



Biogeosystem Technique

Issued since 2014.

E-ISSN 2413-7316
2023. 10(2). Issued 2 times a year

EDITORIAL BOARD

Editors in Chief

Cerdà Artemi – University of Valencia, Spain
Kalinitchenko Valery – Institute of Soil Fertility of South Russia, Persianovsky, Russian Federation

Deputy Editor in Chief

Ghazaryan Karen – Yerevan State University, Yerevan, Armenia

Blagodatskaya Evgeniya – Institute of Physical Chemical and Biological Problems of Soil Science of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

Elizbarashvili Elizbar – Iakob Gogebashvili Telavi State University, Telavi, Georgia

Glazko Valery – Moscow agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Russian Federation

Lisetskii Fedor – Belgorod State University, Russian Federation

Minkina Tatiana – Southern Federal University, Russian Federation

Kızılkaya Rıdvan – Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Turkey

Okolelova Alla – Volgograd State Technical University, Russian Federation

Shein Evgeny – Moscow State University named M.V. Lomonosov, Russian Federation

Srivastava Sudhakar – Banaras Hindu University, Varanasi, India

Swidsinski Alexander – Molecular Genetic Laboratory for Polymicrobial Infections und Biofilms, Charite University Hospital, Berlin, Germany

Rajput Vishnu – Academy of Biology and Biotechnology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Surai Peter – Feed-Food.ltd, Scotland, UK

Zhao Xionghu – China University of Petroleum, Beijing, China

Journal is indexed by: **Cross Ref** (USA), **Electronic scientific library** (Russia), **MIAR** (Spain), **Open Academic Journals Index** (USA), **CiteFactor** – **Directory of International Research Journals** (Canada).

All manuscripts are peer reviewed by experts in the respective field. Authors of the manuscripts bear responsibility for their content, credibility and reliability.

Editorial board doesn't expect the manuscripts' authors to always agree with its opinion.

Postal Address: 1717 N Street NW, Suite 1,
Washington, District of Columbia 20036

Release date 25.12.2023
Format 21 × 29,7/4.

Website: <https://bgt.cherkasgu.press>
E-mail: kalinitch@mail.ru

Headset Georgia.

Founder and Editor: Cherkas Global
University

Order № B-24.

© Biogeosystem Technique, 2023

Biogeosystem Technique

2023

Is. 2

Articles

Technology for Phytoremediation of Oil-Contaminated Dense Soil A.A. Okolelova, K.G. Tutarashvili, V.N. Kaplya, G.S. Egorova, A.Yousif Abdul Abbas, E.E. Nefed'eva, S.L. Belopuhov	51
Searching for Effective Antagonists Against Toxin-Forming Microscopic Fungi and Bacteria L.R. Valiullin	66
Study of Reducing the Danger of T-2 Toxin When Using a Drug of Organomineral Origin L.R. Valiullin	74

Copyright © 2023 by Cherkas Global University



Published in the USA
Biogeosystem Technique
Issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7316
2023. 10(2): 51-65

DOI: 10.13187/bgt.2023.2.51
<https://bgt.cherkasgu.press>



Articles

Technology for Phytoremediation of Oil-Contaminated Dense Soil

Alla A. Okolelova ^a, Ksenia G. Tutarashvili ^a, Veronika N. Kaplya ^a, Galina S. Egorova ^b,
Abbas Yousif Abdul Abbas ^c, Elena E. Nefed'eva ^{a,d,*}, Sergey L. Belopuhov ^d

^a Volgograd State Technical University, Volgograd, Russian Federation

^b Volgograd State Agricultural University, Volgograd, Russian Federation

^c Al-Gharraf oil field, Dhi Qar, Iraq

^d Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

Paper Review Summary:

Received: 2023, December 21

Received in revised form: 2023, December 25

Acceptance: 2023, December 27

Abstract

The study was aimed to develop a technology for effective and safe cleaning and phytoremediation of heavily rocky oil-contaminated soil. The use of mechanical cleaning technology seemed rational, since it did not require special costs for soil removal and its transportation. Surfactants and other substances are used to clean soil from oil contamination. It was proposed to use surfactants intended for widespread use in industry because they sufficiently studied and available. Sokolan surfactant and defoamer AF 5503 were the least toxic for further soil remediation. The technology for cleaning of oil-contaminated soil involves their introduction into the apparatus for more efficient separation of oil components from contaminated soil. The preparations will not contribute to the toxicity of wastewater and washed soil during further remediation of the fertile soil layer. The use of green manure can improve the condition of soils and create prerequisites for the development of microflora involved in the transformation of oil products in the soil. Oil has a detrimental effect on the growth dynamics of sunflower cotyledons and stems.

Mustard seeds showed the best germination. In addition, wheat, amaranth, oats and barley survived in oil-contaminated soil, and they can be used for phytoremediation. Mustard and oats are better adapted to the conditions of heavily stony, oil-contaminated soil. It is recommended to simultaneously sow oats and white mustard into the straw. It is necessary to carry out pre-sowing treatment of seeds with the solution of Lignohumate brand B potassium, consumption rate is 0.5 l/t, working solution consumption is 10-15 l/t. The seed material treatment will significantly enhance the growth and development of the plant root system in the first stages of ontogenesis. It is not recommended to apply mineral fertilizers before sowing, but fertilizing with mineral

* Corresponding author

E-mail addresses: nefedieva@rambler.ru (E.E. Nefed'eva)

fertilizers can be carried out during the growing season. It is possible to use the solid fraction of municipal wastewater as organomineral fertilizers.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Sinapis alba*, *Amaranthus albus*, rocky soil, soil washing in drums, surfactants.

1. Введение

Нефть и продукты ее переработки являются распространенными поллютантами (Abdulkarim, Abdulla, 2022). Нефтяные загрязнения обнаруживаются в водных объектах, почвах, легкие фракции при разливах улетучиваются в атмосферный воздух. Самоочищение биосферы от нефтезагрязнений происходит благодаря микроорганизмам-нефтедеструкторам (Колотова, 2020; Желтобрюхов, 2016), за счет испарения, растекания, абиогенного окисления и других процессов. Однако, деградация нефтепродуктов в природе протекает медленно (Околелова, 2020).

У почвы, загрязненной нефтепродуктами, снижается плодородие как из-за токсичности нефтепродуктов (Okolelova et al., 2021), так и из-за создаваемого ими анаэробного биоцида (Околелова, 2022 а; Желтобрюхов, 2019). Затруднительна корректная оценка содержания нефтепродуктов в почве (Okolelova et al., 2020). Одним из результатов нефтяного загрязнения почвы будет угнетение растений на данной территории (Tutarashvili et al., 2021, Желтобрюхов, 2016).

Известно множество способов очистки и ремедиации нефтезагрязненных почв, в том числе с помощью механических, физико-химических, биологических и агрохимических методов, которые выбираются с учетом количества и состава загрязнителя, а также особенностей загрязненной территории (Michael-Igolima et al., 2022).

Метод механической очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей считается одним из недостаточно изученных и, следовательно, перспективных. Применение технологии механической очистки в данном случае затруднительно и требует особого подхода из-за прочности грунта.

Рекультивация – это комплекс работ, направленный на восстановление продуктивности нарушенных земель, а также на улучшение условий окружающей среды. Под рекультивацией понимается комплекс мер, направленных на восстановление природных объектов, нарушенных в результате природнохозяйственной деятельности человека. Процесс удаления разлитой нефти и нефтепродуктов требует довольно сложной технологии как при подготовке загрязненного участка к рекультивации, так и при проведении самого процесса (Околелова, 2022b).

Анализ литературных источников позволил определить наиболее перспективные направления и исследования и реализовать их в экспериментальной работе, а именно предложить наиболее перспективный метод очистки сильнокаменистого грунта, которым является механическая очистка с изъятием загрязненной почвы и последующей очисткой.

В задачу исследования входила разработка метода очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей. Применение технологии механической очистки представляется в данном случае рациональным, поскольку не требует особых затрат на изъятие почвы и ее транспортировку. Минимизация объема изъятых материалов позволяет оптимизировать объем транспортируемых материалов. Следует иметь в виду, что изъятие земель может вызвать искажение морфологической структуры обрабатываемого участка и нарушения течения как поверхностных, так и подземных вод. Тем не менее, изоляция и обработка загрязненных материалов вне участка позволяют применять более сложные приемы обработки, которые могут быть более эффективными и быстродействующими, а также более безопасными для грунтовых вод, животного и растительного мира, местных жителей.

Цель настоящего исследования – на основе теоретических и экспериментальных исследований предложить технологию эффективной и безопасной очистки и фиторемедиации сильнокаменистого нефтезагрязненного грунта.

В связи с выбранной технологией очистки сильнокаменистого грунта необходимо выполнить следующие задачи исследования:

1. Разработка технологии механической очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей.
2. Оценка возможности применения ПАВ и пеногасителей при очистке грунта от нефтезагрязнителей.

3. Оценка качества полученного продукта.
4. Предложение мероприятий по рекультивации сильнокаменистого грунта.

2. Методика исследований

Семена твердой пшеницы и ярового ячменя обрабатывали пеногасителем Af 5503, Пента и ПАВ *Sokolan* по схеме: доза препарата составляла 0 (контроль); 50; 100; 250 г/т семян.

Af 5503 применяется в качестве антивспенивателя (пеногасителя), формула $C_4H_9O.(C_3H_6O)_n$.

Пеногаситель «Пента» 465 – самоэмульгирующийся пеногасящий концентрат кремнийорганических олигомеров с добавлением ПАВ. Кремнийорганические олигомеры образуют пространственную структуру блок-сополимера, в которых наличие связей химических связей между блоками обуславливает их устойчивость и предотвращает расслоение с выделением отдельных компонентов. Пеногаситель растекается по поверхности пенной пленки и выталкивает из нее слой жидкости, вызывая утончение пленки вплоть до ее разрыва. Растекание по поверхности обеспечивается благодаря введению ПАВ, образующие в воде дисперсии.

ПЭГ600 химическая формула: $H(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ – полиэтиленгликоль, является продуктом полимеризации окиси этилена с этиленгликолем. Используется в фармакологии, косметологии, в производстве моющих средств, текстильной, каучуковой, металлообрабатывающей и других отраслях промышленности.

Исследовали влияние вышеперечисленных препаратов на всхожесть пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.) сорта Вестница и ячменя ярового (*Hordeum vulgare* L.) сорта Донецкий 8, которую определяли по ГОСТ 12038-84 на 7 сутки. Зерновки проращивали рулонным методом в темноте при температуре 20°C. Эксперименты проводили в 4-кратной повторности.

К нормально проросшим относят семена, имеющие здоровый вид, имеющие не менее двух нормально развитых корешков размером более длины семени и росток размером не менее половины его длины с просматривающимися первичными листочками, занимающими не менее половины длины coleoptilya.

К непроросшим семенам относят набухшие семена, которые к моменту учета всхожести не проросли, твердые семена, которые не набухли и не изменили внешнего вида. К невсхожим семенам относят загнившие семена с разложившимся эндоспермом, почерневшим или загнившим зародышем и проростки с частично или полностью загнившими частями.

Аномально (ненормально) проросшие семена имеют нарушения в развитии проростков: нет зародышевых корешков или их меньше нормы, или они короткие, слабые, закрученные, водянистые; coleoptilya пустой, имеет трещину, короче листьев, деформированный, отсутствует; первичные листочки занимают меньше половины coleoptilya или обесцвечены, раздроблены или расщеплены, веретенообразные, водянистые, с короткими зародышевыми корешками.

Для проведения эксперимента по оценке токсичности компонентов нефти в грунте были подготовлены образцы каменистого сильно уплотненного грунта. Крупный гравий выкладывали на тонкий слой песка, затем засыпали смесью песка и цемента 1 : 5, увлажняли водой из пульверизатора, затем укладывали мелкий гравий. Во всех образцах уравнивали массу гравия, песка и цемента.

В контрольные образцы грунта не вносили нефть. В опытные образцы была добавлена сырая нефть с расчетом, чтобы ее концентрация составляла 3 г/кг грунта. Необходимый объем нефти тщательно перемешивали с чистым сухим речным песком и равномерно вносили в грунт. В контрольные образцы вносили чистый песок. Массу перска во всех образцах уравнивали.

На подготовленный грунт были посеяны семена пшеницы, подсолнечника, щиряцы, горчицы белой, ячменя, овса при различных условиях. Для улучшения условий культивирования в грунт были внесены важнейшие макроэлементы для питания растений. Эксперимент проводили в 4 повторностях. Результаты приведены в [Таблице 1](#).

Результаты подвергали статистической обработке. Рассчитывали среднюю арифметическую (M), среднее квадратическое отклонение, ошибку репрезентативности средней арифметической (m), критерий Стьюдента. Оценку достоверности разницы

проводили с помощью сравнения полученного значения со стандартным t_{cm} . Результаты приведены на рисунках в виде $M \pm m$.

3. Результаты и обсуждение

ПАВы, сурфактанты и другие вещества используются для очистки почвы от нефтяных загрязнений (Rumin et al., 2022; Fanaei et al., 2020). Было предложено использовать ПАВы, применяемые для производства химических средств защиты растений, в связи с их достаточной изученностью и доступностью.

Необходимо отобрать наименее токсичные ПАВ и пеногаситель для промывки нефтезагрязненной почвы. На основании опытов сравнить ПАВ ПЭГ 600 и *Sokolan*, а также пеногасители AF 5503 и Пента 465. Наименее токсичные ПАВ и пеногаситель будут использованы в технологии очистки нефтезагрязненного сильнокаменистого грунта. ПАВ – химическое соединение, которое, концентрируясь на поверхности раздела термодинамических фаз, вызывает снижение поверхностного натяжения. Результаты представлены на [Рисунке 1](#) и [Рисунке 2](#).

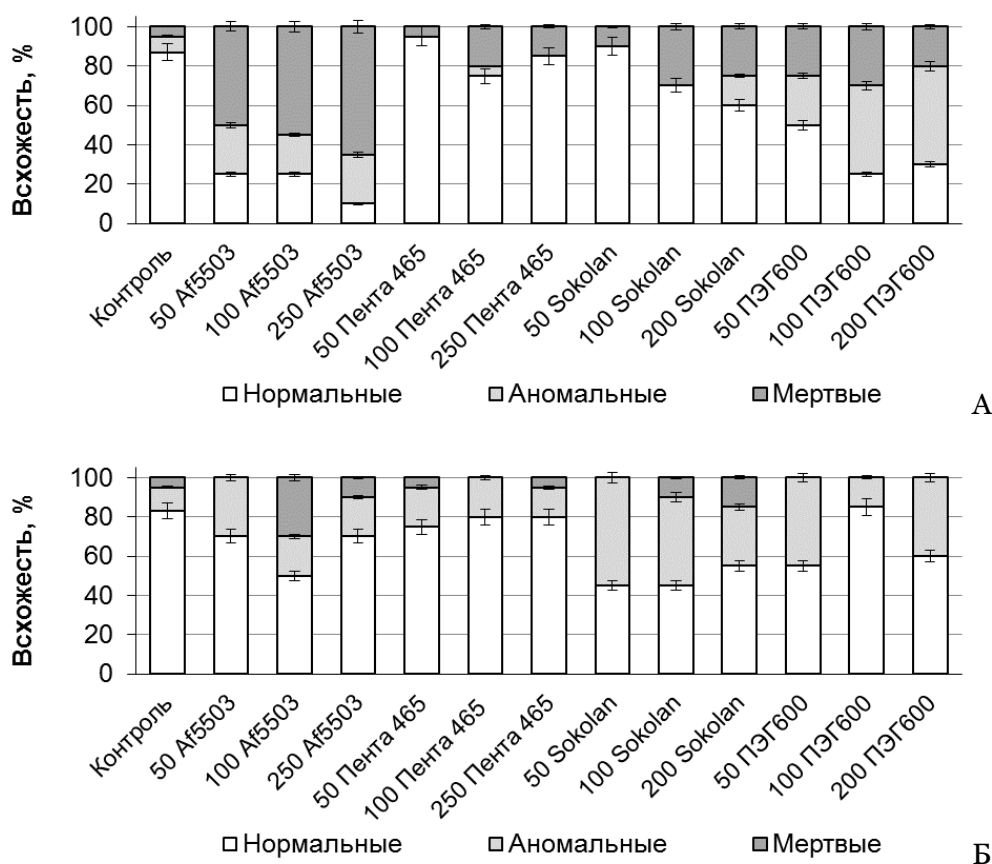


Рис. 1. Влияние пеногасителей AF 5503, Пента 465 и ПАВ ПЭГ 600 *Sokolan* на всхожесть пшеницы (А) и ячменя (Б)

AF 5503 не угнетал всхожесть ячменя. Положительно действовал на всхожесть, длину побегов и корней ячменя в дозе 50 г/т семян, однако влияние его было незначительно. Вместе с тем, AF5503 приводил к существенному торможению роста пшеницы, подавлению всхожести. Как правило, ячмень проявляет гораздо более выраженную устойчивость к химическим и прочим воздействиям, чем пшеница.

Пента 465 не защищал от потемнений, не угнетал всхожесть ячменя и пшеницы, не влиял на длину корней и побегов ячменя. В дозе 50 г/т семян пеногаситель стимулировал рост и прорастание семян пшеницы.

ПЭГ 600 может оказывать некоторое угнетающее действие по отношению к семенам пшеницы и, в меньшей степени, ячменя.

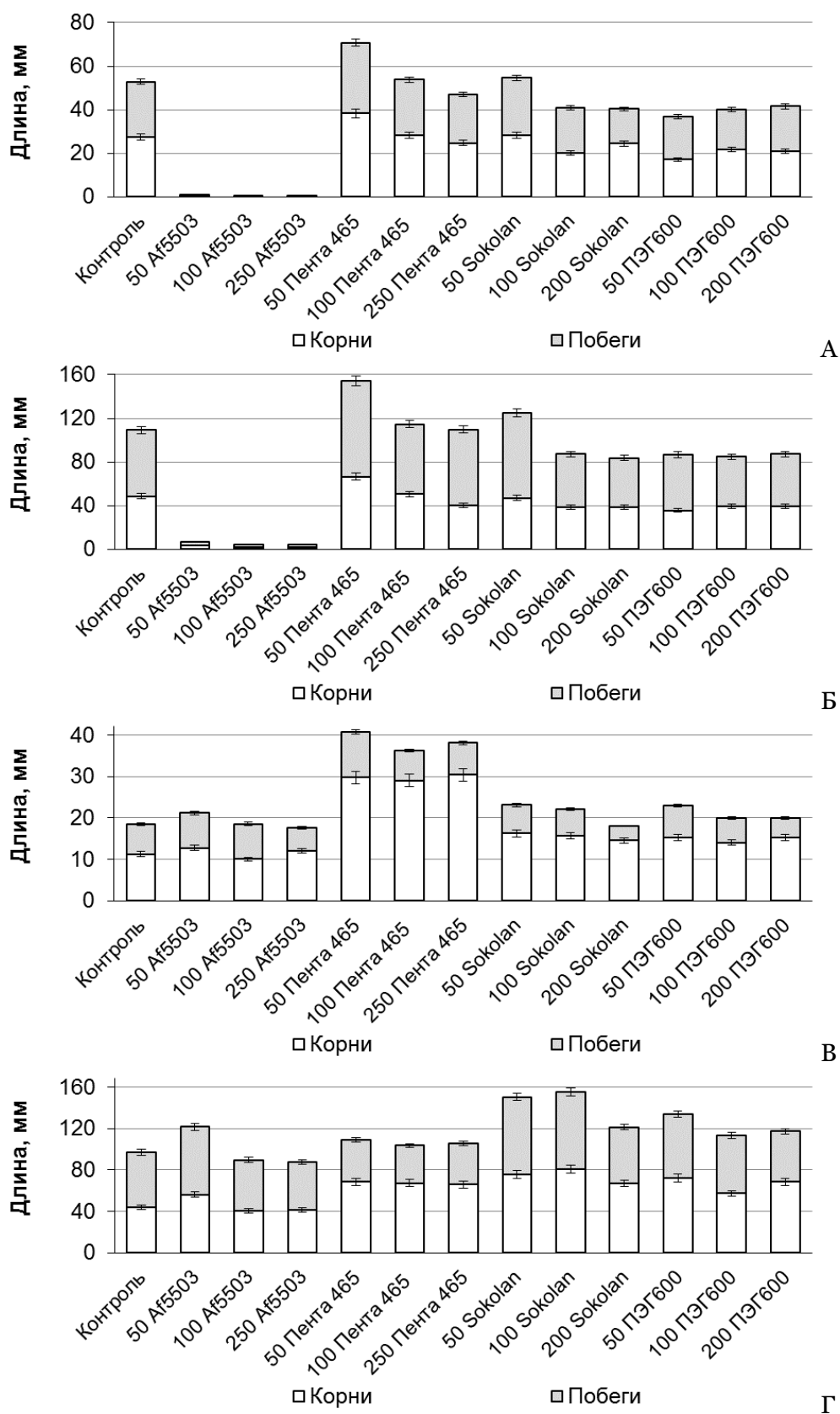


Рис. 2. Влияние пеногасителей AF 5503, Пента 465 и ПАВ ПЭГ 600, *Sokolan* на рост проростков пшеницы (А – 3 сут, Б – 7 сут) и ячменя (В – 3 сут, Г – 7 сут)

ПАВ *Sokolan* положительно влиял на всхожесть, длину побегов и корней пшеницы (оптимальная доза 50 г/т семян). *Sokolan* не приводил к торможению роста ячменя, но и не способствовал его явной стимуляции.

На основании проведенных экспериментальных исследований ПАВ *Sokolan* и пеногаситель AF 5503 являются менее токсичными для дальнейшей рекультивации почв. Исследуемые ПАВ и пеногасители предназначены для широкого использования в промышленности. Технология очистки нефтезагрязненного грунта предусматривает их введение в аппарат. Это будет способствовать более эффективному отделению компонентов нефти от загрязненного грунта и облегчит процесс промывки. Препараты *Sokolan* и AF 5503 не будут вносить вклад в токсичность сточных вод и отмытого грунта при дальнейшей рекультивации плодородного слоя почвы.

Ассортимент растений, применяемых для рекультивации нефтезагрязненного грунта, следует составлять, опираясь на теоретические (Nefed'eva et al., 2020; Abdallah et al., 2022; Тутарашвили, 2021, Obi-Iyeke, 2022) и экспериментальные данные. Применение сидератов позволяет улучшить состояние почв и создать условия для развития микрофлоры, участвующей в трансформации нефтепродуктов в почве (Капля, 2023; Kaplya et al., 2022; Нефедьева, 2017; Lopez-Echartea et al., 2020).

Лучшую всхожесть спустя 2 недели после посева показали семена горчицы в сравнении чистого и загрязненного нефтью грунта (Таблица 1).

Таблица 1. Выживаемость семян на каменистом сильно уплотненном грунте

Культура	Контроль		Грунт, загрязненный нефтью		НСР
	2 недели	4 недели	2 недели	4 недели	
Пшеница	50,0	55,0	35,0	65,0	0,5
Горчица белая	56,1	62,7	66,0	62,7	0,5
Подсолнечник	100,0	100,0	50,0	50,0	0,7
Щирица	52,8	52,0	51,6	50,8	0,4
Овес	70,0	70,0	65,0	65,0	0,6
Ячмень	62,7	62,5	61,9	66,0	0,6

Нефть, присутствующая в почве, оказывает пагубное влияние на динамику роста семядолей и стебля подсолнечника. Спустя 4 недели (Таблица 1) зерновки пшеницы продолжали прорастать, причем на нефтезагрязненном грунте их прорастание замедлилось, а выживаемость не снизилась. Высокую чувствительность к нефти проявил только подсолнечник. Остальные виды можно использовать для ремедиации нефтезагрязненных грунтов после предварительной очистки.

Для проведения второй части эксперимента был подготовлен сильнокаменистый грунт (Рисунок 3) по аналогичной методике, а также был использован для сравнения торф.

Половину образцов грунта оставляли без внесения нефти, в другие образцы были внесены нефтепродукты (сырая нефть), чтобы ее концентрация составляла 3000 мг/кг грунта. На подготовленный грунт были высеяны семена горчицы, овса, пшеницы, ячменя при различных условиях. Для улучшения условий культивирования в каменистый грунт были внесены раствор Гельригеля, содержащий важнейшие макроэлементы, лигногумат калийный Марка Б 1 л/га (ООО «Агро Эксперт Групп), Фертикс Марка А 1 л/га (ООО «Агро Эксперт Групп), пшеничная солома и препарат на основе природного минерала бишофита УГ 200 мл/га.

Эксперимент показал (Рисунок 4), что горчица и овес лучше приспособились к условиям сильнокаменистого грунта и загрязненной нефтью почве. Рекомендован одновременный высев в солому овса и горчицы белой. Эти растения обладали высокой устойчивостью и показали наилучшие результаты в модельном опыте.



Рис. 3. Внешний вид модельного сильнокаменистого грунта



Рис. 4. Внешний вид растений, выращенных на нефтезагрязненном грунте*

* 1 ряд слева направо: контроль грунт, контроль грунт + нефть, гравий + раствор Гельригеля, гравий + раствор Гельригеля + нефть;

2 ряд слева направо: гравий+лигногумат Марка Б, гравий+лигногумат Марка Б + нефть, гравий+ Фертикс Марка А, гравий+ Фертикс Марка А + нефть

3 ряд слева направо: гравий + солома, гравий + солома + нефть, гравий + УГ, гравий + УГ + нефть

Для создания благоприятных условий для семян, в рекультивируемый грунт следует вбить деревянные колышки на расстоянии 1 м друг от друга, между колышками разместить ветки деревьев лиственных пород, а среди них уложить солому рыхлым слоем. Растительный материал следует увлажнить.

Следует провести предпосевную обработку семян препаратом Лигногумат марка Б калийный, норма расхода – 0,5 л/т. Расход рабочей жидкости 10-15 л/т. Благодаря высокому стимулирующему эффекту обработка посевного материала позволит значительно усилить рост и развитие корневой системы растений на первых этапах роста. Перед посевом не следует вносить минеральные удобрения, но можно провести подкормку минеральными удобрениями во время вегетации.

В качестве органоминеральных удобрений возможно использовать твердую фракцию городских бытовых сточных вод (Нефедьева, 2013).

3.1. Технологическая часть

Для очистки грунта был выбран механический метод, а именно, механический способ очистки грунта с частичной промывкой и последующей рекультивацией путем нанесения плодородного слоя почвы (Агеев, 2016). Более эффективным способом очистки почвы от гидрофобных загрязнителей является ее промывание в барабанах с использованием ПАВ. После промывки грунт отстаивается в специальных емкостях и контейнерах, после чего осуществляется его разделение.

На основании проведенных экспериментальных исследований ПАВ *Sokolan* и пеногаситель AF5503 являются менее токсичными для дальнейшей рекультивации почв и добавляются в воду для частичной промывки почвы.

Было выявлено, что такие растения-сидераты как горчица и овес наиболее приспособлены к условиям сильнокаменистого грунта, что необходимо для дальнейшей рекультивации.

Проведен расчет материального баланса технологии. Расчет расхода сырья производится по выбранным параметрам технологического процесса, а также по потерям, которые были приняты для производства данного вида изделия. Расчет может быть произведен и для производства в целом, и по отдельным его стадиям.

Для полного учета всех потерь мы начали расчет материального баланса с последней стадии:

$$\frac{P_i}{1 - S_i} = N_i$$

P_i – масса вещества поступающая в данный этап;

S_i – потери на данном этапе;

N_i – масса веществ для расхода.

Стадия подготовки

На стадию подготовки поступает 1,016 т загрязненного грунта. Потери составили 1,5 %.

$$\frac{1.000}{0.985} = 1.016 \text{ т}$$

Потери составили 0,0160 т = 16 кг

Стадия очистки

На стадию очистки поступает 1,1044 т

Потери составили 8 %

$$\frac{1.016}{0.92} = 1.1044 \text{ m}$$

Потери составили 0,088 т = 88 кг

Стадия разделения фаз

На стадию разделения фаз поступает 1,1381

Потери 3 %

$$\frac{1.1044}{0.97} = 1.1381 \text{ m}$$

Потери составили 0,034 т = 34 кг

Материальный баланс технологии очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей приведен в [Таблице 2](#).

Таблица 2. Материальный баланс технологии очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей

Приход			Расход		
Статья прихода	Масса, кг	ω, %	Статья расхода	Масса, кг	ω, %
Стадия подготовки	1138		Стадия подготовки	34	3
Стадия очистки	1104		Стадия очистки	88	8
Стадия разделения фаз	1016		Стадия разделения фаз	16	1,5
Итого	$m_{исх}$	100	Итого	$m_{кон}$	100
	1138			1000	

Основной аппарат

Анализ технологии очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей показал, что необходим смеситель для стадии промывания почвы с водой и ПАВ. Подходящим смесителем для данной стадии является эжекторный гидросмеситель, так как он позволяет смешивать грунт с жидкостью с максимальной эффективностью. К преимуществам аппарата относится высокий уровень производительности, простота эксплуатации и монтажа, а также невысокие расходы.

Оценка технического решения с точки зрения экономической эффективности, энерго- и ресурсосбережения и экологической безопасности

Выбранная технология механической очистки сильнокаменистого грунта позволяет сохранить такие вторичные ресурсы как нефть, вода. В проведении работы нефтезагрязненный грунт проходит стадию очистки, затем происходит очистка воды от нефти и ПАВ, таким образом отделяется нефть, а затем вода очищается от примеси ПАВ и пеногасителей.

Для механической очистки сильнокаменистого грунта было предложено использование ПАВ Sokolan и ПЭГ600, а также пеногаситель – AF5503 и Пента 465. На основании проведенных экспериментальных исследований ПАВ Sokolan и пеногаситель AF5503 являются менее токсичными для дальнейшей рекультивации почв, эффективный способ повышения показателя плодородия почвы – использование растений-сидератов. Такие культуры богаты азотом, крахмалом, белками, что решит ряд проблем рекультивации плодородного слоя почвы.

В качестве основного аппарата был выбран эжекторный гидросмеситель, оборудование позволяет добиться высокой степени очистки путем промывки загрязненной почвы под высоким напором воды.

После стадии промывки загрязненная нефтью и ПАВ вода попадает на стадию очистки, где нефть вытесняется с помощью деэмульгаторов. Эти вещества применяются в дозах от 5 до 50 г на 1 тонну. Деэмульгаторы вытесняют ПАВ, содержащиеся в смеси нефтепродуктов и воды. Добавление деэмульгаторов позволяет разделить воду и нефтепродукты и обеспечить образование крупных капель нефтепродуктов. Такой способ

позволяет выделить до 95 % нефти.

Применяемое техническое решение является:

- экономически эффективным, так как введение выбранных ПАВ и пеногасителей позволяет сократить дополнительные расходы на промывку почвы, а также в предложенной технологии происходит выделение нефти из стоковой воды с помощью диэмульгатора;

- энерго- и ресурсоэффективным, так как использование ПАВ позволит сократить расходы воды на промывание почвы, а также очистка нефти с помощью диэмульгатора позволяет сохранить такой ресурс- как нефть;

- экологически безопасным, так как на основе проведенных экспериментальных исследований были выбраны наименее токсичные ПАВ, что позволит значительно быстрее восстановить плодородный слой почвы для последующего использования.

В предложенной технологии предусмотрена стадия разделения фаз, где отделенная сточная вода проходит стадию очистки и возвращается в производство. А отделенные в процессе сепарации камни (на входе мы имеем загрязненный сильнокаменистый грунт) хранятся в емкостях, после чего может быть использован при строительстве дорог (на стадии засыпки).

Ресурсосбережение обеспечивается возвратом очищенной воды в производство, а также отделением нефтепродуктов. Образовавшаяся после очистки грунта и отделения нефтепродуктов вода возвращается в цикл очистки. Из полученного нефтешлама отделяются нефтепродукты, которые можно вторично использовать. Все это делает процесс более экономически эффективным и ресурсосберегающим. Сравнительная характеристика технологии очистки сильнокаменистого грунта представлена в [Таблице 3](#).

Таблица 3. Сравнительная характеристика технологии очистки сильнокаменистого грунта

Параметр	Изначальная технология очистки сильнокаменистого грунта	Предложенная технология очистки сильнокаменистого грунта
Энерго- и ресурсоэффективность	Грунт проходит стадию очистки, вода с примесями сбрасывается, а грунт возвращался на место сбора	Грунт после стадии очистки возвращается на место сбора, а загрязненная примесью (ПАВ, нефть) нефть проходит стадию очистки с использованием диэмульгатора, после чего она практически не теряет своих свойств, вода поступает на стадию очистки и возвращается в производство
Экологическая безопасность	Грунт возвращается на место сбора	Грунт проходит стадию очистки с экспериментально выбранными наименее токсичными ПАВ, которые обеспечивают сокращение сроков ремедиации растениями-сидератами
Экономическая эффективность	–	Экономическая эффективность обеспечивается возвратом воды в производство, нефть после стадии очистки на выходе практически не теряет своих свойств. Гравий после стадии сепарации может использоваться в строительстве

Механический способ очистки грунта наиболее эффективен по сравнению с другими методами. При этом способе достигается высокая эффективность очистки для сильнокаменистого грунта. По сравнению с аналогами очистка грунта происходит быстрее и с наименьшим вредом для окружающей среды. На выходе грунт возвращается.

Для восстановления плодородного слоя рекомендованы растения-сидераты, такие как горчица белая и овес.

4. Заключение

В данной работе описаны методы очистки сильнокаменистого грунта от нефтезагрязнителей. На основании проведенного анализа был выбран наиболее эффективный метод – метод механической очистки грунта. Достоинством данного технологического решения является выделение нефти в ходе очистки нефтезагрязненного грунта, при этом нефтепродукты могут быть выделены из нефтешлама.

Были проведены экспериментальные исследования для выбора наименее токсичных ПАВ и пеногасителей, используемых в производстве. На основании проведенных экспериментальных исследований определили растения-сидераты для последующей рекультивации почвы. Выбор растений для дальнейшего высева должен определяться на основании установления показателей аккумуляции тяжелых металлов в надземных частях растений и коэффициентов их переноса в системе «почва-корни-надземная часть растений» по максимальным значениям этих показателей.

Для восстановления естественного плодородия грунта рекомендовано внесение соломы и предпосевная обработка семян препаратом Лигногумат марка Б калийный (ООО «Агро Эксперт Групп»).

Достоинства предложенного метода заключаются в том, что повышается экономический показатель производства, то есть происходит увеличение качества очищенного грунта. Использование эффективных и наименее токсичных ПАВ позволяет получать грунт, который к последующей рекультивации растениями, а также использование диэмульгаторов при очистке позволяет сохранять до 95% нефти, что делает технологию экономически и ресурсо-эффективной.

В работе изучены теоретические основы выбранного способа, изучено влияние параметров процесса на получение заданного продукта. В соответствии с требованиями был выбран основной аппарат – эжекторный гидросмеситель. К преимуществам аппарата относится высокий уровень производительности, простота эксплуатации и монтажа, а также невысокие расходы.

5. Благодарности

Статья выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-317 от 20 апреля 2022 года о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен для государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

The article was made with support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in accordance with agreement № 075-15-2022-317 date April 20. 2022 on providing a grant in the form of subsidies from the Federal budget of Russian Federation. The grant was provided for state support for the creation and development of a World class Scientific Center “Agrotechnologies for the Future”.

Литература

[Агеев и др., 2016](#) – Агеев А.В., Воронкова С.В., Рожков В.О. Патент № 2593386 С1 Российская Федерация, МПК В09С 1/00. Устройство для очистки грунтов и почвы от нефти и нефтепродуктов, 2016.

[Желтобрюхов и др., 2016](#) – Желтобрюхов В.Ф., Нефедьева Е.Э., Картушина Ю.Н. (2019). Растения в условиях загрязнения органическими соединениями. Проблемы фиторемедиации. Волгоград, 2016.

[Желтобрюхов и др., 2019](#) – Желтобрюхов В.Ф., Нефедьева Е.Э., Картушина Ю.Н. (2019). Растения в условиях загрязнения органическими соединениями. Проблемы фиторемедиации. Волгоград, 2019.

[Капля и др., 2023](#) – Капля В.Н., Околелова А.А., Егорова Г.С., Нефедьева Е.Э., Белопухов С.Л. (2023). Биоаугментация нефтезагрязненных почв // *АгроЭкоИнфо*. 2023. 6(60): 1. DOI: 10.51419/202136630

Колотова и др., 2020 – Колотова О.В., Нефедьева Е.Э., Могилевская И.В., Желтобрюхов В.Ф., Картушина Ю.Н. Биодеструкция и биоремедиация. Волгоград, 2020.

Нефедьева и др., 2013 – Нефедьева Е.Э., Белицкая М.Н., Шайхиев И.Г. Возможности использования твердой фракции городских сточных вод в качестве органоминерального удобрения в городском и сельском хозяйстве // *Вестник Казанского технологического университета*. 2013. 16(19): 223-226.

Нефедьева и др., 2017 – Нефедьева Е.Э., Сиволобова Н.О., Кравцов М.В., Шайхиев И.Г. (2017). Доочистка сточных вод с помощью фиторемедиации // *Вестник Технологического университета*. 2017. 20(10): 145-148.

Околелова и др., 2020 – Околелова А.А., Желтобрюхо В.Ф., Нефедьева Е.Э., Егорова Г.С. Почвы урболандшафтов. Волгоград, 2020.

Околелова и др., 2022a – Околелова А.А., Егорова Г.С., Нефедьева Е.Э. Деградация, ремедиация и биоиндексация почв. Волгоград, 2022.

Околелова, Нефедьева, 2022b – Околелова А.А., Нефедьева Е.Э. Ремедиация почв. Волгоград, 2022.

Тутарашвили, Нефедьева, 2021 – Тутарашвили К.Г., Нефедьева Е.Э. Эффективность использования зеленых растений для ремедиации нефтезагрязненных почв / *Современные проблемы радиобиологии, радиэкологии и агроэкологии. IV Международная научно-практическая конференция*. 2021. С. 186-189.

Abdallah et al., 2022 – Abdallah A.H., Elhoussein A.A., Ibrahim D.A. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using Sudanese plant species *Acacia sieberiana* Tausch // *International Journal of Phytoremediation*. 2022. 25(4):1-8. DOI: 10.1080/15226514.2022.2083575

Abdulkarim, Abdulla, 2022 – Abdulkarim T.I., Abdulla A.H. Experimental Approach for Treatment of Contaminated Soil with Crude Oil // *International Journal of Design and Nature and Ecodynamics*. 2022. 17(2): 273-277. DOI: 10.18280/ij dne.170214

Fanaei et al., 2020 – Fanaei F., Moussavi G., Shekoohiyan, S. Enhanced treatment of the oil-contaminated soil using biosurfactant-assisted washing operation combined with H₂O₂-stimulated biotreatment of the effluent // *Journal of Environmental Management*. 2020. 271: 110941. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110941

Kaplya et al., 2022 – Kaplya, V.N., Okolelova, A.A., Nefedieva, E.E., Jabbarov, Z.A., Kováčik, P., Sukiasyan, A., Abdullaeva, Yu., Kholdorov, Sh., Demir, Z., Suska-Malawska, M. (2022). Diagnostics of the Content of Petroleum Products and Heavy Metals in Light Chestnut Soils // *Biogeosystem Technique*. 9(1): 3-14. DOI: 10.13187/bgt.2022.1.3

Lopez-Echartea et al., 2020 – Lopez-Echartea E., Strejcek M., Mukherjee S., Uhlik O., Yrjälä K. (2020). Bacterial succession in oil-contaminated soil under phytoremediation with poplars // *Chemosphere*. 2020. 243: 125242. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125242

Michael-Igolima et al., 2022 – Michael-Igolima Abbey, U.S.J., Ifelebuegu A.O. (2022). A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. // *Environmental Advances*. 2022. 9: 100319. DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100319.

Nefed'eva et al., 2020 – Nefed'eva, E.E., Sevriukova, G.A., Zheltobryukhov, V.F., Gracheva, N.V., Abdulabbas, A.Yu.A. Assortment of herbaceous plants for remediation of soils contaminated with oil products and heavy metals / *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. "AGRITECH-II-2019: Agribusiness, environmental engineering and biotechnologies". 2020. 62008. DOI: 10.1088/1755-1315/421/6/062008

Obi-Iyeke, 2022 – Obi-Iyeke G. Screening of maize (*Zea mays* L.) for phytoremediation on crude oil contaminated soil // *FUDMA Journal of Sciences*. 2022. 6(3): 254-258. DOI: 10.33003/fjs-2022-0603-876

Okolelova et al., 2020 – Okolelova A.A., Zheltobryukhov V.F., Nefedieva E.E., Kaplya V., Merzlyakova A., Egorova G. (2020). Peculiarities of assessment of content of oil products in soils / *E3S Web of Conferences. International Conference on Efficient Production and Processing, ICEPP 2020*. 01100. DOI: 10.1051/e3sconf/202016101100

Okolelova et al., 2021 – Okolelova A.A., Nefed'eva E.E., Tutarashvili K.G., Egorova G.S., Zheltobryukhov V. F. Determination of the state of oil-contaminated soils / *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. V International Workshop on Innovations in Agro and Food Technologies (WIAFT-V-2021)*. 2021. 12093. DOI: 10.1088/1755-1315/848/1/012093

Rumin et al., 2022 – Rumin M., Lopatovskaya O., Stom D., Zhdanova G., Kupchinsky A., Petrova Yu. Change in capillary moisture capacity of oil-contaminated soil after washing with Tween-80 / III International Conference on Improving Energy Efficiency, Environmental Safety and Sustainable Development in Agriculture (EESTE2023). 2022. 3010. DOI: 10.1051/e3sconf/202346303010

Tutarashvili et al., 2021 – Tutarashvili K.G., Nefed'eva E.E., Okolelova A.A., Dronova T.N., Zheltobryukhov V.F. (2021). The plant resistance to oil contamination in soil / IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. V International Scientific Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies (AGRITECH-V – 2021). 2021. 022070. DOI: 10.1088/1755-1315/839/2/022070

References

Abdallah et al., 2022 – Abdallah, A.H., Elhoussein, A.A., Ibrahim, D.A. (2022). Phytoremediation of crude oil contaminated soil using Sudanese plant species *Acacia sieberiana* Tausch. *International Journal of Phytoremediation*. 25(4): 1-8. DOI 10.1080/15226514.2022.2083575

Abdulkarim, Abdulla, 2022 – Abdulkarim, T.I., Abdulla, A.H. (2022). Experimental Approach for Treatment of Contaminated Soil with Crude Oil. *International Journal of Design and Nature and Ecodynamics*. 17(2): 273-277. DOI: 10.18280/ijdne.170214

Ageev i dr., 2016 – Ageev, A.V., Voronkova, S.V., Rozhkov, V.O. (2016). Patent № 2593386 C1 Rossiiskaya Federatsiya, MPK B09C 1/00 [Patent No. 2593386 C1 Russian Federation, IPC B09C 1/00. A device for cleaning soil and soil from oil and petroleum products.]. *Ustroistvo dlya ochistki gruntov i pochvy ot nefti i nefteproduktov*. [in Russian]

Fanaei et al., 2020 – Fanaei, F., Moussavi, G., Shekoohiyan, S. (2020). Enhanced treatment of the oil-contaminated soil using biosurfactant-assisted washing operation combined with H₂O₂-stimulated biotreatment of the effluent. *Journal of Environmental Management*. 271: 110941. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110941

Kaplya et al., 2022 – Kaplya, V.N., Okolelova, A.A., Nefedieva, E.E., Jabbarov, Z.A., Kováčik, P., Sukiasyan, A., Abdullaeva, Yu., Kholdorov, Sh., Demir, Z., Suska-Malawska, M. (2022). Diagnostics of the Content of Petroleum Products and Heavy Metals in Light Chestnut Soils. *Biogeosystem Technique*. 9(1): 3-14. DOI: 10.13187/bgt.2022.1.3

Kaplya i dr., 2023 – Kaplya, V.N., Okolelova, A.A., Egorova, G.S., Nefed'eva, E.E., Belopukhov, S.L. (2023). Bioaugmentatsiya neftezagryaznennykh pochv [Bioaugmentation of oil-contaminated soils]. *AgroEkoInfo*. 6(60): 1. DOI: 10.51419/202136630 [in Russian]

Kolotova i dr., 2020 – Kolotova, O.V., Nefed'eva, E.E., Mogilevskaya, I.V., Zheltobryukhov, V.F., Kartushina, Yu.N. (2020). Biodestruktsiya i bioremediatsiya [Biodestruction and bioremediation]. Volgograd. [in Russian]

Lopez-Echartea et al., 2020 – Lopez-Echartea, E., Strejcek, M., Mukherjee, S., Uhlik, O., Yrjälä, K. (2020). Bacterial succession in oil-contaminated soil under phytoremediation with poplars. *Chemosphere*. 243: 125242. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125242

Michael-Igolima et al., 2022 – Michael-Igolima, Abbey, U.S.J., Ifelebuegu, A.O. (2022). A systematic review on the effectiveness of remediation methods for oil contaminated soils. *Environmental Advances*. 9: 100319. DOI: 10.1016/j.envadv.2022.100319

Nefed'eva et al., 2020 – Nefed'eva, E.E., Sevriukova, G.A., Zheltobryukhov, V.F., Gracheva, N.V., Abdulabbas, A.Yu.A. (2020). Assortment of herbaceous plants for remediation of soils contaminated with oil products and heavy metals. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. "AGRITECH-II-2019: Agribusiness, environmental engineering and biotechnologies". 62008. DOI: 10.1088/1755-1315/421/6/062008

Nefed'eva i dr., 2013 – Nefed'eva, E.E., Belitskaya, M.N., Shaikhiev, I.G. (2013). Vozmozhnosti ispol'zovaniya tverdoi fraktsii gorodskikh stochnykh vod v kachestve organomineral'nogo udobreniya v gorodskom i sel'skom khozyaistve [Possibilities of using the solid fraction of municipal wastewater as an organomineral fertilizer in urban and agricultural agriculture]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 16(19): 223-226. [in Russian]

Nefed'eva i dr., 2017 – Nefed'eva, E.E., Sivolobova, N.O., Kravtsov, M.V., Shaikhiev, I.G. (2017). Doochistka stochnykh vod s pomoshch'yu fitoremediatsii [Post-treatment of wastewater using phytoremediation]. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta*. 20(10): 145-148. [in Russian]

[Obi-Iyeke, 2022](#) – *Obi-Iyeke, G.* (2022). Screening of maize (*Zea mays* L.) for phytoremediation on crude oil contaminated soil. *FUDMA Journal of Sciences*. 6(3): 254-258. DOI: 10.33003/fjs-2022-0603-876

[Okolelova et al., 2020](#) – *Okolelova, A.A., Zheltobryukhov, V.F., Nefedieva, E.E., Kaplya, V., Merzlyakova, A., Egorova, G.* (2020). Peculiarities of assessment of content of oil products in soils. *E3S Web of Conferences. International Conference on Efficient Production and Processing, ICEPP 2020*. 01100. DOI: 10.1051/e3sconf/202016101100

[Okolelova et al., 2021](#) – *Okolelova, A.A., Nefed'eva, E.E., Tutarashvili, K.G., Egorova, G.S., Zheltobryukhov, V.F.* (2021). Determination of the state of oil-contaminated soils. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. V International Workshop on Innovations in Agro and Food Technologies (WIAFT-V-2021)*. 12093. DOI: 10.1088/1755-1315/848/1/012093

[Okolelova i dr., 2020](#) – *Okolelova, A.A., Zheltobryukho, V.F., Nefed'eva, E.E., Egorova, G.S.* (2020). Pochvy urbolandshaftov [Soils of urban landscapes]. Volgograd. [in Russian]

[Okolelova i dr., 2022a](#) – *Okolelova, A.A., Egorova, G.S., Nefed'eva, E.E.* (2022). Degradatsiya, remediatsiya i bioindeksatsiya pochv [Degradation, remediation and bioindexation of soils]. Volgograd. [in Russian]

[Okolelova, Nefed'eva, 2022b](#) – *Okolelova, A.A., Nefed'eva, E.E.* (2022). Remediatsiya pochv [Soil remediation]. Volgograd. [in Russian]

[Rumin et al., 2022](#) – *Rumin, M., Lopatovskaya, O., Stom, D. Zhdanova, G., Kupchinsky, A, Petrova, Yu* (2023). Change in capillary moisture capacity of oil-contaminated soil after washing with Tween-80. *III International Conference on Improving Energy Efficiency, Environmental Safety and Sustainable Development in Agriculture (EESTE2023)*. 3010. DOI: 10.1051/e3sconf/202346303010

[Tutarashvili et al., 2021](#) – *Tutarashvili, K.G., Nefed'eva, E.E., Okolelova, A.A., Dronova, T.N., Zheltobryukhov, V.F.* (2021). The plant resistance to oil contamination in soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. V International Scientific Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies (AGRITECH-V – 2021)*. 022070. DOI: 10.1088/1755-1315/839/2/022070

[Tutarashvili, Nefed'eva, 2021](#) – *Tutarashvili, K.G., Nefed'eva, E.E.* (2021). Effektivnost' ispol'zovaniya zelenykh rastenii dlya remediatsii neftezagryaznennykh pochv. *Sovremennye problemy radiobiologii, radioekologii i agroekologii* [Efficiency of using green plants for remediation of oil-contaminated soils.]. *IV Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya*. Pp. 186-189. [in Russian]

[Zheltobryukhov i dr., 2016](#) – *Zheltobryukhov, V.F., Nefed'eva, E.E., Kartushina, Yu.N.* (2019). Rasteniya v usloviyakh zagryazneniya organicheskimi soedineniyami. *Problemy fitoremediatsii* [Plants under conditions of pollution with organic compounds. Problems of phytoremediation]. Volgograd. [in Russian]

[Zheltobryukhov i dr., 2019](#) – *Zheltobryukhov, V.F., Nefed'eva, E.E., Kartushina, Yu.N.* (2019). Rasteniya v usloviyakh zagryazneniya organicheskimi soedineniyami. *Problemy fitoremediatsii* [Plants under conditions of pollution with organic compounds. Problems of phytoremediation]. Volgograd. [in Russian]

Технология фиторемедиции нефтезагрязненной уплотненной почвы

Алла Ароновна Околелова ^a, Ксения Гочаевна Тутарашвили ^a, Вероника Николаевна Капля ^a, Галина Сергеевна Егорова ^b, Аббас Юсиф Абдул Аббас ^c, Елена Эдуардовна Нефедьева ^{a, d, *}, Сергей Леонидович Белопухов ^d

^a Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Российская Федерация

^b Волгоградский государственный аграрный университет, Волгоград, Российская Федерация

^c Нефтяное месторождение Аль-Гарраф, Ди-Ка, Ирак

* Корреспондирующий автор

Адреса электронной почты: nefedieva@rambler.ru (Е.Э. Нефедьева)

^d Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, Москва, Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования была разработка технологии эффективной и безопасной очистки и фиторемедиации сильнокаменистого нефтезагрязненного грунта. Применение технологии механической очистки представлялось рациональным, поскольку не требовало особых затрат на изъятие почвы и ее транспортировку. ПАВы, сурфактанты и другие вещества используются для очистки почвы от нефтяных загрязнений. Было предложено использовать ПАВы, предназначенные для широкого использования в промышленности, в связи с их достаточной изученностью и доступностью. ПАВ *Sokolan* и пеногаситель АГ 5503 были наименее токсичными для дальнейшей рекультивации почв. Технология очистки нефтезагрязненного грунта предусматривает их введение в аппарат для более эффективного отделения компонентов нефти от загрязненного грунта. Препараты не будут вносить вклад в токсичность сточных вод и отмытого грунта при дальнейшей рекультивации плодородного слоя почвы. Применение сидератов позволяет улучшить состояние почв и создать условия для развития микрофлоры, участвующей в трансформации нефтепродуктов в почве. Нефть оказывает пагубное влияние на динамику роста семядолей и стебля подсолнечника. Лучшую всхожесть показали семена горчицы. Кроме того, пшеница, щирца, овес и ячмень выживают на нефтезагрязненной почве и могут быть использованы для фиторемедиации. Горчица и овес лучше приспособились к условиям сильнокаменистого нефтезагрязненного грунта. Рекомендован одновременный высев в солому овса и горчицы белой. Следует провести предпосевную обработку семян препаратом Лигногумат марка Б калийный, норма расхода – 0,5 л/т, расход рабочей жидкости 10-15 л/т. Обработка посевного материала позволит значительно усилить рост и развитие корневой системы растений на первых этапах роста. Перед посевом не следует вносить минеральные удобрения, но можно провести подкормку минеральными удобрениями во время вегетации. В качестве органоминеральных удобрений возможно использовать твердую фракцию городских бытовых сточных вод.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Sinapis alba*, *Amaranthus albus*, каменистый грунт, промывание грунта в барабанах, ПАВ.

Copyright © 2023 by Cherkas Global University



Published in the USA
Biogeosystem Technique
Issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7316
2023. 10(2): 66-73

DOI: 10.13187/bgt.2023.2.66
<https://bgt.cherkasgu.press>



Searching for Effective Antagonists Against Toxin-Forming Microscopic Fungi and Bacteria

Lenar. R. Valiullin ^{a, b, *}

^a Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

^b All-Russia Research Institute of Phytopatology, Big Vyazemy, Russian Federation

Paper Review Summary:

Received: 2023, October 13

Received in revised form: 2023, November 1

Acceptance: 2023, December 24

Abstract

The paper presents the studies in the field of toxin-forming phytopathogens of plant raw materials prevention. The studied isolates can be used as potential agents of biological control of fungal infections (*Fusarium*, *Verticillum*, *Alternaria*, *Chaetomium*, etc.) in agriculture. In the experiment, when silage was contaminated with the phytopathogen *Chaetomium*, sanitary indicators deteriorated, namely: the crude protein content when exposed to the phytopathogen *Chaetomium* became 26 % below control; the concentration of acid-detergent fiber when exposed to phytopathogen became lower than control by 28 %; the moisture content in the second group increased by 11 %; the concentration of dry matter when exposed to phytopathogen became lower than control by 36 %; the silage acidity index when exposed to phytopathogen became higher than control by 22 %; the concentration of lactic acid in the group with the use of the phytopathogen *Chaetomium* decreased by 20 %, the concentration of acetic acid decreased by 17 % compared to the control group. The use of isolates in corn silage contributed to the improvement of chemical parameters and increased nutritional value. Also, strains of *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. *Lactococcus* spp. and 5-hydroxy-6-methyluracil can be used in the development of new effective drugs to combat various groups of pathogenic microorganisms.

Keywords: plant feed, corn, silage, dry protein, antagonism, opportunistic microflora, isolates.

1. Introduction

The principal methods of combating phytopathogenic microorganisms are the use of chemical preparations or biological agents, including probiotics and antibiotics (Sharma et al., 2009; Valiullin et al., 2020; Mukhammadiev et al., 2021). Phytopathogens in food raw materials can form secondary metabolites or mycotoxins that are toxic to humans and animals and highly stable in the environment. Mycotoxins of fungi of the genus *Fusarium*, *Verticillum*, *Alternaria*, *Chaetomium*, etc. are common in temperate latitudes because climatic conditions are suitable for development and reproduction in plant raw materials. Agricultural products and feeds affected by

* Corresponding author

E-mail addresses: lvaliullin@yandex.ru (L.R. Valiullin)

microscopic fungi change their nutritional value and become toxic to human and animal health. Such products and feeds can cause disorders of the nervous system, liver, kidneys, immune system, and disrupt reproductive ability. Chemicals are widely used in agriculture to protect food raw materials of plant origin, but they can accumulate in soil and food products, which negatively affects human health. Biological agents are safer, but their use is not always effective due to limited use and low stability of action (Valiullin et al., 2020; Tao et al., 2023; Bikmullin et al., 2023). Recently, studies have been conducted that have shown the possibility of using nanoparticles to combat phytopathogenic microorganisms (Li et al., 2019). Nanoparticles are able to penetrate into fungal cells and destroy them, thereby reducing damage from plant diseases (Miedaner et al., 2017; Zgadzay et al., 2021; Afordoanyi et al., 2022). However, the use of nanoparticles can also have a negative impact on the environment and human health, so it is necessary to conduct additional studies to assess their safety.

In general, the development of new methods for improving the safety of feed and combating phytopathogenic microorganisms is an urgent problem of agriculture, which requires an integrated approach and the introduction of innovative technologies (Valiullin et al., 2020; Miftakhov et al., 2022; Kosolapov et al., 2023).

In this regard, the purpose of this study was to search and develop a microbial community, assess its potential as an inhibitor of the development of phytopathogens, as well as improve the quality indicators of plant feeds.

2. Methodology

An isolate antagonistic activity was determined using the agar blocks method with assessment and delayed antagonism. The isolates were sown in Petri dishes on a meat-peptone agar (MRS, HMS media) surface at a temperature 37°C until a "continuous lawn" formation. Then, with a sterile cork drill, the isolate blocks were cut out of the agar surface and transferred to the MPA surface (Chapek growing medium), which was previously seeded with a pathogen test culture in another Petri dish. A pathogen cultivation without an isolate was a control option. The dishes were incubated in a thermostat at a temperature circa 26–37°C. The data were recorded on the 2nd, 4th and 7th days of experiment. The studies were carried out using the methods of microbiological analysis in accordance with the methodology presented in (Nielsen et al., 1999; Fogle et al., 2007; Cheremisin et al., 2021).

Two experiment in the different options were carried out.

Experiment I: 1 – silage not subjected to isolate addition – control; 2 – silage preserved using an isolate containing *Lactococcus lactis*; 3 – silage preserved using an isolate containing *Lactobacillus plantarum*; 4 – silage preserved using an isolate containing *Bacillus subtilis*; 5 – silage preserved using isolates containing *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus*.

Experiment II: 1 – silage not subjected to phytopathogen *Chaetomium* and isolates – control; 2 – silage contaminated with fungi *Chaetomium*; 3 – silage contaminated with mushroom *Chaetomium* and canned using an isolate containing *Lactobacillus plantarum*; 4 – silage contaminated with fungi *Chaetomium* and canned using an isolate containing *Lactococcus lactis*; 5 – silage is contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using an isolate containing *Bacillus subtilis*; 6 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using isolates containing *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*; 7 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using isolates containing *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*; 8 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using 5-hydroxy-6 compound-methyluracil; 9 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using isolates containing *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and the 5-hydroxy-6-methyluracil compound.

The organic acid concentration was determined in accordance with the GOST R 55986-2014 <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293772/4293772192.pdf>. The silage pH value was measured in extracts using a pH meter (150-MI). The silage dry matter content was determined according to the GOST 31640-2012 <https://internet-law.ru/gosts/gost/52337/>. The nitrogen and crude protein contents were determined according the GOST 13496.4-2019 <https://internet-law.ru/gosts/gost/71526/>.

3. Results

A bacterial strains *Bacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* and *Streptomyces* potential as biological means for plant raw materials protection was first described in the early 20th century [15]. The researchers have noticed that the of lactic acid bacteria strains protect harvested plant raw materials from a development of the microscopic fungi producing mycotoxins and pathogenic microorganisms. The data on the antagonistic activity of isolated microorganisms study against the toxin-forming fungi are presented in the [Table 1](#).

The microorganisms №3, 6, 8, 10, 14, 16, 18, 22 and 27 with the most biochemical activity (proteolytic, cellulolytic, etc.) were selected to further research focusing on their ability to suppress the growth and development of toxin-forming microscopic fungi in food raw materials of plant origin.

Table 1. Antagonistic activity of isolated microorganisms to toxin-forming fungi

Test microorganism culture	Isolate								
	3	6	8	10	14	16	18	22	27
<i>Fusarium sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Verticillum sp.</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria sp.</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Chaetomium sp.</i>	-	+	-	-	-	+	-	+	-
<i>Aspergillus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+

Note: "-" – absence; "+" – antagonistic activity

The data of the [Table 1](#) proved an overwhelming resistance to *Fusarium sp.* in the isolates 3, 14 and 22. The isolate №6 showed an antagonism to the phytopathogen *Verticillum sp.* The isolates 10, 14 and 27 developed an antagonism towards *Alternaria sp.* The isolates 3 and 14 showed a suppression of a toxin-forming micromycete *Penicillium sp.* growth. The isolates 6, 16 and 22 showed an antagonism to the phytopathogen *Chaetomium sp.* The isolates 3, 8 and 27 suppressed a toxin-forming micromycete *Aspergillus sp.* growth.

The study of isolated microorganism antagonistic activity to the pathogenic bacteria is presented in the [Table 2](#).

Table 2. Antagonistic activity of isolated microorganisms to pathogenic bacteria

Test microorganism culture	Isolate				
	3	6	8	14	Combination
<i>Clostridium perfringens</i>	+	-	-	-	+
<i>Salmonella</i>	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	+

Note: "-" – absence; "+" – antagonistic activity

From the results of the [Table 2](#), it can be seen that a suppressive ability to *Clostridium perfringens* was shown by the isolate 3 and a combination of isolates. The isolates 6 and 8 and a

combination of isolates showed antagonism to the Salmonella pathogen. An antagonism towards Escherichia coli was shown by the isolate N^o6 and a combination of isolates.

Further, we conducted the experiments to study a use of isolates in the preparation of silage in laboratory models.

Experiment I

The qualitative indicators of silage when using bacterial isolates are presented in the [Table 3](#).

Table 3. Qualitative indicators of silage when using bacterial isolates

Silage sample	Raw protein, %	KDK, %	Humidity, %	Dry matter, %	pH	Organic acids, %		
						lactic acid	acetic acid	butyric acid
1	63,4±3,9	283,5±2,9	67,2±1,8	32,74±2,9	3,92±0,7	64,1±4,5	22,3±0,2	-
2	63,7±4,1	284,1±2,9	66,1±1,9	33,09±2,8	3,80±0,6	63,7±4,3	23,0±0,1	-
3	63,8±4,0	283,0±2,9	67,4±1,8	32,46±2,6	3,75±0,5	64,1±4,8	22,9±0,3	-
4	63,5±3,6	285,0±2,9	66,7±1,6	33,26±2,7	3,70±0,4	66,3±3,6	20,1±0,1	-
5	64,9±3,9	285,0±2,9	67,51±1,9	32,49±2,4	3,83±0,4	3,29±3,8	1,33±0,1	-

* - $p \leq 0,05$

From the data of the [Table 3](#), it can be concluded that the best quality indicators of silage are obtained when it is preserved using the isolates of experiment I, option 5 – *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*. However, it should be borne in mind that a silage quality may vary depending on the storage and making conditions, as well as on the quality and composition of raw materials. Therefore, it is recommended to conduct a regular silage quality laboratory assessment and monitor the process of its preparation.

Microscopic fungi of the *Chaetomium* species are ubiquitous in the environment and are among the most common pollutants of plant raw materials due to the high activity of cellulolytic enzymes ([Fogle et al., 2007](#)). In addition to the biological destruction of the plant substrate, *Chaetomium* micromycetes can form mycotoxins of the cytochalazine family, chaetoglobosins A and C, at levels up to 50 mkg/ml, which poses a high risk to public health ([Nielsen et al., 1999](#)).

To study the effectiveness of protective action of plant raw materials and isolates, an experiment of artificial fungal contamination has been carried out.

Experiment II

The silage contamination with the phytopathogen *Chaetomium* at a concentration of 1×10^2 CFU/ml: option 1 – silage not subjected to the phytopathogens and isolates (control); option 2 – silage contaminated with fungi *Chaetomium*; option 3 – silage contaminated with mushroom *Chaetomium* and canned using an isolate containing *Lactobacillus plantarum*; option 4 – silage contaminated with fungi *Chaetomium* and canned using an isolate containing *Lactococcus lactis*; option 5 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using an isolate containing *Bacillus subtilis*; option 6 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using

isolates containing *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*; option 7 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using isolates containing *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*; option 8 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using 5-hydroxy-6 compound-methyluracil; option 9 – silage contaminated with *Chaetomium* fungus and preserved using isolates containing *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and the compound 5-hydroxy-6-methyluracil.

The qualitative indicators of silage in a case of contamination with *Chaetomium* phytopathogens against the background of the use of bacterial isolates are presented in the Table 4.

Table 4. Qualitative indicators of silage in case of contamination with *Chaetomium* phytopathogens against the background of the use of bacterial isolates

Silage sample	Raw protein, %	ADF, %	Humidity, %	Dry matter, %	pH	Organic acid, %		
						lactic acid	acetic acid	butyric acid
1.	63,4±5,2	283,5±22,7	67,2±5,8	32,7±2,7	4,91±0,28	64,1±4,5	22,3±1,9	0,05±0,001
2.	47,2±4,1*	204,3±19,3*	74,9±5,7	21,0±2,1*	5,98±0,32*	51,3±3,2*	16,3±1,2*	0,26±0,002*
3.	51,8±4,6	221,2±16,9	72,5±4,9	27,5±2,6	5,97±0,34*	53,7±3,5	18,1±1,3	0,23±0,002*
4.	50,3±4,7	216,6±16,9*	73,9±4,6	27,12±2,4	5,91±0,35*	53,4±3,7	17,5±1,3	0,25±0,002*
5.	50,2±4,9	219,3±18,4	73,2±4,5	27,24±2,9	5,92±0,34*	54,2±3,5	18,0±1,3	0,24±0,002
6.	53,4±5,1	224,1±19,3	73,1±6,1	29,23±2,5	5,63±0,29	55,1±3,5	18,7±1,3	0,17±0,002*
7.	55,1±5,4	228,2±20,3	72,3±5,7	30,49±2,8	5,31±0,26	56,2±3,5	19,8±1,4	0,14±0,002*
8.	54,0±4,9	227,4±21,6	73,3±6,2	27,12±2,4	5,57±0,37	53,4±3,5	19,1±1,4	0,12±0,002*
9.	57,1±4,7	231,5±20,7	71,2±5,7	32,17±2,6	5,22±0,32	58,1±4,1	20,3±1,5	0,08±0,002*

* ADF – acid-detergent fiber; p ≤ 0,05

4. Discussion

From the data obtained in the Table 4, it can be seen that a crude protein content in the silage when exposed to a phytopathogen in the second group was 26 % lower than that in control. In the third group, the concentration of crude protein in the silage when using *Lactobacillus plantarum* was 17 % lower than that in the control. In the fourth group, the crude protein content in the silage when using *Lactococcus lactis* was 21 % lower than that in the control. In the fifth group, the concentration of crude protein in the silage when using *Bacillus subtilis* was 20 % lower than that in the control. In the sixth group, the content of crude protein in the silage when using *Lactococcus lactis* microorganisms, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* were 16 % lower than that in the control. The concentration of crude protein in the silage in the seventh group when using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* microorganisms was 17 % lower than that in the control. In the eighth group, the crude protein in the silage content when using the drug 5-hydroxy-6-methyluracil was 16 % lower than that in the control. In the ninth group, the crude protein content in the silage with the use of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* microorganisms and the preparation 5-hydroxy-6-methyluracil was 10 % lower than that in the control.

The ADF concentration in the silage when exposed to phytopathogen in the second option was lower than that in the control by 28 %. In the third option, an ADF concentration in the silage when using *Lactobacillus plantarum* was lower than that in the control by 22 %. In the fourth option, an ADF content in the silage when using *Lactococcus lactis* was lower than control by 24 %. In the fifth option, an ADF concentration in the silage when using *Bacillus subtilis* was 23 % lower than that in the control.

The ADF content in the silage in the sixth option when using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* microorganisms was 21 % lower than that in the control. In the seventh option, an ADF concentration with the use of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* was 20 % lower than that in the control. In the eighth option, the ADF content when using the drug 5-hydroxy-6-methyluracil was 20 % lower than that in the control. In the ninth option, the ADF content with the use of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* microorganisms and the preparation 5-hydroxy-6-methyluracil was 10 % lower than that in the control.

A moisture content in the silage in the second option increased by 11 % compared to the control. The moisture content in the silage in the third, fourth, fifth, sixth, seventh options with the use of microorganisms was higher circa 7 to 9 %, respectively to control.

A concentration of dry matter in the silage when exposed to phytopathogen in the second option was 36 % lower than that in the control. In the third option, a concentration of dry matter when using *Lactobacillus plantarum* was 16 % lower than that in the control. In the fourth option, a dry matter content when using *Lactococcus lactis* was 18 % lower than that in the control. In the fifth option, a concentration of dry matter in silage when the use of *Bacillus subtilis* was lower than that in the control by 17 %. A dry matter content in the sixth option when using the microorganisms *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* was lower than that in the control by 11 %. In the seventh option, a concentration of dry matter when using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* microorganisms was 7 % lower than that in the control. In the eighth option, a content of dry matter when using the drug 5-hydroxy-6-methyluracil was 18 % lower than that in the control. In the ninth option, a content of ADF with the use of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* microorganisms and the preparation 5-hydroxy-6-methyluracil was 5 % lower than that in the control.

A silage acidity index when the silage exposed to phytopathogen in the second option was 22 % higher than that in the control. In the third option, an acidity index of the silage when using *Lactobacillus plantarum* was 21 % higher than that in the control. In the fourth and fifth options, an acidity index of the silage was 20 % higher than that in the control. In the sixth option, an acidity of the silage when using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* was 15 % higher than that in the control. In the seventh option, an acidity index of the silage when using microorganisms *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* was 8 % higher than that in the control. In the eighth option, the dry matter content when using the drug 5-hydroxy-6-methyluracil was 13 % lower than that in the control. In the ninth option, a content of ADF with the use of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* microorganisms and the preparation 5-hydroxy-6-methyluracil was 6 % lower than that in the control.

The lactic acid concentration in the second option decreased by 20 % compared to the control. A lactic acid concentration in the third, fourth, fifth, sixth, seventh and eighth options with the use of microorganisms was lower by 16, 17, 16, 15, 13 and 17 %, respectively to the control. In the ninth group, the lactic acid content was 10 % lower relative to the control.

The acetic acid concentration in the second option decreased by 17 % compared to the control. A lactic acid concentration in the third, fourth, fifth, sixth, seventh and eighth groups with the use of microorganisms was lower by 19, 22, 20, 17, 12 and 14 %, respectively to the control. In the ninth group, a lactic acid content was 9 % lower relative to the control.

A butyric acid concentration in the third option decreased by 12 % compared to the second option. A butyric acid concentration in the fourth, fifth, sixth, seventh and eighth options when using microorganisms was lower by 19, 22, 20, 17, 12 and 14 % compared to the second option. In the ninth option, a butyric acid content was 9 % lower relative to the second option where the phytopathogen was used.

5. Conclusion

The studies conducted have shown that the most isolated microorganisms with antagonism to pathogens and microscopic fungi belonged to bacteria *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* genera. The use of *Bacillus*, *Lactobacillus* and the preparation strains of 5-hydroxy-6-methyluracil for silage conservation provided the most positive result in terms of the crude protein, ADF, dry matter content and organic acids ratio in the finished silage.

6. Funding

The work was supported by the Russian Science Foundation, project 23-26-00161.

References

- Sharma et al., 2009 – Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists. A review. *Biol. Control*. 50: 205-221. DOI: doi.org/10.1016
- Mukhammadiev et al., 2021 – Mukhammadiev, R.S., Skvortsov, E.V., Valiullin, L.R., Glinushkin, A.P., Bagaeva, T.V. (2021). Isolation, purification, and characterization of a lectin from the fungus *Fusarium solani* 4. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 57(2): 206-211. DOI: 10.1134/S0003683821020095
- Valiullin et al., 2020 – Valiullin, L., Titova, V., Tremasov, Y., Huzin, D., Nabatov, A., Validov, S., Bogun, I., Cheremisin, A., Kudayarov, V. (2020). Search for approaches to producing organic fertilizers from raw materials of plant and animal origin. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 17. "XVIIth International Youth Science and Environmental Baltic Region Countries Forum "ECOBALTICA". 012023. DOI: 10.1088/1755-1315/578/1/012023
- Li et al., 2019 – Li, W., Wang, X., Li, C., Sun, J., Li, S., Peng, M. Dual species transcript profiling during the interaction between banana (*Musa acuminata*) and the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *BMC Genomics*. 20(1): 519. DOI: 10.1186/s12864-019-5902-z
- Tao et al., 2023 – Tao, C., Wang, Z., Liu, S., Lv, N., Deng, X., Xiong, W., Shen, Z., Zhang, N., Geisen, S., Li, R., Shen, Q., Kowalchuk, G.A. (2023). Additive fungal interactions drive biocontrol of *Fusarium* wilt disease. *New Phytol*. 238(3): 1198-1214. DOI: 10.1111/nph.18793
- Valiullin et al., 2020 – Valiullin, L.R., Mukhammadiev, Rish. S., Mukhammadiev, Rin. S. et al. (2020). Neutralization of *Fusarium* metabolites in plant materials. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 34(12): 73-7. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-11212
- Bikmullin et al., 2023 – Bikmullin, A.G., Fatkhullin, B., Stetsenko, A., Gabdulkhakov, A., Garaeva, N., Nurullina, L., Klochkova, E., Golubev, A., Khusainov, I., Trachtmann, N., Blokhin, D., Guskov, A., Validov, Sh.Z., Usachev, K., Yusupov, M. (2023). Yet another similarity between mitochondrial and bacterial ribosomal small subunit biogenesis obtained by structural characterization of rbfA from *S. aureus*. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2118. DOI: 10.3390/ijms24032118
- Zgadzay et al., 2021 – Zgadzay, Yu., Kolosova, O., Stetsenko, A., Usachev, K., Validov, Sh., Guskov, A., Yusupov, M. (2021) Abstract p-30: structure of the 80s ribosome from candida albicans revealed by integrative structural biology approach. *International Journal of Biomedicine* 11: 25. DOI: 10.1107/S0108767321093909
- Miedaner et al., 2017 – Miedaner, T., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A. (2017). Editorial: Management of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal food and feed. *Front. Microbiol*. 8: 1543. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01543
- Afardoanyi et al., 2022 – Afardoanyi, D.M., Diabankana, R.G.C., Miftakhov, A.K., Kuchaev, E.S., Validov, S.Z. (2022). Genomic features of pseudomonas putida pcl1760: a biocontrol agent acting via competition for nutrient and niches. *Applied Microbiology* 2(4): 749. DOI: 10.3390/applmicrobiol2040057
- Miftakhov et al., 2022 – Miftakhov, A.K., Diabankana, R.G., Frolov, M.A., Yusupov, M.M., Validov, S.Z., Afardoanyi, D.M. (2023). Persistence as a constituent of a biocontrol mechanism (competition for nutrients and niches) in *Pseudomonas putida* pcl1760. *Microorganisms* 11: 19. DOI: 10.3390/microorganisms11010019
- Kosolapov et al., 2023 – Kosolapov, V.M., Cherniauskikh, V.I., Dumacheva, E.V., Sajfutdinova, L.D., Zavalin, A.A., Glinushkin, A.P., Kosolapova, V.G., Kartabaeva, B.B., Zamulina, I.V., Kalinitchenko, V.P., Baryshev, M.G., Sevostyanov, M.A., Sviridova, L.L., Chaplygin, V.A., Perelomov, L.V., Mandzhiyeva, S.S., Burachevskaya, M.V., Valiullin, L.R. (2023). Scots pine (*pinus sylvestris* l.) ecotypes response to accumulation of heavy metals during reforestation on chalk outcrops. *Forests* 14(7): 1492. DOI: 10.3390/f14071492
- Valiullin et al., 2020 – Valiullin, L.R., Mukhammadiev, R.S., Solovyova, A.S., Skvortsov, E.V., Valiullina, D.A., Kasanova, N.R. (2020) Reducing the risks of environmental pollution by agents of biological origin. *Journal of Environmental Management and Tourism* 11(3.43): 555-562. DOI: 10.14505/jemt.v11.3(43).07

[Fogle et al., 2007](#) – Fogle, M.R., Douglas, D.R., Jumper, C.A., Straus, D.C. (2007) Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*164: 49-53. DOI: 10.1007/s11046-007-9023-x

[Nielsen et al., 1999](#) – Nielsen, K.F., Gravesen, S., Nielsen, P.A., Andersen, B., Thrane U., Frisvad J.C. (1999). Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* 145: 43-56. DOI: 10.1023/A:1007038211176

[Cheremisin et al., 2021](#) – Cheremisin, A.V., Valiullin, L.R., Moroz, A.V. (2021). On the need to apply a comprehensive assessment to determine the state of the ecosystem of soil and vegetation cover of urban areas. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1942. 012093. DOI: 10.1088/1742-6596/1942/1/012093

Copyright © 2023 by Cherkas Global University



Published in the USA
Biogeosystem Technique
Issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7316
2023. 10(2): 74-80

DOI: 10.13187/bgt.2023.2.74
<https://bgt.cherkasgu.press>



Study of Reducing the Danger of T-2 Toxin When Using a Drug of Organomineral Origin

Lenar. R. Valiullin ^{a, b, *}

^a Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

^b All-Russia Research Institute of Phytopatology, Big Vyazemy, Russian Federation

Paper Review Summary:

Received: 2023, October 29

Received in revised form: 2023, November 30

Acceptance: 2023, December 24

Abstract

The prevalence of microscopic fungi and their metabolites in food raw materials and agricultural products poses a great threat to the population. Many mycotoxins are highly toxic and resistant to various environmental factors. The drugs available on the market do not completely neutralize these toxins. The residues of toxins can pose a threat to farm animals, causing a violation in hematological, biochemical, reproductive indicators, a decrease in weight gain, a deterioration in the sanitary quality of meat, milk and eggs. The comparative studies of the T-2 toxin effect on the biological objects – protozoa and primary cell culture (*Stylonychia mytilus* and bull spermatozoa) indicate a selective toxic activity of this type mycotoxin. When protozoa exposed to T-2 toxin in a dose of 0.5 mcg/ml, cell death was 19 %. The corresponding figure for a germ cell culture was 34 %. The protective effect of exposure to T-2 toxin on biological models was observed with the use of all studied protective drugs. When using bentonite from the Apastovo deposit of RT, the decrease in the death of protozoa against the background of the influence of T-2 toxin was 15 % higher compared to the control. When using strains of microorganisms *B. Subtilis* and *L. Plantarum* together with T-2 toxin, the death of protozoa was 10 % higher than the control. The use of the drug KMBI-3 containing bentonite and strains of microorganisms *B. Subtilis* and *L. Plantarum* significantly reduced the toxic effects of T-2 toxin, both on protozoan cells and on primary germ cells. The drug KMBI-3 is a dry powder that has the potential to reduce phytopathogen toxins in food raw materials.

Keywords: biological toxins, food raw materials, feed, toxicity, protozoa, primary germ cells, liver cell culture, mycotoxins, T-2 toxin.

1. Introduction

Mycotoxins are one of the highly toxic pollutants of feed and food raw materials due to the widespread distribution of their producers – microscopic fungi in the environment. Basically, fusariotoxin – T-2 toxin is of the greatest sanitary importance in terms of frequency and prevalence in our country. T-2 toxin is a highly toxic trichothecene produced by microscopic fungi of the genus

* Corresponding author

E-mail addresses: lvaliullin@yandex.ru (L.R. Valiullin)

Fusarium spp. These microscopic fungi are present in corn, barley, wheat, oats and other cereals, which are common components of feed and food raw materials (Escrivá et al., 2015; Zgadzay et al., 2021; Dzhavakhiya et al., 2022; Miftakhov et al., 2022; Kosolapov et al., 2023). According to the frequency of occurrence, T-2 toxin is found in more than 30 % of food raw materials at a level from 10 to 735 micrograms/kg, which poses a potential threat to animals and humans (Wang et al., 2013; Kononenko et al., 2019; Bikmullin et al., 2023). The ingestion of T-2 toxin into the animal body can cause acute or chronic effects with serious disorders in feed intake, growth and development, negatively affects reproductive ability and health (Miedaner et al., 2017; Karmanov et al., 2020; Gagkaeva et al., 2023). Low concentrations of T-2 toxin in birds cause a decrease in body weight gain, egg production, egg quality and lower hatchability (Kononenko et al., 2019; Dazuk et al., 2020). The toxic effects of the T-2 toxin include inhibition of protein, DNA and RNA synthesis and the production of immunoglobulin. In addition, the T-2 toxin accelerates the production of reactive oxygen species (ROS), which causes oxidative stress, further leads to inflammatory reactions and apoptosis (Zhang et al., 2021; Sun et al., 2022). The rate of liver apoptosis and pathology in organs worsened with an increase in the concentration of T-2 toxin, which ranged from 0.5 to 2.0 mg/kg, which induced mitochondrial-mediated apoptosis by producing ROS and stimulating cytochrome translocation and apoptosome formation (Yin et al., 2020). Dose 4.0 mg/kg of T-2 toxin has been reported to cause oxidative stress and inflammatory reactions and damage to kidney function in mice (Valiullin et al., 2020; Huang et al., 2021). In addition, T-2 toxin at a dose of 0.5 mg/kg disrupted various endogenous metabolic processes, causing the accumulation of amino acids and nucleotides in the liver, kidneys and spleen (Wan et al., 2016). T-2 toxin affects tissues in a state of active and rapid division through several toxic mechanisms that cause serious damage, such as the intestines, liver, kidneys, spleen and bones (Sokolovic et al., 2008). Thus, since the T-2 toxin is widely present in animal feed, it often causes a decrease in animal productivity and tissue damage. In animals and humans, T-2 toxin can affect the hematopoietic and nervous systems, suppress humoral and cellular immunity. It has mutagenic, carcinogenic and embryotoxic effects (Lucioli et al., 2013). T-2 toxin can cause apoptosis, programmed cell death in the liver and nervous tissue (Kolf-Clauw et al., 2013).

The purpose of our research was a comparative study of the protective properties of the drug KMBI-3 when exposed to T-2 toxin on protozoa and mammalian cell cultures.

2. Methods

To study the toxic properties of the studied doses of T-2 toxin, a method for determining in vitro toxicity on protozoa was used. The research was carried out on the simplest *Stylonychia mytilus* (GOST 31674-2012). The infusoria were divided into five equal groups: 1) the control group without the addition of toxin and drugs; 2) the second group received T-2 toxin at a dose of 0.5 mcg/ml; 3) the third group received T-2 toxin at a dose of 0.5 mcg/ml and bentonite from the Apastovsky deposit of RT; 4) the fourth group – T-2 toxin at a dose of 0.5 mcg/ml and *B. Subtilis* and *L. Plantarum* strains; 5) the fifth group received T-2 toxin at a dose of 0.5 mcg/ml, *B. Subtilis* and *L. Plantarum* strains and bentonite from the Apastovsky deposit of RT. The assessment of cell death in infusoria was carried out on the basis of a visual analysis of their mobility. The method is based on the fact that living infusoria are in constant motion.

The cytotoxic effect of T-2 toxin on mammalian cells was evaluated according to GOST R ISO 10993-5-2009 («Express method of toxicity assessment using bovine sperm as a test object») <https://internet-law.ru/gosts/gost/49188/>. 3 groups were formed to study the cytotoxicity of T-2 toxin. The first group served as a control; the second group received T-2 toxin mixed with strains of *B. Subtilis* and *L. Plantarum* and bentonite from the Apastovsky deposit of RT in concentrations of 0.5 mcg/ml; the third group received T-2 toxin in concentrations of 0.5 mcg/ml.

3. Results

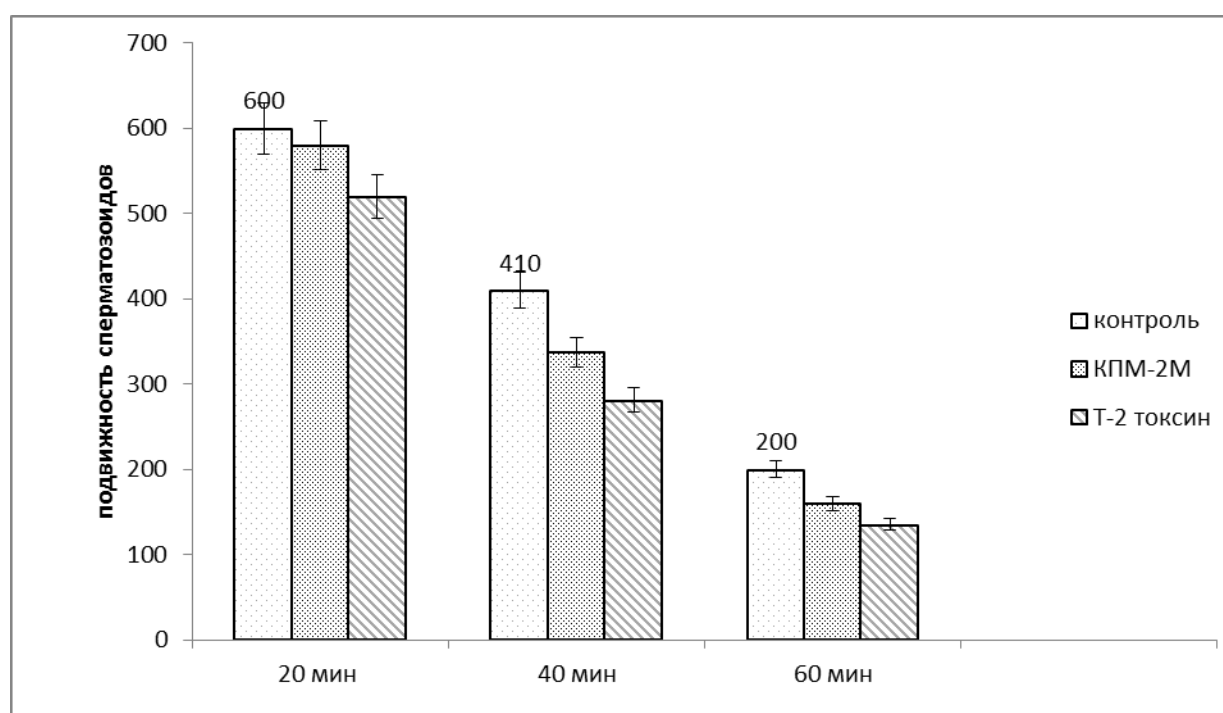
The results of studies on reducing the toxicity of T-2 toxin in protozoa are presented in the Table 1, which shows the results of studies on reducing the toxicity of T-2 toxin in protozoa.

Table 1. T-2 toxicity in protozoa

Groups	Time, %		
	20 min	40 min	60 min
1	100,0±6,5	100,0±6,5	100,0±6,1
2	95,1±6,8	90,4±6,9	81,2±5,8*
3	100,0±6,2	95,2±6,3	85,1±5,9
4	100,0±6,9	98,3±6,5	89,0±6,3
5	100,0±6,1	98,1±6,0	96,1±6,7

Reliability * $p < 0,05$

The results of studies on the reduction of cytotoxic properties of T-2 toxin on bull spermatozoa with KMBI-3 are shown in the [Figure 1](#).

Reliability: $p < 0,05$ **Fig. 1.** Cytotoxic properties of T-2 toxin on bull spermatozoa in doses of 0.5 mkg/ml.

The viability of a cell culture under the influence of T-2 toxin against the background of the use of the protective composition KMBI-3 is shown in the [Figure 2](#).

4. Discussion

Research on protozoa is of great interest due to the high ability to repeat the multiplicity of the experiment, as well as from the point of view of ethical standards in relation to animal research.

From the data presented in the [Table 1](#) it can be seen that at the 20th minute of exposure to T-2 toxin on protozoa, no significant toxic properties were observed when compared with the control group, after 40th minutes in the second group, when exposed to T-2 toxin, the death of protozoa was 20 % greater compared to the control. In the third group, at the 40th minute of exposure, the death of protozoa was observed by 5 % more than in the control group. By this time, in the fourth and fifth groups, there was a slight (2 %) death of protozoa compared to the control group. By the 60th minute of exposure of T-2 toxin to infusoria in the second group, the death of protozoa was 20 %, in the third and fourth groups 15 and 10 %, respectively. In the fifth group, when using a protective drug, the negative effect of T-2 toxin was slightly lower than the control by 5 %.

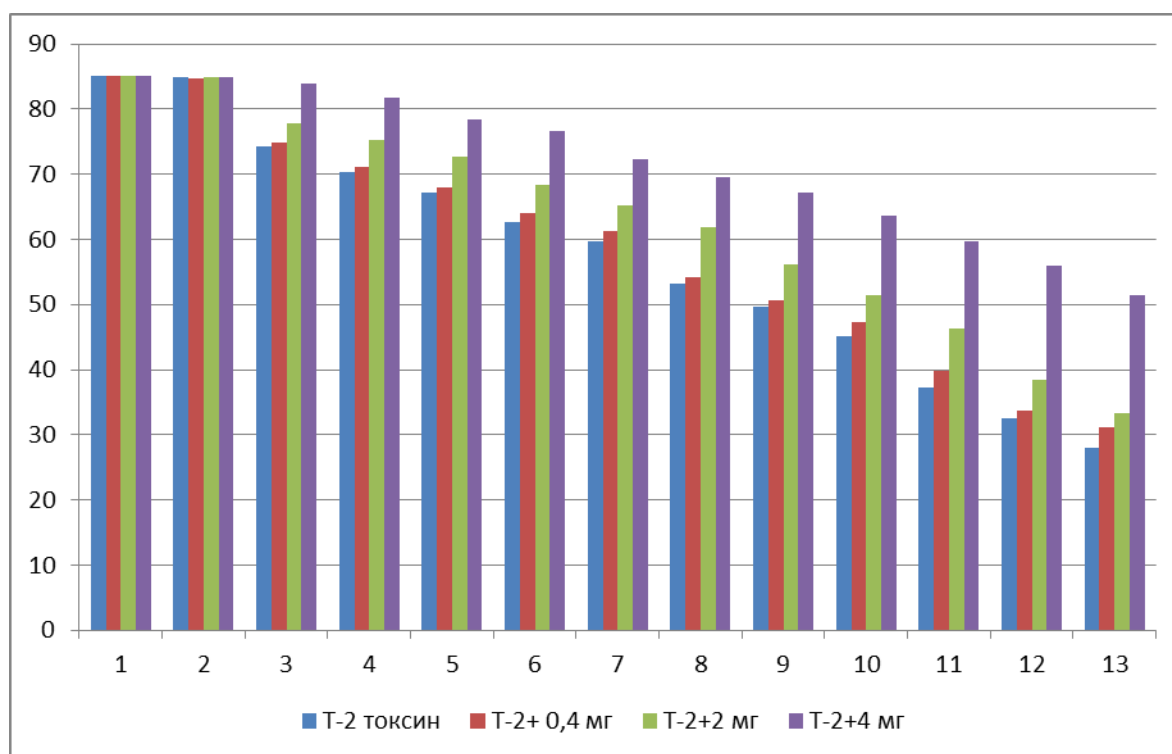


Fig. 2. Cell culture viability under the T-2 toxin against the protective composition KMBI-3 background

It can be seen from the [Figure 1](#) that in the second group, by the 20th minute of the studies, no significant changes were observed when compared with the control group. In the third group, there was a decrease in the average sperm motility by 28 % compared to the control group.

By the 40th minute of the study, a significant change in the motility of the sperm suspension was observed in the second and third groups by 12 and 27 % lower than in the control group.

In the second group, by the 60th minute, the decrease in sperm motility was 20 % compared to the control group. In the third group, the activity of sperm suspension was 34 % lower than in the control group.

In the second series of experiments, primary liver cell culture was used to study the biological properties of T-2 toxin. The cells were cultured in DMEM medium in the presence of 10 % fetal calf serum at 37°C and 5 % CO₂. T-2 toxin was dissolved in a mixture of DMSO and 96 % alcohol in a ratio (1:1).

13 groups participated in the experiment: the first group served as a control with the addition of a mixture of DMSO and 96 % alcohol in a ratio (1:1) and without the addition of T-2 toxin; the second group received 1.07×10^{-9} T-2 toxin; the third, fourth, fifth, sixth, seventh, eighth, ninth, tenth, the eleventh, twelfth and thirteenth groups received in addition to the cells 10.7×10^{-9} , 21.5×10^{-9} , 42.9×10^{-9} , 6.4×10^{-8} , 8.6×10^{-8} , 10.7×10^{-8} , 12.9×10^{-8} , 1.5×10^{-7} , 1.7×10^{-7} , 1.9×10^{-7} , 2.14×10^{-7} M T-2 toxins, respectively. T-2 toxin and bacterial-based compositions KMBI-3 were mixed and aged together for 6 hours and after exposure were added to a medium with a cellular monolayer. The concentration of bacterial-based compositions KMBI-3 was used for research in three variants: 0.4, 2.4 mg/ml.

[Figure 2](#) shows that when T-2 toxin was exposed to cell culture, viability in the second, third, fourth and fifth groups decreased slightly. In the sixth, seventh, eighth, ninth, tenth, eleventh, twelfth and thirteenth groups, cell viability decreased by 26,5; 30,1; 37,5; 41,8; 47,1; 56,3; 61,9 and 66.0 % compared to the control.

When using a protective composition at a dose of 4 mg/ml, the least negative effect of T-2 toxin on cell culture was observed. Viability in the second, third, fourth, fifth, sixth and seventh groups decreased slightly. In the eighth, ninth, tenth, eleventh, twelfth and thirteenth groups, cell viability decreased relative to the control by 18,4; 21,2; 25,4; 30,1; 36,0 and 40,0 %, respectively.

5. Conclusion

The comparative studies of the T-2 toxin effect in doses of 0.5 mcg/ml on the biological objects – protozoa and primary cell culture (*Stylonychia mytilus* and bull spermatozoa) indicate a selective toxic activity of this type mycotoxin. When the protozoa exposed to the T-2 toxin in doses of 0.5 mcg/ml for 60 minutes, the toxicity was 18 %, and the spermatozoa exposed to the T-2 toxin at the same dose and time, their activity decreased by 34 %, respectively, compared with the control group. When using the protective composition KMBI-3 against the T-2 toxin on protozoa for 60 minutes, their survival rate was 19 % higher compared to the group without the protective drugs. When studying the possibility of the negative effects of T-2 toxin on living systems reducing, it was seen that the composition of KMBI-3, consisting of strains of *B. Subtilis* and *L. Plantarum* and bentonite from the Apastovo deposit of the Republic of Tatarstan most effectively exhibit protective properties and are of interest for further work on the biodegradation of toxins of biological origin.

6. Acknowledgments

The author expresses his deep gratitude to Shamil Zavdatovich Validov (Research Institute "Laboratory of Molecular Genetic and Microbiological Methods" FIT KAZNTS RAS); Rishat Salavatovich Mukhammadiev, Eduard Iliasovich Semenov, Risnat Salavatovich Mukhammadiev, Andrey Ivanovich Samsonov, Almaz Saubanovich Saifullin (Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety); Alexey Anatolyevich Nabatov (Department of Biochemistry of Kazan State Medical University) and Nikolai Ivanovich Budynkov (FGBNU "VNIIF") for their help and valuable advice on conducting analytical experiments.

7. Funding

The work was supported by the Russian Science Foundation, project 23-26-00161.

References

- Escrivá et al., 2015 – Escriva, L., Font, G., Manyes, L. (2015). In vivo toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: a review. *Food Chem. Toxicol.* 78: 185-206. DOI: 10.1016/j.fct.2015.02.005
- Dzhavakhiya et al., 2022 – Dzhavakhiya, V.G., Statsyuk, N.V., Mikityuk, O.D., Voinova, T.M., Shcherbakova, L.A. (2022). 6-Demethylmevinolin as a blocker of the biosynthesis of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol by toxigenic fungi-contaminants of agricultural products. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK.* 36(8): 97-102. DOI: 10.53859/02352451_2022_36_8_97
- Karmanov et al., 2020 – Karmanov, A.P., Kanarsky, A.V., Kanarskaya, Z.A., Kocheva, L.S., Semenov, E.I., Bogdanovich, N.I., Belyy, V.A. (2020). In vitro adsorption-desorption of aflatoxin B₁ on Pepper's lignins isolated from grassy plants. *Int. J. Biol. Macromol.* 1(144): 111-117. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.081
- Wang et al., 2013 – Wang, Y., Liu, S., Zheng, H., He, C., Zhang, H. (2013). T-2 toxin, zearalenone and fumonisin B₁ in feedstuffs from China. *Food. Addit. Contam. Part B, Surveill.* 6: 116-122. DOI: 10.1080/19393210.2013.764506.
- Kononenko et al., 2019 – Kononenko, G.P., Burkin, A.A., Zotova, E.V., Smirnov, A.M. (2019) Mycotoxicological study of fodder corn grain (1998-2018). *Russian Agricultural Science.* 3: 28-31. DOI: 10.31857/S2500-26272019328-31
- Gagkaeva et al., 2023 – Gagkaeva, T.Yu., Orina, A.S., Gomzhina, M.M., Gavrilova, O.P. (2023). *Fusarium bilaiae*, a new cryptic species in the *Fusarium Fujikuroi* complex associated with sunflower. *Mycologia.* 115(6): 787-801.
- Dazuk et al., 2020 – Dazuk, V., Boiago, M.M., Rolim, G., Paravisi, A., Copetti, P.M., Bissacotti, B.F., Morsch, V. M., Vedovatto, M., Gazoni, F. L., Matte, F., Gloria, E.M., Da Silva, A.S. (2020). Laying hens fed mycotoxin-contaminated feed produced by fusarium fungi (T-2 toxin and fumonisin B₁) and *saccharomyces cerevisiae* lysate: impacts on poultry health, productive efficiency, and egg quality. *Microb. Pathog.* 149: 104517. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104517
- Kononenko et al., 2019 – Kononenko, G.P., Ustyuzhanina, M.I., Orina, A.S. (2019). Multi-substrate screening the ability to produce alternariol among *alternaria arborescens* strains. *Journal of Veterinary Science and Technology.* 10: 41-42. DOI: 10.4172/2157-7579-C1-043

Sun et al., 2022 – Sun, T, Zhang, Q, Li, M, Tang, S, Dai, C. (2022). T-2 Toxin Induces Apoptotic Cell Death and Protective Autophagy in Mouse Microglia BV2 Cells. *J Fungi (Basel)*. 8(8): 761. DOI: 10.3390/jof8080761

Zhang et al., 2021 – Zhang, M., Wang, M., Wang, H., Zhang, Y., Li, Z., Feng, Y., Liu, Y., Liao, Y., Wang, W., Fang, Q., Chen, J. (2021). Decreased expression of heat shock protein 47 is associated with T-2 toxin and low selenium-induced matrix degradation in cartilages of Kashin-Beck disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 199: 944-954. DOI: 10.1007/s12011-020-02237-1

Yin et al., 2020 – Yin, H, Han, S, Chen, Y, Wang, Y, Li, D, Zhu, Q. (2020). T-2 Toxin induces oxidative stress, apoptosis and cytoprotective autophagy in chicken hepatocytes. *Toxins (Basel)*. 12(2): 90. DOI: 10.3390/toxins12020090

Huang et al., 2021 – Huang, L., Zhu, L., Ou, Z., Ma, C., Kong, L., Huang, Y., Chen, Y., Zhao, H., Wen, L., Wu, J., Yuan, Z., Yi, J. (2021). Betulinic acid protects against renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation via Nrf2 signaling pathway in T-2 toxin-induced mice. *Int. Immunopharmacol.* 101: 108210. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108210

Wan et al., 2016 – Wan, Q., He, Q., Deng, X., Hao, F., Tang, H., Wang, Y. (2016). Systemic metabolic responses of broiler chickens and piglets to acute T-2 toxin Intravenous Exposure. *J Agric Food Chem.* 64(3): 714-23. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05076

Sokolovic et al., 2008 – Sokolovic, M., Garaj-Vrhovac, V., Simpraga, B.L. (2008). T-2 toxin: Incidence and toxicity in poultry. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 59: 43–52. DOI: 10.2478/10004-1254-59-2008-1843

GOST R ISO 10993-5-2009 – Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. [Electronic resource]. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/8496/>

Kolf-Clauw et al., 2013 – Kolf-Clauw, M., Sassahara, M., Luciola, J, Rubira-Gerez, J., Alassane-Kpembé, I., Lyazhri, F., Borin, C., Oswald, I.P. (2013). The emerging mycotoxin, enniatin B1, down-modulates the gastrointestinal toxicity of T-2 toxin in vitro on intestinal epithelial cells and ex vivo on intestinal explants. *Arch Toxicol.* 87(12): 2233-41. DOI: 10.1007/s00204-013-1067-8

GOST 31674-2012 – Feeds, compound feeds, material for compound feeds. Methods for the determination of common toxicity. [Electronic resource]. URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/52644>

Luciola et al., 2013 – Luciola, J., Pinton, P., Callu, P., Laffitte, J., Grosjean, F., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., Bracarense, A.P. (2013). The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: interest of ex vivo models as an alternative to in vivo experiments. *Toxicon.* 66: 31-6. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.01.024

Valiullin et al., 2020 – Valiullin, L.R., Mukhammadiev, Rish.S., Mukhammadiev, Rin.S., et al. (2020). Neutralization of *Fusarium* metabolites in plant materials. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK.* 34(12): 73-7. DOI: 10.24411/0235-2451-2020-11212

Bikmullin et al., 2023 – Bikmullin, A.G., Fatkhullin, B., Stetsenko, A., Gabdulkhakov, A., Garaeva, N., Nurullina, L., Klochkova, E., Golubev, A., Khusainov, I., Trachtmann, N., Blokhin, D., Guskov, A., Validov, Sh.Z., Usachev, K., Yusupov, M. (2023). Yet another similarity between mitochondrial and bacterial ribosomal small subunit biogenesis obtained by structural characterization of rbfA from *S. aureus*. *International Journal of Molecular Sciences.* 24(3): 2118. DOI: 10.3390/ijms24032118

Zgadzay et al., 2021 – Zgadzay, Yu., Kolosova, O., Stetsenko, A., Usachev, K., Validov Sh., Guskov A., Yusupov M. (2021). Abstract p-30: structure of the 80s ribosome from candida albicans revealed by integrative structural biology approach. *International Journal of Biomedicine.* 11. 25. DOI: 10.1107/S0108767321093909

Miedaner et al., 2017 – Miedaner, T., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A. (2017). Editorial: Management of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal food and feed. *Front. Microbiol.* 8: 1543. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01543

Afardoanyi et al., 2022 – Afardoanyi, D.M., Diabankana, R.G.C., Miftakhov, A.K., Kuchaev, E.S., Validov, S.Z. (2022). Genomic features of *Pseudomonas putida* pcl1760: a biocontrol agent acting via competition for nutrient and niches. *Applied Microbiology.* 2.4. 749. DOI: 10.3390/applmicrobiol2040057

Miftakhov et al., 2022 – Miftakhov, A.K., Diabankana, R.G., Frolov, M.A., Yusupov, M.M., Validov, S.Z., Afardoanyi, D.M. (2023). Persistence as a constituent of a biocontrol mechanism

(competition for nutrients and niches) in *Pseudomonas putida* pcl1760. *Microorganisms*. 11. 19. DOI: 10.3390/microorganisms11010019

[Kosolapov et al., 2023](#) – Kosolapov, V.M., Cherniavskih, V.I., Dumacheva, E.V., Sajfutdinova, L.D., Zavalin, A.A., Glinushkin, A.P., Kosolapova, V.G., Kartabaeva, B.B., Zamulina, I.V., Kalinitchenko, V.P., Baryshev, M.G., Sevostyanov, M.A., Sviridova, L.L., Chaplygin, V.A., Perelomov, L.V., Mandzhieva, S.S., Burachevskaya, M.V., Valiullin, L.R. (2023). Scots pine (*pinus sylvestris* L.) ecotypes response to accumulation of heavy metals during reforestation on chalk outcrops. 14.7. 1492. DOI: 10.3390/f14071492