. При этом используемые биопрепараты созданы на основе микроорганизмов, для которых опасные отходы являются источником питания. При таком способе детоксикации почв не используются токсичные химические соединения, метод экологически безопасен, микроорганизмы-деструкторы после разложения НДМГ погибают из-за недостатка питания, сохраняются биологическая активность и плодородие обрабатываемой почвы [8].

В России и за рубежом все более активно используют микроорганизмы для очистки загрязненной КРТ почвы и воды. Так, на космодроме «Байконур» (Казахстан) проводят исследования по применению аборигенных почвенных микроорганизмов для разложения диметилгидразина. Их выделяют из почвы и затем выращивают в ферментерах для внесения в загрязненную почву [9]. В настоящее время имеются единичные сообщения о видах и ассоциациях микроорганизмов, способных утилизировать НДМГ. Так, разработан способ биодеструкции гептила с использованием ассоциации микроорганизмов *Acinetobacter sp.* Н-1, *Rhodococcus sp.* Н-2, *Arthrobacter sp.* Н-3 [10]. Предложен способ биологической очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов при помощи экибиопрепарата «Центрум-MMS» [11], также способного обеспечить биодеструкцию несимметричного диметилгидразина в водных растворах. Основой экибиопрепарата являются микроорганизмы видов *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-6847 и *Rhodococcus erythropolis* АС-1769. Однако, по данным авторов изобретения, экибиопрепарат «Центрум-MMS» не обладает способностью очищать загрязненную гептилом почву [11].

Разработка и внедрение в практику эффективных технологий биоремедиации загрязненных высокотоксичными КРТ почв крайне актуальны. В настоящее время нет готовых микробных препаратов и высокоэффективных промышленных штаммов бактерий для биоремедиации почвы от НДМГ и авиационного керосина, что и явилось основанием для проведения исследования.

Целью исследования было выделить штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ, а также изучить их эколого-токсикологическую безопасность и возможности применения для биоремедиации загрязненных почв.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе многолетних экспедиционных работ по отбору загрязненных почв и последующих лабораторных исследований в НИЦ ТБП создана коллекция культур микроорганизмов, разлагающих различные токсичные химические вещества (нефтепродукты, полициклические ароматические углеводороды, минеральные масла, фенолы, полихлорированные бифенилы, этиленгликоль, гептил, авиационный керосин, пестициды, иприт, люизит, хлорорганические и фосфорорганические соединения). Для выделения штаммов микроорганизмов, разлагающих гептил и авиакеросин, использовали образцы почв из длительно загрязненных пестицидами и нефтепродуктами территорий, с участков аварийных проливов гептила и с места падения ракеты носителя «Протон-М» — комплекс Байконур, площадка 81 (Казахстан).

Для выделения микроорганизмов-деструкторов КРТ использовали метод накопительных культур и последующий высев на минимальную питательную среду, содержащую в качестве единственного источника

Таблица 1. Численность микроорганизмов-деструкторов и сапрофитной микрофлоры в динамике при проведении микробной биоремедиации почвы в лабораторных условиях, КОЕ/г почвы

Вариант	Продолжительность испытаний, сутки				
	0	7	14	21	30
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	$(3,2 \pm 0,62) \times 10^4$ $< 10^3$ $(1,2 \pm 0,17) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,34) \times 10^5$ $< 10^3$ $(2,7 \pm 0,31) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,21) \times 10^4$ $< 10^3$ $(3,1 \pm 0,24) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^4$ $< 10^3$ $(6,5 \pm 0,24) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,24) \times 10^4$ $< 10^3$ $(6,5 \pm 0,24) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин + микрокапсулированные микроорганизмы	$(3,3 \pm 0,54) \times 10^4$ $< 10^3$ $(1,0 \pm 0,12) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,41) \times 10^5$ $< 10^3$ $(1,6 \pm 0,45) \times 10^5$	$(1,7 \pm 0,38) \times 10^4$ $< 10^3$ $(4,5 \pm 0,34) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,24) \times 10^4$ $< 10^3$ $(7,2 \pm 0,54) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,24) \times 10^4$ $< 10^3$ $(7,2 \pm 0,48) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	$< 10^3$ — $(1,6 \pm 0,48) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,44) \times 10^4$ — $(4,2 \pm 0,61) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,41) \times 10^5$ — $(1,4 \pm 0,37) \times 10^5$	$(2,4 \pm 0,45) \times 10^4$ — $(6,5 \pm 0,59) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,44) \times 10^4$ — $(8,5 \pm 0,24) \times 10^5$
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	— — $(1,5 \pm 0,24) \times 10^5$	— — $(4,5 \pm 0,54) \times 10^5$	— — $(3,8 \pm 0,24) \times 10^5$	— — $(2,5 \pm 0,45) \times 10^6$	— — $(6,5 \pm 0,44) \times 10^6$
Почва чистая (контроль)	— — $(2,7 \pm 1,2) \times 10^6$	— — $(3,2 \pm 0,26) \times 10^6$	— — $(4,3 \pm 0,18) \times 10^6$	— — $(5,4 \pm 0,24) \times 10^6$	— — $(3,4 \pm 0,24) \times 10^6$

Примечание: в колонках приведены показатели для штамма 5Г, штамма 62М/3, сапрофитов почвы.

углерода формальдегид (продукт первичной деструкции гептила) или авиационный керосин [12].

Чистые культуры выделенных микроорганизмов идентифицировали методом МАЛДИ во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино; Россия).

Биомассу микроорганизмов-деструкторов КРТ для лабораторных и полевых экспериментов наращивали на термостатируемой качалке Certomats-BS1 (Sartorius; Швеция) до выхода культуры на стационарную фазу роста (24–48 ч в зависимости от штамма) при температуре 28 °C и скорости 180 об./мин.

В качестве референс-штамма использовали штамм бактерии *Rhodococcus globerulus* 19Ф — биодеструктора НДМГ (гептила) [13].

В лабораторных и полевых экспериментах использовали дерново-подзолистую почву.

Микробную суспензию обрабатывали микрокапсулами на основе полимочевины (ООО «БНТ»; Россия).

Интегральную (суммарную) токсичность проб воды и почвы оценивали на лабораторной культуре рачка *Daphnia magna*, культивируемой в НИЦ ТБП в климатостате. Биотестирование проводили в соответствии с методиками [14, 15].

Определение интегральной токсичности почв проводили биолюминесцентным методом с использованием бактериального теста «Эколюм» (МГУ; Россия) на приборе «Биотокс-10М» (МГУ; Россия) согласно методическим рекомендациям [16, 17].

При определении дегидрогеназной активности почвы в качестве субстрата использовали бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый. Общую гидролазную активность почвы изучали по реакции гидролиза флуоресцеин диацетата. Для оценки целлюлозоразлагающей способности почвы применяли аппликационный метод [18].

Фитотоксичность образцов почвы определяли тестированием на семенах овса по методу О. А. Берестецкого [19].

Содержание авиационного керосина определяли с помощью анализатора нефтепродуктов, инфракрасного спектрометра КН-2 («Новолаб»; Россия) согласно методике [20].

Исследования патогенности (безопасности) микроорганизмов-деструкторов КРТ выполняли в соответствии с методическими указаниями МЗ СССР № 2620-82, № 4263-87 с учетом рекомендаций Всемирной организации здравоохранения [21–23]. Исследования включали в себя изучение вирулентности, токсичности,

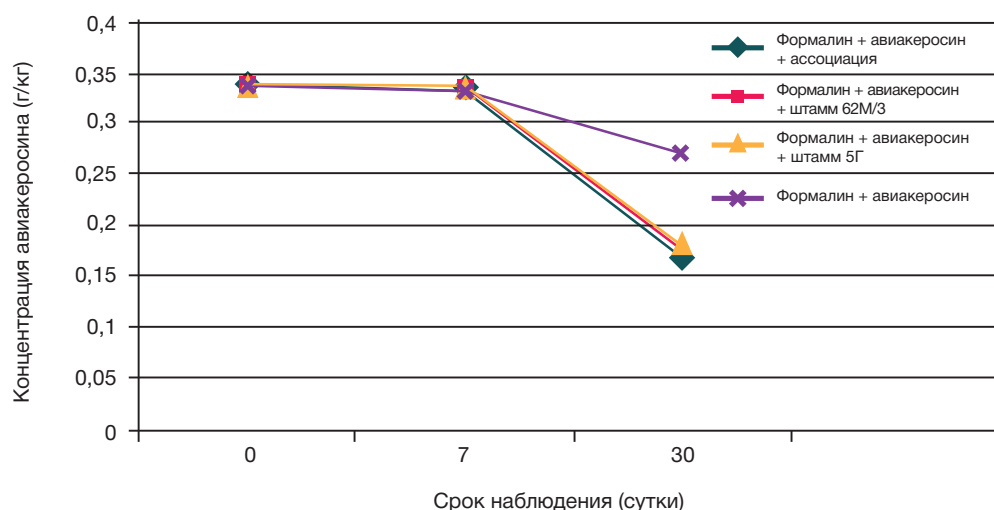


Рис. 1. Разложение авиакеросина микроорганизмами-деструкторами в динамике в лабораторных экспериментах, г / кг почвы

Таблица 2. Определение острой токсичности почвы для дафний во время микробной деструкции формалина и авиакеросина в лабораторных экспериментах

Вариант опыта	Число выживших дафний, <i>n</i>		Гибель дафний, % от контроля	Оказывает/не оказывает острое токсическое действие
	в контроле	в опыте		
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин	30	0	100	Оказывает
Через 7 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	13	57	Оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 14 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	20	33	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 21 сутки				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	18	40	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	15	50	Оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	8	74	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 30 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин + штамм 19Ф (референс-штамм)	30	29	3	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	15	50	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает

токсигенности и диссеминации во внутренних органах белых мышей и крыс.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием пакетов прикладных программ Excel 7.0 (Microsoft; США) и Statistica 10.0 (StatSoft; США). Экспериментальные данные представляли в виде средних арифметических величин и их доверительных интервалов, рассчитанных с вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение микроорганизмов-деструкторов КРТ из загрязненной почвы

Микроорганизмы-деструкторы гептила выделяли из образцов почв, загрязненных НДМГ. Всего было получено более 100 микробных изолятов. Затем микроорганизмы пересеивали на минимальную среду с формальдегидом в градиенте концентрации от 0 до 500 мг/л, длительное время культивировали (до 10 суток), наблюдая за ростом. Штаммы 2Г, 4Г, 5Г, Г8/2, Y-21 были способны расти при

концентрации формальдегида 200 мг/л; референс-штамм 19Ф и штамм Г-803 росли при концентрации 100 мг/л; штаммы 19 С/1 и 37М/1 сохраняли жизнеспособность при концентрации 80 мг/л.

Микроорганизмы-деструкторы авиакеросина выделяли из загрязненных нефтепродуктами почв с территорий аэропортов, нефтебаз, автомобильных заправок. Из 34 полученных изолятов были отобраны шесть наиболее активных штаммов бактерий, растущих на минимальной питательной среде, содержащей 5% дизельного топлива. По результатам проведенных дальнейших лабораторных исследований были выбраны три наиболее активных штамма-деструктора авиакеросина — 12Р, 37М/1 и 62М/3.

По результатам лабораторных исследований на загрязненной почве и оценки параметров роста микроорганизмов на питательной среде для дальнейших экспериментов по созданию ассоциации биодеструкторов КРТ были отобраны штаммы *Pseudomonas putida* 5Г (НДМГ) и *Rhodococcus erythropolis* 62М/3 (авиакеросин). Ассоциация микроорганизмов-деструкторов активно размножалась в загрязненной КРТ почве и разлагала

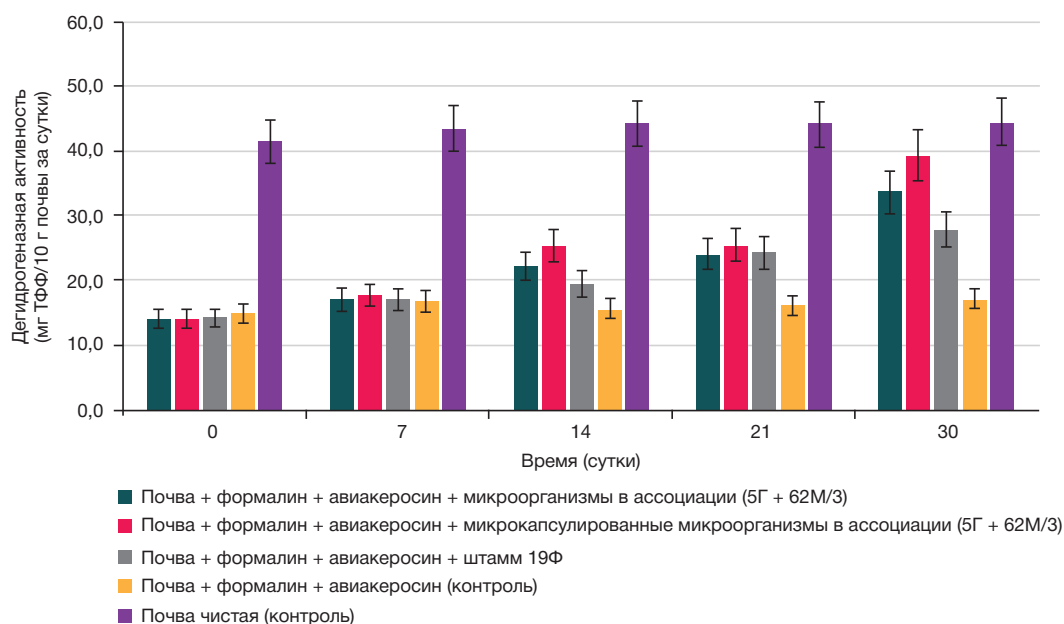


Рис. 2. Дегидрогеназная активность загрязненной формалином (0,05%) и авиакеросином (0,1%) почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

эти токсиканты. Интегральная токсичность загрязненной гептилом и авиакеросином почвы после обработки ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ постепенно снижалась до безопасного уровня, при этом повышалась ее ферментативная активность.

Токсикологические исследования выделенных штаммов микроорганизмов-деструкторов КРТ на лабораторных животных

Исследования патогенности микроорганизмов-деструкторов гептила *Ps. putida* 5Г и авиакеросина *Rh. erythropolis* 62М/3 включали в себя изучение вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации во внутренних органах беспородных белых мышей и крыс. Устанавливали также степень проявления раздражающего действия этих бактерий на слизистую оболочку глаз кроликов.

Вирулентность изучали при однократном введении бактерий внутрижелудочно и внутрибрюшинно белым мышам и крысам. К концу срока наблюдения все

опытные животные были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у животных соответствовали показателям физиологической нормы. Установлено, что при внутрижелудочном введении *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 показатель ЛД₅₀ для крыс и мышей превышал 10⁹ микробных клеток, а при внутрибрюшинном ЛД₅₀ превышала 10⁸ микробных клеток.

Токсичность изучали при внутрибрюшинном введении белым мышам взвесей суточных культур исследуемых штаммов. К концу срока наблюдения все животные опытной группы были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у животных соответствовали показателям физиологической нормы. Показано, что испытанные штаммы *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 не были токсичны для теплокровных животных.

Токсигенность определяли путем внутрибрюшинного и внутрижелудочного введения белым мышам фильтратов 3- и 7-суточных бульонных культур исследуемых штаммов. К концу срока наблюдения все животные были живы. Клиническое состояние, потребление корма и воды у

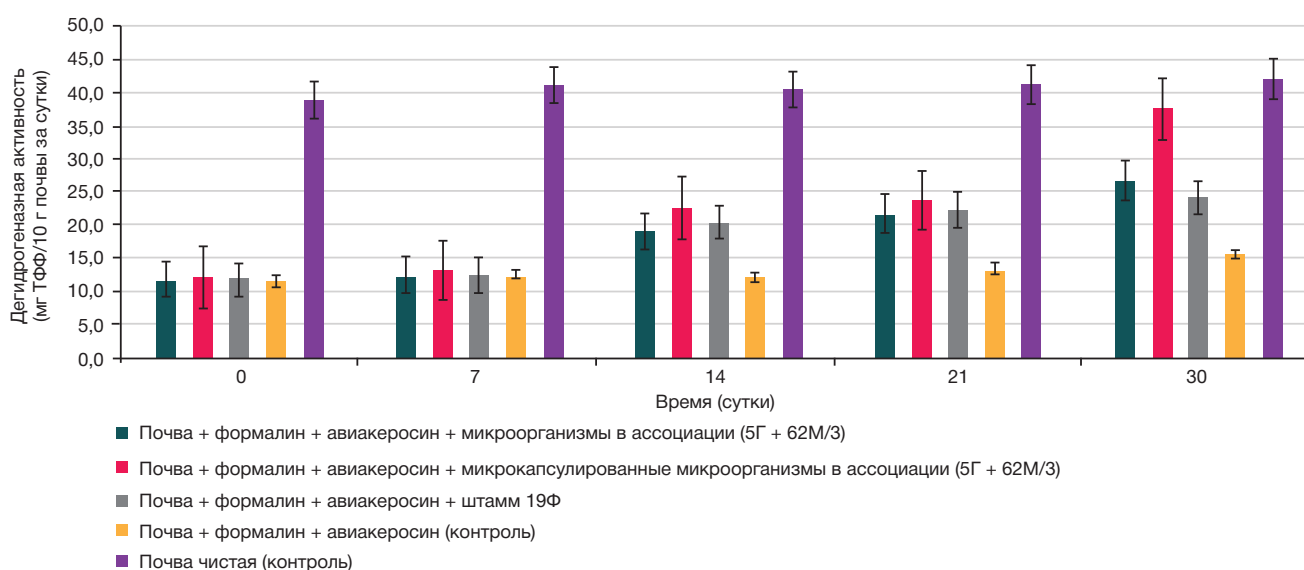


Рис. 3. Гидролазная активность загрязненной формалином и авиакеросином почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

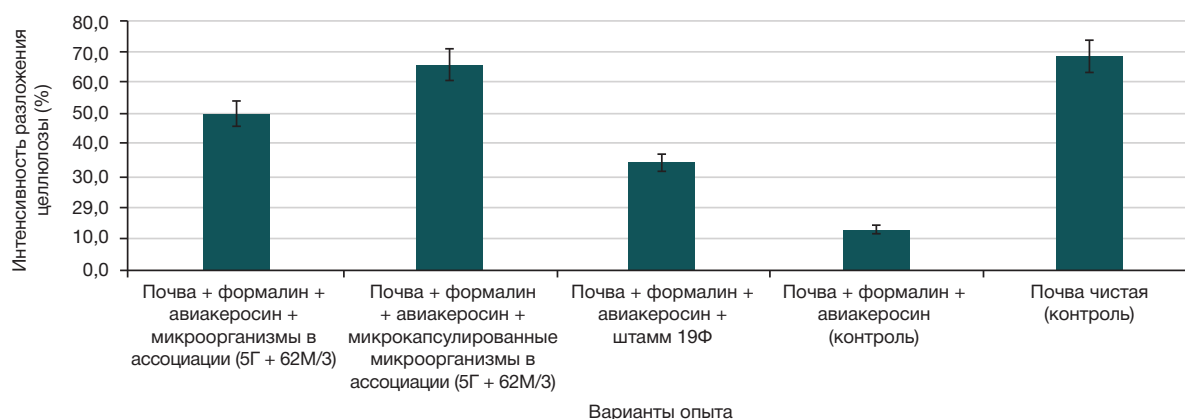


Рис. 4. Гидролазная активность загрязненной формалином и авиакеросином почвы в ходе микробной биоремедиации в лабораторных экспериментах

животных соответствовали показателям физиологической нормы, признаков проявления токсических эффектов у животных отмечено не было. Таким образом, испытанные штаммы микроорганизмов-деструкторов *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 не токсичны для теплокровных животных.

Чтобы исследовать диссеминацию во внутренних органах животных, заражение белых мышей и крыс выделенными штаммами проводили внутрижелудочно и интратрибушно. К концу срока наблюдения гибели животных отмечено не было. При патологоанатомическом вскрытии различия между органами животных опытных и контрольных групп не установлены. Органы грудной и брюшной полостей имели анатомически правильное расположение и нормальную макроструктуру, патологических изменений на макроуровне не обнаружено. Роста культур микроорганизмов в посевах из органов животных не наблюдали. Следовательно, по данным посевов отпечатков органов, изученные штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ не способны к диссеминации и не вызывают бактериального поражения органов теплокровных животных.

При изучении раздражающего действия на слизистую оболочку глаза через 4 ч после внесения микробной суспензии *Ps. putida* 5Г или *Rh. erythropolis* 62М/3 в

конъюнктивный мешок глаза кроликов и на протяжении всего периода наблюдения признаков раздражающего действия выявлено не было. У всех животных состояние глаза, в который вносили бактерии, не отличалось от контрольного. Проведенные исследования показали, что бактерии *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 не обладают раздражающим действием на слизистую оболочку глаз теплокровных животных.

Таким образом, в результате токсикологических исследований по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсичности установлено, что микроорганизмы-деструкторы формальдегида (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, являются непатогенными (безопасными) для теплокровных животных. Микроорганизмы безопасны и могут применяться для биоремедиации загрязненных почв без ограничений.

Определение основных параметров и режимов культивирования микроорганизмов-деструкторов в ферментационной установке

Отобранные нами штаммы *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 имеют различную родовую принадлежность. В связи

Таблица 3. Фитотоксичность загрязненной формалином и авиакеросином почвы для семян овса после биоремедиации почвы в лабораторных экспериментах

Вариант опыта	Вид измерения	Единица измерения	Среднее арифметическое показателей (M ± 6)	Число семян в повторности, n	Число повторностей
Почва + формалин + авиакеросин (отрицательный контроль)	Корни	мм	34,0 ± 23,9	25	3
	Проростки	мм	46,5 ± 30,0		
	Вес (корни и проростки)	г	3,5 ± 0,1		
	Число непроросших семян	n	16		
Почва (контроль)	Корни	мм	62,0 ± 30,0	25	3
	Проростки	мм	45,0 ± 24,6		
	Вес (корни и проростки)	г	4,0 ± 0,4		
	Число непроросших семян	n	7		
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация 5Г+62М/3	Корни	мм	30,5 ± 22,8	25	3
	Проростки	мм	58,0 ± 39,1		
	Вес (корни и проростки)	г	3,3 ± 0,7		
	Число непроросших семян	n	11		

Примечание: М — среднее арифметическое, 6 — стандартное отклонение.

Таблица 4. Численность интродуцированных в почву микроорганизмов и сапрофитной микробиоты в динамике в полевом эксперименте, КОЕ/г

Вариант	Продолжительность испытаний, сутки					
	0	7	14	30	45	60
Почва + формалин + авиакеросин + ассоциация микроорганизмов (5Г + 62М/3)	$(2,4 \pm 0,24) \times 10^5$ $(2,6 \pm 0,28) \times 10^5$ $(5,0 \pm 0,31) \times 10^4$	$(5,9 \pm 0,48) \times 10^6$ $(6,5 \pm 0,55) \times 10^6$ $(2,7 \pm 0,28) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,26) \times 10^6$ $(1,2 \pm 0,27) \times 10^6$ $(1,2 \pm 0,14) \times 10^6$	$(1,2 \pm 0,17) \times 10^6$ $(8,3 \pm 1,03) \times 10^5$ $(1,5 \pm 0,37) \times 10^6$	$(6,0 \pm 0,68) \times 10^5$ $(3,7 \pm 0,34) \times 10^5$ $(9,0 \pm 0,17) \times 10^6$	$(3,0 \pm 0,75) \times 10^5$ $(1,9 \pm 0,20) \times 10^5$ $(1,1 \pm 0,45) \times 10^6$
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	— — $(2,3 \pm 0,41) \times 10^4$	— — $(3,2 \pm 0,24) \times 10^5$	— — $(2,1 \pm 0,21) \times 10^5$	— — $(2,0 \pm 0,31) \times 10^5$	— — $(7,6 \pm 0,27) \times 10^5$	— — $(6,54 \pm 0,48) \times 10^5$
Почва чистая (контроль)	— — $(1,2 \pm 0,45) \times 10^6$	— — $(2,4 \pm 0,48) \times 10^6$	— — $(2,8 \pm 0,34) \times 10^6$	— — $(3,2 \pm 0,21) \times 10^7$	— — $(2,3 \pm 0,48) \times 10^6$	— — $(6,4 \pm 0,25) \times 10^6$

Примечание: в колонках приведены показатели для штамма 5Г, штамма 62М/3, сапрофитов почвы.

с этим была изучена возможность их совместного роста на агаризованной среде (перекрестный посев) на чашках Петри. Угнетения роста при совместном выращивании штаммов не наблюдалось.

Определены основные параметры и режимы культивирования штаммов-деструкторов КРТ *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 на различных питательных средах. Оптимальный режим культивирования штаммов составил 28 °С в течение 24 ч.

Эффективность деструкции 0,05% формалина и 0,1% авиакеросина в почве ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ в лабораторных условиях

Исследования микробной биоремедиации почвы от загрязнения КРТ проводили в лабораторных условиях в пластиковых стаканах емкостью 0,5 л. Рабочие концентрации загрязнителя в почве создавали путем внесения растворов 0,05% (или 500 мг/кг) формалина

Таблица 5. Интегральная токсичность почвы для дафний в полевом эксперименте

Вариант опыта	Число выживших дафний, <i>n</i>		Гибель дафний, % от контроля	Оказывает/не оказывает острое токсическое действие
	в контроле (вода)	в опыте		
Исходная				
Почва + формалин + авиакеросин	30	10	67	Оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает
Через 7 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	20	33	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	14	54	Оказывает
Через 14 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	25	17	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	16	53	Оказывает
Через 30 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	27	10	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	15	50	Оказывает
Через 45 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	27	10	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	14	46	Не оказывает
Через 60 суток				
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	30	30	0	Не оказывает
Почва + формалин + авиакеросин (контроль)	30	20	33	Не оказывает
Почва (контроль)	30	30	0	Не оказывает

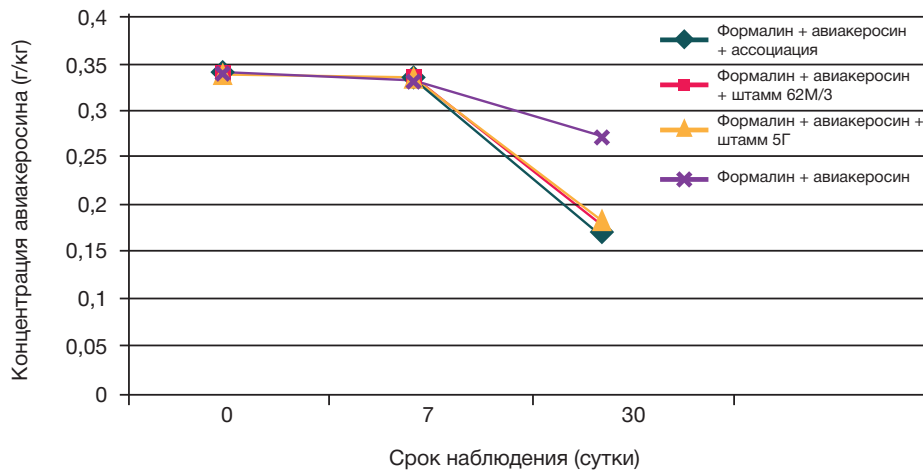


Рис. 5. Концентрация авиакеросина в почве в динамике в ходе полевого эксперимента, г/кг почвы

(имитатор гептила, продукт его первичного разложения) и 0,1% (или 1000 мг/кг) авиационного керосина.

Пробы почвы для проведения химических анализов и определения токсичности отбирали до внесения микроорганизмов-деструкторов, через 7, 14, 21 и 30 суток (по окончании эксперимента).

В процессе эксперимента проводили целый комплекс исследований, в том числе определение концентрации авиакеросина, интегральной токсичности почвы на дафниях, концентраций микроорганизмов-деструкторов и почвенной микрофлоры, дегидрогеназной, гидролазной и целлюлозоразлагающей активности, фитотоксичности для семян овса.

Изучение микробной обсемененности почвы показало, что численность микроорганизмов-деструкторов гептила и авиационного керосина сохранялась в почве в течение всего срока биоремедиации, их подавляла сапрофитная микрофлора (табл. 1). Численность сапрофитной микробиоты почвы во время всего эксперимента оставалась практически на одном уровне (табл. 1).

В ходе микробной ремедиации концентрация загрязнителя в почве постепенно снижалась (рис. 1).

Биотестированием на дафниях определена интегральная токсичность загрязненной почвы до и

после обработки микроорганизмами-деструкторами. До обработки загрязненная авиакеросином и формалином почва вызывала гибель 100% дафний. После 14 суток микробной ремедиации токсичность почвы снижалась до безопасного уровня (табл. 2).

Определена ферментативная активность загрязненной почвы (дегидрогеназная, гидролазная и целлюлазная) до и после обработки микроорганизмами-деструкторами. Загрязнение почвы авиакеросином и формалином вызывало снижение ферментативной активности. После 30 суток микробной ремедиации ферментативная активность почвы постепенно повышалась (рис. 2–4).

В ходе микробной ремедиации фитотоксичность почвы значительно снизилась, а по показателям «Длина проростков» и «Число непроросших семян» приблизилась к уровню условно-чистой почвы (табл. 3).

Полевые испытания микробной деструкции формалина и авиакеросина в почве ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ

Изучение микробной деструкции гептила и авиакеросина в почве проводили в полевых условиях на экспериментальных делянках. Рабочие концентрации загрязнителя в

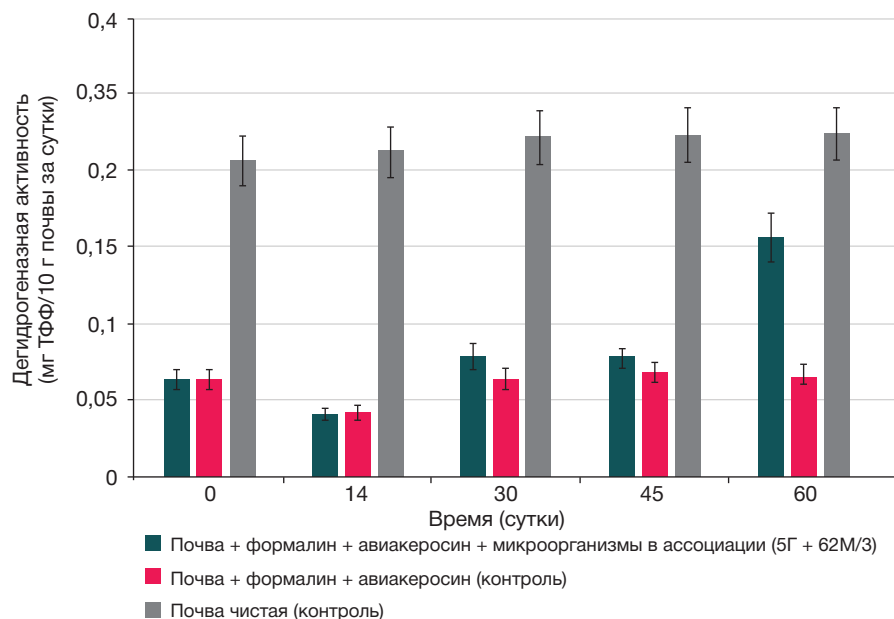


Рис. 6. Дегидрогеназная активность почвы в полевом эксперименте

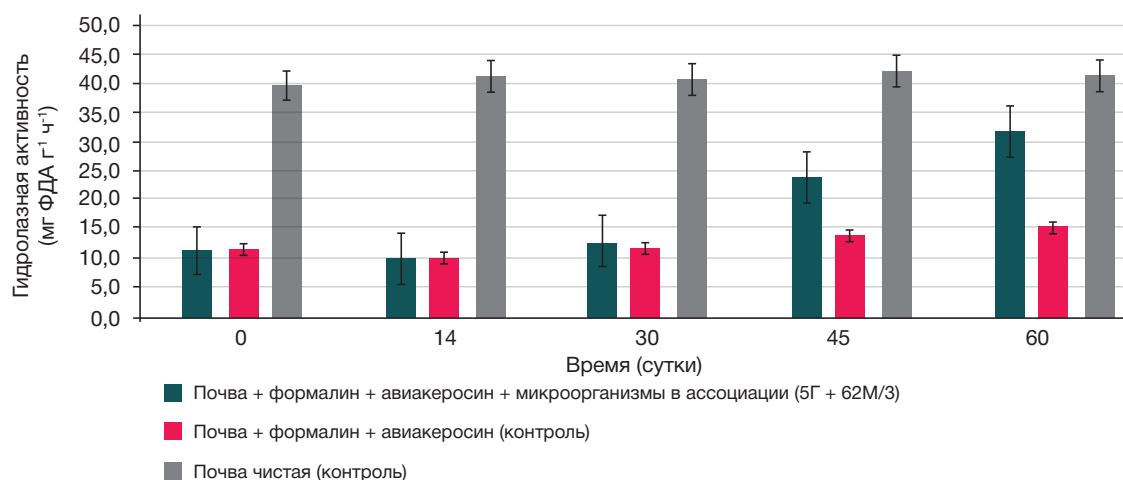


Рис. 7. Гидролазная активность почвы в полевом эксперименте

почве создавали путем внесения 0,1% формалина и 0,1% авиакеросина. Микробную ассоциацию штаммов-деструкторов *Ps. putida* 5Г и *Rh. erythropolis* 62М/3 вносили в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл из расчета 1 л/м² почвы. Отбор проб почвы для исследований проводили в течение 60 суток. Экстракт из почвенных образцов высевали на чашки Петри с гидролизатом рыбной муки и формалином (100 мг/л) для штамма 5Г, на чашки Петри с минимальной солевой средой и 1% дизельного топлива для штамма 62М/3. Концентрацию сапрофитных (аборигенных) бактерий определяли на среде ГРМ.

В ходе полевого эксперимента проводили комплекс исследований, а именно определение в почве концентрации авиакеросина, интегральной токсичности почвы на дафниях, численности микроорганизмов-деструкторов и почвенной микробиоты (табл. 4), дегидрогеназной, гидролазной и целлюлозоразлагающей активности, фитотоксичности.

Исходная численность обоих штаммов (после внесения в почву) находилась на уровне 10^5 КОЕ/г почвы, почвенных сапрофитов — на уровне 10^4 КОЕ/г почвы. Максимальная численность бактерий наблюдалась на 7-е сутки: она составила $(5,9 \pm 0,48) \times 10^6$ КОЕ/г почвы для штамма 5Г, $(6,5 \pm 0,55) \times 10^6$ КОЕ/г почвы для штамма 62М/3. Начиная с 45-х суток происходило небольшое снижение численности биодеструкторов в связи с разложением ими загрязняющих веществ в почве и соответствующим

уменьшением необходимых для их существования питательных субстратов. Численность сапрофитных бактерий в загрязненной почве достигла максимальных значений на 60-е сутки опыта. В чистой почве численность сапрофитных микроорганизмов оставалась практически на одном уровне в течение всего эксперимента.

Обработанная формалином и авиакеросином почва в начале эксперимента обладала высокой токсичностью для дафний (табл. 5). В ходе эксперимента обработанная микроорганизмами загрязненная почва стала нетоксичной к 7-м суткам.

Концентрация авиационного керосина в почве во время биоремедиации постепенно снижалась (рис. 5).

Ферментативная активность почвы во время биоремедиации претерпела значительные изменения (рис. 6–8).

Как показали результаты исследований, при внесении формалина и авиакеросина биологическая активность почвы значительно снизилась. Так, дегидрогеназная и гидролазная активности почвы на 7-е сутки полевого эксперимента составили 19 и 24% соответственно в исследуемых вариантах по сравнению с чистой почвой (контроль). Начиная с 30-х суток эксперимента наблюдалось увеличение биологической активности в загрязненной почве, обработанной микроорганизмами-деструкторами. Через 60 суток показатели ферментативной активности почвы существенно превышали аналогичные показатели

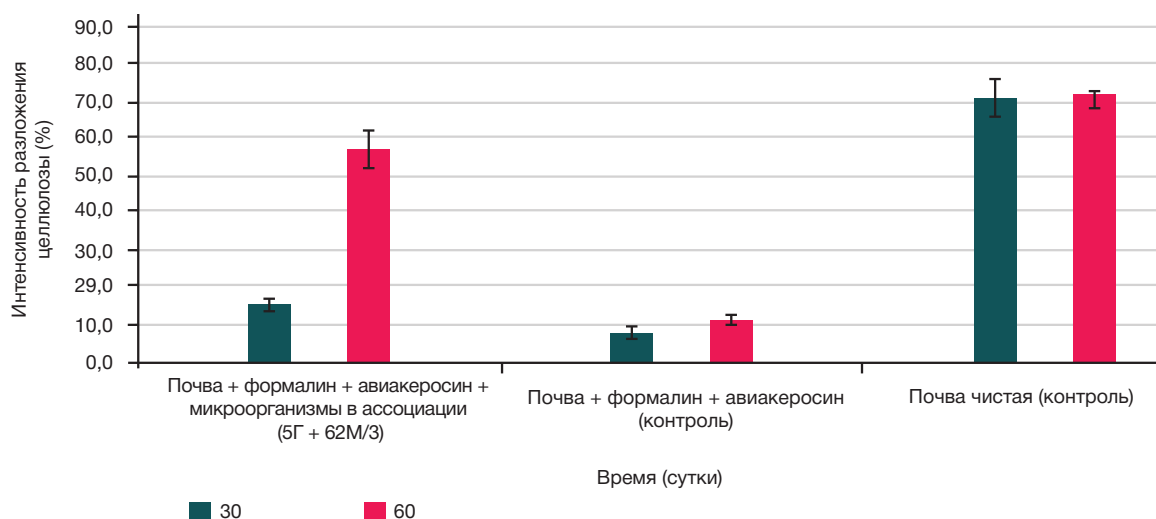


Рис. 8. Целлюлазная активность (%) в почве в полевом эксперименте

Таблица 6. Фитотоксичность почвы для семян овса на 60-е сутки полевого эксперимента

Варианты опыта	Вид измерения	Единица измерения	Среднее арифметическое показателей ($M \pm 6$)	Число семян в повторности, n	Число повторностей
Контроль (чистая почва)	Корни	мм	$76,9 \pm 45,3$	25	3
	Проростки	мм	$49,8 \pm 18,7$		
	Вес (корни и проростки)	г	$4,2 \pm 0,1$		
	Число непроросших семян	n	6		
Почва + формалин + авиакеросин	Корни	мм	$72,2 \pm 37,3$	25	3
	Проростки	мм	$46,2 \pm 16,9$		
	Вес (корни и проростки)	г	$3,9 \pm 0,1$		
	Число непроросших семян	n	14		
Почва + формалин + авиакеросин + микроорганизмы в ассоциации (5Г + 62М/3)	Корни	мм	$78,4 \pm 29,0$	25	3
	Проростки	мм	$53,4 \pm 20,4$		
	Вес (корни и проростки)	г	$4,4 \pm 0,1$		
	Число непроросших семян	n	7		

Примечание: М — среднее арифметическое, 6 — стандартное отклонение.

в загрязненной почве без микробной ремедиации: дегидрогеназная активность почвы — в 2,4, гидролазная — в 2,1, целлюлазная — в 5,1 раза.

В ходе полевого эксперимента определена фитотоксичность загрязненной формалином и авиационным керосином почвы. К 60-м суткам выявлено снижение фитотоксичности рекультивированной почвы для семян овса по показателям «Длина проростков и корней», «Число непроросших семян» до уровня чистой почвы (табл. 6).

В ходе полевого эксперимента выявлено снижение острой токсичности и фитотоксичности очищаемой почвы, повышение ее биологической активности (уровни дегидрогеназ, гидролаз, целлюлаз).

Микроорганизмы-деструкторы КРТ *Ps. putida* штамм 5Г и *Rh. erythropolis* штамм 62М/3 депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номерами ВКМ Ас-2933Д и ВКМ В-3636 Д.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено выделение из почв, длительное время загрязненных диметилгидразином и авиационным керосином, микроорганизмов, способных разлагать эти вещества. В ходе лабораторных исследований отобраны два наиболее активных штамма микроорганизмов — биодеструктора формальдегида (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и биодеструктора авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3. Отработаны режимы их раздельного и совместного культивирования.

По результатам токсикологических исследований на белых мышках и крысах, по показателям вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации установлено, что *Ps. putida*, штамм 5Г, и *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, являются непатогенными (безопасными) для теплокровных животных. Микроорганизмы можно применять для биоремедиации загрязненных почв без ограничений.

Результаты лабораторных экспериментов показали, что обработка загрязненной формалином и авиационным керосином почвы ассоциацией микроорганизмов-деструкторов КРТ в течение 30 суток приводит к снижению загрязнения почвы, уменьшению ее интегральной токсичности и фитотоксичности. В ходе микробной ремедиации ферментативная активность почвы постепенно повышалась до уровня незагрязненной почвы.

Результаты полевого эксперимента показали, что ассоциация микроорганизмов, состоящая из биодеструктора формалина (гептила) *Ps. putida*, штамм 5Г, и биодеструктора авиакеросина *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, пригодна для очистки почв, загрязненных КРТ. Внесенные в загрязненную почву микроорганизмы-деструкторы КРТ не подавляются аборигенной микрофлорой и активно размножаются.

Выделенные штаммы микроорганизмов-деструкторов КРТ можно без ограничений применять на российских космодромах и «Байконуре» (Казахстан) для очистки загрязненных территорий.

Осуществление комплекса мероприятий по детоксикации загрязненной КРТ почвы позволит снизить риск возникновения профпатологий у работников, занятых на работах по биоремедиации почвы и при утилизации ракетной техники.

ВЫВОДЫ

Результаты лабораторных и полевых испытаний ассоциации микроорганизмов-деструкторов компонентов ракетных топлив (КРТ) *Pseudomonas putida*, штамм 5Г, и *Rhodococcus erythropolis*, штамм 62М/3, показали ее высокую эффективность в очистке от КРТ и экологическую безопасность. Ассоциацию микроорганизмов *Ps. putida*, штамм 5Г, и *Rh. erythropolis*, штамм 62М/3, можно рекомендовать для практического применения — биоремедиации загрязненной КРТ почвы.

Литература

1. Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ. 1,1-диметилгидразин. Регистрационный номер ВТ-002431. Available from: <https://www.rpohv.ru/online/detail.html?id=2431>.
2. Петрова З. М., Остапенко Н. С., Бойцова Л. В. Миграция несимметричного диметилгидразина и его производных при рекультивации загрязненных почв. Почвоведение. 1999; 12: 1502–8.
3. Пимкин В. Г., Качин В. Г. Методы и средства локализации и обезвреживания КРТ в окружающей среде. СПб.: Изд-во РНЦ прикладной химии, 1992; 184 с.
4. Емельянова Е. К., Алексеев А. Ю., Мокеева А. В. Биорекультивация загрязненных нефтью объектов в Тюменской области. Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2010; 8 (4): 155–61.
5. Малахина Л. В., Шайдуллина И. А., Антонов Н. А. Применение биопрепарата «Гумакс» и аборигенных штаммов микроорганизмов-деструкторов нефти в сочетании с нанобентонитом для рекультивации типичных и выщелоченных черноземов со смешанным типом нефтезагрязнения. Сборник научных трудов ТатНИПИнефть ПАО «Татнефть». М., 2016; с. 298–307.
6. Олискевич В. В., Талаловская Н. М., Третьякова С. Э. Оптимизация технологии биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагарт». Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. 2013; 13 (2): 101–7.
7. Четвериков С. П. Микробиологические методы рекультивации нефтезагрязненных земель. Уральский экологический вестник. 2012; 4 (33): 34–5.
8. Пимкин В. Г., Сулима Т. А., Софьин А. П. Дезактивация почв после аварийных и технологических проливов НДМГ. В сборнике: Экологические аспекты воздействия компонентов жидких ракетных топлив на окружающую среду. Материалы научно-практической конференции. СПб.: Изд-во РНЦ прикладной химии, 1996; с. 91–104.
9. Технологический регламент на детоксикацию почв, загрязненных несимметричным диметилгидразином и продуктами его химической трансформации комбинированным методом. Национальное космическое агентство республики Казахстан. Алматы, 2012; 18 с.
10. Способ биодеструкции гептила. Патент РФ № 98102248А. 11.02.1998.
11. Забокрицкий А. А., Савиных Д. Ю., Тарабара А. В., Зорин А. Д., Забокрицкий Н. А., Занозина В. Ф. и др. Биологический деструктор несимметричного диметилгидразина. Патент РФ № 2650864. 17.04.2018.
12. Звягинцев Д. Г., редактор. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991; 304 с.
13. Жариков Г. А., Крайнова О. А., Капранов В. В., Дядищева В. П., Киселева Н. И. Штамм бактерий *Rhodococcus globerulus* 19Ф, разлагающий 1,1-диметилгидразин (гептил). Патент РФ № 2236453. 18.09.2002.
14. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06. Издание 2021 г. 16.1:2:2.2:2.3:3.9-06 ФР.1.39.2021.40207; 15 с.
15. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний ФР.1.39.2001.00283; 34 с.
16. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 Т 16.1:2:3:3.8-04. М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2010; 22 с.
17. Методика определения токсичности химических веществ, полимеров, материалов и изделий с помощью биотеста «Эколюм». Методические рекомендации N 01.018-07. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2014; 14 с.
18. Минеев В. Г., редактор. Практикум по агрохимии. 2 изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, 2001; 689 с.
19. Берестецкий О. А. Методы определения токсичности почвы. Микробиологические и биохимические исследования почв. Киев: Изд-во «Урожай», 1971; 208 с.
20. Методика измерений массовой концентрации нефтепродуктов в питьевых, поверхностных и сточных водах методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф 14.1:2:4.5-95. М.: Министерство природных ресурсов Российской Федерации; 2011; 18 с.
21. Методические указания по гигиенической оценке микробиологических средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов (МУ № 2620-82). 1982; 24 с.
22. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды (МУ № 5789/1-91). 1991; 23 с.
23. Шеина Н. И. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза. Вестник ОГУ. 2012; 6 (142): 165–9.

References

1. Rossijskij registr potencial'no opasnyh himicheskij i biologicheskij veshhestv. 1,1-dimetilgidrazin. Registracionnyj nomer VT-002431. Available from: <https://www.rpohv.ru/online/detail.html?id=2431>. Russian.
2. Petrova ZM, Ostapenko NS, Bojцова LV. Migracija nesimmetrichnogo dimetilgidrazina i ego proizvodnyh pri rekul'tivacii zagraznennyh pochv. Pochvovedenie. 1999; 12: 1502–8. Russian.
3. Pimkin VG, Kachin VG. Metody i sredstva lokalizacii i obezvezhivaniya KRT v okruzhajushhej srede. SPb.: Izd. RNC prikladnoj himii, 1992; 184 p. Russian.
4. Emeljanova EK, Alekseev AJu, Mokeeva AV. Biorekul'tivacija zagraznennyh neftju objektov v Tjumenskoj oblasti. Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Biologija, klinicheskaja medicina. 2010; 8 (4): 155–61. Russian.
5. Malyhina LV, Shajdullina IA, Antonov NA. Primenenie biopreparata "Gumaks" i aborigennyh shtamov mikroorganizmov-destruktorov nefti v sochetanii s nanobentonitom dlja rekul'tivacii tipichnyh i vyshhelochennyh chernozemov so smeshannym tipom neftezagraznenija. Sbornik nauchnyh trudov TatNIPIneft' PАО «Tatneft'». M., 2016; p 298–307. Russian.
6. Olskevich VV, Talalovskaja NM, Tretjakova SJ. Optimizacija tehnologii bioremediacii sel'skohozjajstvennyh zemel', zagraznennyh gerbicomom "Gezagard". Izvestija Saratovskogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Jekologija. 2013; 13 (2): 101–7. Russian.
7. Chetverikov SP. Mikrobiologicheskie metody rekul'tivacii neftezagraznennyh zemel'. Ural'skij jekologicheskij vestnik. 2012; 4 (33): 34–35. Russian.
8. Pimkin VG, Sulima TA, Sofin AP. Dezaktivacija pochv posle avariynyh i tehnologicheskij prolivov NDMG V sbornike: Jekologicheskie aspekty vozdejstvija komponentov zhidkih raketnyh topliv na okruzhajushhuju sredu. Materialy nauchno-prakticheskij konferencii. SPb.: Izd-vo RNC prikladnoj himii, 1996; p. 91–104.
9. Tehnologicheskij reglament na detoksikaciju pochv, zagraznennyh

- nesimmetrichnym dimetilgidrazinom i produktami ego himicheskoy transformacii kombinirovannym metodom. Nacional'noe kosmicheskoe agentstvo respubliki Kazahstan. Almaty, 2012; 18 p.
10. Sposob biodestrukcii geptila. Patent RF № 98102248A. 11.02.1998.
 11. Zabokrickij AA, Savinyh DJu, Tarabara AV, Zorin AD, Zabokrickij NA, Zanozina VF i dr. Biologicheskij destruktory nesimmetrichnogo dimetilgidrazina. Patent RF № 2650864. 17.04.2018.
 12. Zvjagincev DG, editor. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. M.: Izd-vo MGU, 1991; 304 p. Russian.
 13. Zharikov GA, Krajnova OA, Kapranov VV, Djadishheva VP, Kiseleva NI. Shtamm bakterij *Rhodococcus globerulus* 19F, razlagajushhij 1,1-dimetilgidrazin (geptil). Patent RF № 2236453. 18.09.2002.
 14. Metodika opredelenija toksichnosti vodnyh vytjazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod i othodov, pit'evoy, stochnoj i prirodnoj vody po smertnosti test-objekta *Daphnia magna* Straus. PND F T 14.1:2:3:4.12-06. Izdanie 2021 g. 16.1:2:2:2.3:3.9-06 FR.1.39.2021.40207; 15 p. Russian.
 15. Metodika opredelenija toksichnosti vody i vodnyh vytjazhek iz pochv, osadkov stochnyh vod, othodov po smertnosti i izmeneniju plodovitosti dafnij. FR.1.39.2001.00283; 34 p. Russian.
 16. Metodika opredelenija integral'noj toksichnosti poverhnostnyh, v tom chisle morskikh, gruntovyh, pit'evykh, stochnyh vod vodnyh jekstraktov pochv, othodov, osadkov stochnyh vod po izmeneniju intensivnosti bakterial'noj bioluminescencii test-sistemoy "Jekoljum". PND F T 14.1:2:3:4.11-04 T 16.1:2:3:3.8-04. M.: Ministerstvo prirodnyh resursov Rossijskoj Federacii, 2010; 22 p. Russian.
 17. Metodika opredelenija toksichnosti himicheskikh veshhestv, polimerov, materialov i izdelij s pomoshh'ju biotesta "Jekoljum". Metodicheskie rekomendacii N 01.018-07. M.: Federal'nyj centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2014; 14 p. Russian.
 18. Mineev VG, editor. Praktikum po agrohimii. 2 izd., pererab. i dop. M.: Izd-vo MGU, 2001; 689 p. Russian.
 19. Beresteckij OA. Metody opredelenija toksichnosti pochvy. Mikrobiologicheskie i biohimicheskie issledovaniya pochv. Kiev: Izd-vo "Urozhaj", 1971; 208 p. Russian.
 20. Metodika izmerenij massovoj koncentracii nefteproduktov v pit'evykh, poverhnostnyh i stochnyh vodah metodom IKSpektrometrii. PND F 14.1:2:4.5-95. M.: Ministerstvo prirodnyh resursov Rossijskoj Federacii; 2011. 18 p. Russian.
 21. Metodicheskie ukazaniya po gigienicheskoj ocenke mikrobiologicheskikh sredstv zashhity rastenij ot nasekomykh i boleznij na osnove nesporoobrazujushhikh mikroorganizmov (MU № 2620-82). 1982; 24 p. Russian.
 22. Metodicheskie ukazaniya po jeksperimental'nomu obosnovaniju PDK mikroorganizmov-producentov i soderzhashhikh ih gotovykh form preparatov v ob#ektah proizvodstvennoj i okruzhajushhej sredy (MU № 5789/1-91). 1991; 23 p. Russian.
 23. Sheina NI. Kriterii ocenki patogennykh svojstv shtammov-producentov, predlagaemykh dlja ispol'zovanija v promyshlennosti mikrobiologicheskogo sinteza. Vestnik OGU. 2012; 6 (142): 165–9.