

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ

И.Л. Бухарина✉, А.А. Исупова, В.И. Лямзин, М.А. Лебедева

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Россия, 426034, г. Ижевск, ул. Университетская, д. 1

buharin@udmlink.ru

Приведены результаты исследований по использованию культур микроскопических эндотрофных грибов в восстановлении нефтезагрязненных почв. Проведены исследования пределов устойчивости к действию различных концентраций нефти у изолятов (культур) микроскопических грибов *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc и *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw, выделенных из урбанопочв с высоким уровнем загрязнения. Выявлены их широкие пределы толерантности к содержанию нефти. В рамках проведенного лабораторного эксперимента по моделированию 5 и 10 % загрязнения дерново-подзолистой супесчаной и суглинистой почв нефтью определена эффективность очистки нефтезагрязненных почв с помощью биопрепарата «Микрозим Петро Трит», содержащего бактерии деструкторов нефти, фиторемедианта мятлика лугового — *Poa pratensis* L. и микроскопического гриба *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. При использовании этой же совокупности биоремедиантов и микроскопического гриба *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc определена эффективность восстановления биологической активности нефтезагрязненных почв. Полученные результаты доказали эффективность совместного применения биопрепарата, фиторемедианта и микроскопических грибов для очистки и восстановления нефтезагрязненных почв.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение почв, биоремедиация, биологическая активность почвы, микроскопические грибы, биопрепарат

Ссылка для цитирования: Бухарина И.Л., Исупова А.А., Лямзин В.И., Лебедева М.А. Перспективы использования консорциумов микроорганизмов и высших растений в восстановлении нефтезагрязненных земель // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2022. Т. 26. № 6. С. 14–23. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-6-14-23

Современное развитие нефтедобывающей отрасли невозможно рассматривать без его негативного влияния на экосистемы. Загрязнение почв нефтью нарушает стабильное функционирование экосистем: изменяются физико-химические свойства почвы, активность основных ферментов, участвующих в важных биологических процессах, нарушается соотношение основных биогенных элементов в почве, — это создает существенные экологические проблемы [1]. В условиях нефтяного загрязнения почв особый характер приобретает изменение их биологических показателей. Нефтяное загрязнение ингибирует активность ферментов, участвующих в углеводном обмене, что, в свою очередь, приводит к снижению поступающего в почву органического материала и накопленной в нем энергии, а также к аккумуляции его в почве в виде гумуса [2].

При разработке экологически и экономически обоснованных способов восстановления нефтезагрязненных почв наиболее перспективными представляются биотехнологические методы (биоремедиация), основанные на способности отдельных видов микроорганизмов использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника энергии или переводить их в менее

токсичные формы [3–5]. Эти методы очистки почв менее негативно воздействуют на окружающую среду, нежели другие методы. Основными приемами биоремедиации являются биостимуляция и биоаугментация (биодополнение) [6].

Территория Удмуртской Республики представлена преимущественно дерново-подзолистыми суглинистыми почвами, обладающими недостаточной скоростью самовосстановления в природных климатических условиях, которые характеризуются неблагоприятными с агрономической точки зрения свойствами [7]. При проведении работ по рекультивации нефтезагрязненных почв установлено, что нефтяные углеводороды наиболее эффективно разрушаются биопрепаратами-нефтедеструкторами [8]. Содержащиеся в биопрепаратах штаммы микроорганизмов стимулируют местный почвенный биоценоз, создавая благоприятные условия для трансформации нефтяных углеводородов в их трудноокисляемые формы. В результате образуются органические соединения гумусоподобного характера, положительно влияющие на почвенное плодородие [9].

Однако эффективность применения биопрепаратов-нефтедеструкторов зависит от типа почвы, ее минерального и органического состава, температуры, влажности, содержания кислорода, характера процессов адсорбции, окисления, гидролиза

и каталитического разложения, а также от состава микробного комплекса, влияющего на скорость деградации углеводов [3]. Зачастую указанные показатели не являются оптимальными для развития углеводородокисляющих микроорганизмов и ограничивают эффективность применения биопрепаратов [10]. В связи с этим возникает необходимость увеличения внесения стартовых количеств не только биопрепаратов, но и минеральных удобрений, проведения дополнительных мероприятий по аэрации и увлажнению загрязненных почв, поэтому биологический метод рекультивации малоэффективен, либо затратен [11]. Применение биопрепаратов-нефтедеструкторов позволяет только очищать загрязненную почву от нефти, не восстанавливая ее до нужных биологических параметров.

На современном этапе исследований по ремедиации почв большое внимание уделяется изучению возможности использования симбиотических связей организмов разной таксономической принадлежности [12]. Например, связи, возникающие между высшими растениями и микроскопическими грибами (микромикетами), оказывают значительное влияние на развитие представителей обеих групп, а также на показатели плодородия почв и процессы обмена биогенными элементами [13]. Основная функция микромикетов заключается в транспортировке минеральных элементов к корневой системе растения [14, 15], вследствие чего она стимулирует микробную активность почвы, обеспечивая биологически оптимальную среду для разложения органических загрязнителей [5, 16, 17]. Кроме того, микромикеты способны проявлять ферментативную активность, направленную на деградацию органических загрязнителей [5, 14, 16]. Такие подходы уже находят свое применение в ризоремедиации — стимулировании почвенных микроорганизмов на этапе биоремедиации почв [18].

Микромикеты способны расти в широком диапазоне температуры и кислотности почвы, а когда уровень влажности почвы является весьма низким и критичным для большинства бактерий, грибы способны разлагать органические остатки и тем самым увеличивать количество азота в почве [19]. Устойчивость микоризы к полициклическим ароматическим углеводородам и изменение скорости их деградации способствует приобретению растениями питательных веществ, что отражается на формировании растительного покрова на загрязненной почве [20]. Кроме того, имеющиеся данные о совместном применении микромикетов и детоксицирующих бактерий можно использовать для разработки современных методов фиторемедиации [21]. Использование консортивных связей способно расширить

диапазон действия биопрепарата, создавая оптимальные условия для роста и развития консорциумов микроорганизмов-нефтедеструкторов. Данный прием позволяет не только повысить эффективность очистки почв от нефти, но и активировать процессы их восстановления [8]. Несмотря на то, что особенности функционирования микромикетов при фиторемедиации загрязненных почв изучены достаточно хорошо, исследований, посвященных применению эндофитных грибов при деградации нефтяного загрязнения почв проводятся крайне мало. Дальнейшее изучение особенностей функционирования микромикетов в загрязненной почвенной среде является перспективным для разработки биоремедиационных методов деструкции загрязняющих веществ [5, 22].

Поскольку характер влияния нефтяного загрязнения определяется свойствами загрязняемой почвы, главным образом ее естественной буферностью, было принято решение провести исследование на разных типах почв.

Цель работы

Цель работы — изучение перспектив использования консорциумов микроорганизмов и высших растений при восстановлении нефтезагрязненных почв.

Материалы и методы

Для определения потенциала использования культур микроскопических грибов в восстановлении нефтезагрязненных земель первоначально были проведены исследования по выявлению пределов устойчивости к действию различных концентраций нефти у некоторых изолятов (культур) микроскопических эндотрофных грибов *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc и *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw, выделенных из урбано-почв с высоким уровнем загрязнения [23–25]. Микромикеты высаживали на субстраты с внесенной в них нефтью в различных концентрациях для дальнейшего наблюдения за динамикой роста и размерами колоний мицелия грибов. Оба микромикета способны выживать при высоких концентрациях нефти (до 10 %) в субстрате, однако для выживания они используют разные механизмы. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc в начале эксперимента отличался активным ростом, далее наблюдалось снижение скорости роста колоний. *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw, наоборот, в начале эксперимента не отличался активным ростом (период адаптации), а со второй недели эксперимента проявлял высокие показатели роста колоний мицелия (табл. 1, 2).

Таким образом, можно отметить видоспецифические стратегии адаптации грибов в условиях нефтяного загрязнения, которые показали,

Т а б л и ц а 1
Скорость роста колоний мицелия
Fusarium equiseti (Corda) Sacc (мм/сут)
Fusarium equiseti (Corda) Sacc mycelium
growth rate (mm/day)

Период наблюдения	Контроль	Содержание нефти в субстрате, %				
		1	2,5	5	7,5	10
1 неделя	6,5	6,8	7,2	6,8	2,5	2
2 недели	2,3	2,7	1,9	2,3	3,4	2,5
3 недели	2	0,9	0,3	0	1,6	0

Т а б л и ц а 2
Скорость роста колоний мицелия
Cylindrocarpon magnusianum Wollenw (мм/сут)
Mycelium growth rate
of *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (mm/day)

Период наблюдения	Контроль	Содержание нефти в субстрате, %				
		1	2,5	5	7,5	10
1 неделя	2	1,4	1,3	1,1	0,9	0,7
2 недели	4,5	4	2,9	3,4	2,1	2,3
3 недели	2,9	3,7	0,3	2	1,9	3,2

что оба вида можно использовать в технологиях биорекультивации, но при разных условиях. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc целесообразно использовать при низких концентрациях нефти в субстрате и для быстрого восстановления почвы, *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw — при длительном нефтяном загрязнении и высоких концентрациях нефти.

Далее в лабораторных условиях с помощью экспериментов было исследовано влияние сочетания биопрепарата «Микрозим Петро Трит», содержащего бактерии деструкторов нефти, и указанных микроскопических грибов на эффективность разложения нефти. Использовали контейнеры, содержащие по 0,5 кг супесчаного или суглинистого почвенного грунта, в который, согласно схеме эксперимента, была внесена нефть массой 25 и 50 г (соответственно 50 и 100 г/кг) для моделирования 5 и 10%-го загрязнения почвы соответственно. По схеме эксперимента, биопрепарат «Микрозим Петро Трит» был внесен в виде водной суспензии из расчета 1 и 1,5 г на 1 кг почвы в вариантах 5 и 10%-го загрязнения нефтью соответственно, в соответствии с технологией применения биопрепарата. Биопрепарат представляет собой микробиологический реагент — биодеструктор нефтяных углеводородов, предназначенный для очистки почвы от загрязнения ими. Спустя 10 дней в соответствующие варианты опыта согласно схеме лабораторного эксперимента (табл. 3) были посеяны семена мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) (норма высева 10–15 г/м²).

Через 10 дней после прорастания семян в соответствующие варианты опыта была внесена грибная суспензия (25 мл на один контейнер). Для производства суспензии [26] были использованы культуры эндотрофных микромицетов *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc и *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (табл. 3).

Лабораторный эксперимент проводили в контролируемых условиях климатической камеры BINDERKWF. С 08:00 до 18:00 был установлен дневной режим: температура +23 °С; максимальное освещение 15 000 лк; вентиляция. С 18:00 до 08:00 устанавливали ночной режим: температура +18 °С; вентиляция; отсутствие освещения. В вариантах опыта осуществлялся полив почвы.

По завершении эксперимента был проведен анализ почв на содержание нефти (ПНДФ 16.1:2.2.22–98) и основные агрохимические показатели (ГОСТ 26483–85, ГОСТ Р 54650–2011, ГОСТ 26213–91, ГОСТ 26489–85, ГОСТ 26951–86). Также были определены инвертазная активность почв (метод В.Ф. Купреевича, Т.А. Щербаковой), биологическая масса надземной части и сухое вещество растений, степень развития грибной инфекции в корневой системе растений (метод микроскопирования Травло). Обработку результатов эксперимента проводили с использованием статистического пакета Statistica 13.0.

Анализ почвенных образцов на содержание нефти проводился в Центральной экоаналитической лаборатории «Региональный центр государственного экологического контроля и мониторинга по Удмуртской Республике» (РЦ ГЭКМ УР). Количественный анализ на определение содержания нефти проведен согласно ПНДФ 16.1;2.2.22–98 «Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах» [27–29].

Среди почвенных показателей биологической активности в рамках лабораторного эксперимента определен уровень активности инвертазы. Инвертаза катализирует реакции гидролитического расщепления сахарозы на эквимолярные количества глюкозы и фруктозы, воздействует на другие углеводы с образованием молекул фруктозы — энергетического продукта для жизнедеятельности микроорганизмов, катализирует фруктозотрансферазные реакции. Исследования многих авторов показали, что активность инвертазы лучше других ферментов отражает уровень плодородия и биологической активности почв [30].

Определение активности инвертазы проведено методом В.Ф. Купреевича и Т.А. Щербаковой, основанным на измерении количества глюкозы, образующейся при гидролизе сахарозы и на способности глюкозы и фруктозы, образующихся при гидролизе сахарозы, восстанавливать медь,

Схема лабораторного эксперимента

Laboratory experiment scheme

Фактор			Варианты опытов				
Обозначение	Наименование	Градация	I	II	III	IV	
А	Содержание нефти (% массы почвы)	Градация	A1B1C1	A2B1C1	A1B1C2	A2B1C2	
	50 г/кг (5 %)						A1
	100 г/кг (10 %)						A2
В	Биоремедиант	Градация	A1B6C1	A2B6C1	A1B6C2	A2B6C2	
	Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» (контроль)	B1					
	Фиторемедиант мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.)	B2					
	Фиторемедиант мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.) + <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc	B3					
	Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + Фиторемедиант мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.) + <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc	B4					
	Фиторемедиант мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.) + <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> Wollenw	B5					
	Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + Фиторемедиант мятлик луговой (<i>Poa pratensis</i> L.) + <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> Wollenw	B6					
С	Гранулометрический состав почвы	Градация	A1B6C1	A2B6C1	A1B6C2	A2B6C2	
	Супесчаная	C1					
	Суглинистая	C2					

Примечание. Варианты A1B1C1, A2B1C1, A1B1C2 и A2B1C2 были использованы в качестве контрольных вариантов

которая содержится в растворе Феллинга. По количеству образовавшегося оксида меди (I) определяют содержание глюкозы в растворе. Поскольку катализатором образования данных сахаров является инвертаза, то по количеству гексоз судят об инвертазной активности почвы.

В качестве контроля (варианта сравнения) для каждого типа почв и степени загрязнения использован вариант с биопрепаратом «Микрозим Петро Трит»: для супесчаной почвы и 5%-го загрязнения нефтью — контроль A1B1C1 и для 10%-го загрязнения — A2B1C1; для суглинистой почвы с 5%-м загрязнением — A1B1C2 и для 10%-го загрязнения — A2B1C2.

Результаты и обсуждение

Эксперимент проводили на суглинистой и супесчаной дерново-подзолистых почвах, наиболее подвергаемых нефтяному загрязнению в Удмуртской Республике. По окончании эксперимента при 5 и 10%-м загрязнении супесчаной и суглинистой почв нефтью обнаружены следующие достоверные изменения в содержании нефти.

При использовании в качестве составной части биоремедиантов гриба *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc при 5 и 10%-м загрязнении супесчаной и суг-

линистой почв нефтью достоверных изменений в содержании нефти по всем вариантам опыта не обнаружено (табл. 4).

Результаты исследований показали наибольшую эффективность использования в консорциуме биоремедиантов культур микроскопических грибов *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. По окончании эксперимента установлено, что в вариантах с 5%-м внесением нефти (суглинистая почва) ее содержание составило: в варианте A1B1C2 — 9900 ± 1500 мг/кг; в вариантах с фиторемедиантом мятликом луговым (*Poa pratensis* L.) (A1B2C2) и совокупностью фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + грибы *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (A1B5C2) — 13800 ± 3500 мг/кг и 10100 ± 2500 мг/кг соответственно, что находится в рамках статистической погрешности. Достоверная разница результатов получена при использовании полного консорциума биоремедиантов — биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (A1B6C2). В этом случае конечное содержание нефти в почве составило 5400 ± 1600 мг/кг. Достоверная разница результатов установлена и при 10%-м

Т а б л и ц а 4

Конечное содержание нефти (мг/кг) в вариантах опыта с супесчаной и суглинистой почвами при использовании гриба *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc

Final oil content (mg/kg) in the experiment with sandy and loamy soils using the fungus *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc

Тип почвы по гранулометрическому составу	Содержание нефти, %	Биоремедианты			
		B1	B2	B3	B4
Суглинистая (C2)	5 (A1)	9900 ± 1500	13800 ± 3500	11300 ± 2800	12000 ± 3000
	10 (A2)	20300 ± 5100	26600 ± 6700	23800 ± 6000	22000 ± 5500
Супесчаная (C1)	5 (A1)	11000 ± 2800	16600 ± 4100	13000 ± 3300	11600 ± 2800
	10 (A2)	27000 ± 6800	31000 ± 7700	32500 ± 8100	27900 ± 7000

Примечание. B1–B4 — см. табл. 3.

Т а б л и ц а 5

Конечное содержание нефти (мг/кг) в вариантах опыта с супесчаной и суглинистой почвами при использовании гриба *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw

Final oil content (mg/kg) in the experimental variants with sandy and loamy soils using the fungus *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw

Тип почвы по гранулометрическому составу	Содержание нефти, %	Биоремедианты			
		B1	B2	B5	B6
Суглинистая (C2)	5 (A1)	9900 ± 1500	13800 ± 3500	10100 ± 2500	5400 ± 1600
	10 (A2)	20300 ± 2100	26600 ± 6700	19000 ± 4700	14300 ± 2800
Супесчаная (C1)	5 (A1)	11000 ± 2800	16600 ± 4100	10800 ± 2700	6800 ± 1300
	10 (A2)	27000 ± 6800	31000 ± 7700	25600 ± 6400	18300 ± 4600

Примечание. B1, B2, B5, B6 — см. табл. 3.

загрязнении, причем именно при использовании полного консорциума биоремедиантов.

На супесчаных почвах зафиксировано достоверное снижение содержания нефти при моделировании 5%-го загрязнения почв нефтью при использовании полного консорциума – биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (A1B6C1) по сравнению с вариантом A1B1C1 контролем: 11000 ± 2800 мг/кг и 6800 ± 1300 мг/кг соответственно (табл. 5).

Определена биологическая (инвертазная) активность почвы. Активность инвертазы более других ферментов отражает уровень плодородия и биологической активности почв. В процессе исследования изучено также влияние различных сочетаний биоремедиантов на инвертазную активность почвы, подвергнушуюся загрязнению нефтью.

При использовании гриба *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc получены следующие значения инвертазной активности нефтезагрязненных почв (табл. 6). В варианте с полным составом биоремедиантов на супесчаной почве с 5%-м загрязнением нефтью — Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант мятлик луговой

(*Poa pratensis* L.) + гриб *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (A1B4C1) изменение значений инвертазной активности оказалось достоверным и более чем в 1,2 раза больше, чем в варианте A1B1C1. В варианте A1B4C1 значение инвертазной активности оказалось достоверно почти в 1,8 раза больше варианта, содержащего совокупность фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + + гриб *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (A1B3C1). При 10%-м загрязнении нефтью значение инвертазной активности во всех вариантах оказалось достоверно ниже, чем в варианте A2B1C1, в котором был использован только биопрепарат. Таким образом, на супесчаной почве при 5%-м загрязнении нефтью большее положительное влияние на биологическую активность почвы оказал полный состав биоремедиантов с грибом *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. При 10%-м загрязнении положительное влияние на изменение активности инвертазы выявлено при внесении биопрепарата «Микрозим Петро Трит».

На суглинистой почве при 5%-м загрязнении нефтью в варианте биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (A1B4C2) значение инвертазной активности

Т а б л и ц а 6

**Значение инвертазной активности почв (мг глюкозы/г почвы в сут.)
в опыте с применением гриба *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc**

The value of soil invertase activity (mg glucose/g soil per day) in the experiment using
the fungus *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc

Тип почвы по гранулометрическому составу	Содержание нефти, %	Биоремедианты			
		B1	B2	B3	B4
Суглинистая (C2)	5 (A1)	11,5 ± 1,4	–	16,9 ± 1,4	15,3 ± 1,0
	10 (A2)	13,5 ± 1,1	16,1 ± 0,5	15,0 ± 0,5	31,8 ± 0,4
Супесчаная (C1)	5 (A1)	21,0 ± 3,3	18,2 ± 10,1	14,8 ± 0,1	26,3 ± 2,0
	10 (A2)	37,1 ± 1,4	28,6 ± 13	22,2 ± 3,5	27,0 ± 3,2

Примечание. B1–B4 — см. табл. 3.

Т а б л и ц а 7

**Значение инвертазной активности почв (мг глюкозы/г почвы в сут.)
в опыте с применением гриба *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw**

The value of soil invertase activity (mg glucose/g soil per day) in the experiment with
the fungus *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw

Тип почвы по гранулометрическому составу	Содержание нефти, %	Биоремедианты			
		B1	B2	B5	B6
Суглинистая (C2)	5 (A1)	11,5 ± 1,4	–	18,2 ± 0,7	19,9 ± 0,7
	10 (A2)	13,5 ± 1,1	16,1 ± 0,5	21,1 ± 0,8	22,3 ± 0,9
Супесчаная (C1)	5 (A1)	21,0 ± 3,3	18,2 ± 10,1	21,0 ± 1,8	27,6 ± 2,4
	10 (A2)	37,1 ± 1,4	28,6 ± 13	26,7 ± 2,1	35,5 ± 1,7

Примечание. B1, B2, B5, B6 — см. табл. 3.

почвы оказалось достоверно более чем в 1,3 раза больше варианта A1B1C2. При 10%-м загрязнении нефтью суглинистой почвы в варианте Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + + гриб *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (A2B4C2) инвертазная активность оказалась более чем в 2 раза больше, чем в варианте A2B1C2. Таким образом, на суглинистой почве с 5%-м загрязнением нефтью использование полного состава биоремедиантов с грибом-эндофитом *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc оказало большее достоверное влияние и вызвало увеличение биологической активности почвы по сравнению с действием одного лишь биопрепарата. При 10%-м загрязнении применение каждой из предложенных совокупностей биоремедиантов оказалось более эффективным по сравнению с применением биопрепарата.

Получены значения инвертазной активности почв при использовании гриба-эндофита *C. magnusianum* (табл. 7).

Значение активности инвертазы в супесчаной почве при 5%-м загрязнении нефтью в варианте A1B6C1 оказалось достоверно почти в 1,3 раза больше, чем в варианте A1B1C1. Этот результат подтвердил, что при 5%-м загрязнении нефтью

супесчаной почвы применение биопрепарата «Микрозим Петро Трит» в совокупности с Фиторемедиантом мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) и грибами *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw оказывает большее влияние на повышение уровня активности инвертазы, чем внесение биопрепарата. При 10%-м загрязнении нефтью достоверных изменений по сравнению с вариантом A2B1C1 не обнаружено, кроме варианта Фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (A2B5C1), в котором значение активности инвертазы оказалось значительно ниже.

На суглинистой почве при 5%-м загрязнении нефтью значения активности инвертазы оказались значительно выше, чем в варианте A1B1C2. В вариантах Фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (A1B5C2) и Фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw + Биопрепарат «Микрозим Петро Трит» (A1B6C2) показатель инвертазы более чем в 1,5 и 1,7 раза соответственно превысил значения варианта A1B1C2. Таким образом, варианты A1B5C2 и A1B6C2 оказывают большее положительное влияние на формирование

микробиологического состава почвы, чем использование варианта А1В1С2, содержащего лишь биопрепарат «Микрозим Петро Трит» в качестве биоремедианта. Аналогичный результат продемонстрирован и на суглинистой почве с 10%-м загрязнением нефтью: в вариантах Фиторемедиант мятлик луговой (*Poa pratensis* L.) + гриб *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (А2В5С2) и А2В6С2 значение активности инвертазы оказалось соответственно более чем в 1,5 и 1,6 раза выше значений варианта А2В1С2.

Выводы

Проведенные исследования дают возможность определить перспективы использования консорциума, состоящего из микроскопических грибов, углеводородокисляющих микроорганизмов биопрепарата и высших растений для проведения эффективного биологического этапа восстановления нефтезагрязненных почв с точки зрения деструкции нефти и восстановления их биологической активности.

Выявленные видоспецифические стратегии адаптации микроскопических грибов позволяют использовать их в технологиях биоремедиации при разных условиях. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc целесообразно использовать при низких концентрациях нефти в субстрате и при необходимости быстрого восстановления почвы, *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw — при длительном нефтяном загрязнении и высоких концентрациях нефти.

По сравнению с использованием лишь одного биопрепарата «Микрозим Петро Трит» применение культур микроскопических грибов *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw в сочетании с биопрепаратом и фиторемедиантом мятликом луговым (*Poa pratensis* L.) демонстрирует большую эффективность для деструкции нефтяного загрязнения дерново-подзолистых суглинистых и супесчаных почв при относительно разном содержании нефти в почвах (от 5 до 10 %).

Использование грибов *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc и *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw в комплексе с фитомелиорантом и биопрепаратом способствует более эффективному восстановлению биологической (инвертазной) активности почвы по сравнению с использованием биопрепарата как при 5%-м, так и при 10%-м уровнях загрязнения нефтью.

Список литературы

- [1] Аржанников В.П., Громова О.В. Агротелиорация – эффективный метод восстановления биопотенциала нефтезагрязненных земель в условиях Севера // Освоение Севера и проблемы природовосстановления. Тезисы V междунар. конф., Сыктывкар, 05–08 июня 2001 г. Сыктывкар: ФИЦ Коми научный центр УрО РАН, 2001. С. 8–9.
- [2] Новоселова Е.И., Киреева Н.А., Гарипова М.И. Роль ферментативной активности почв в осуществлении ею трофической функции в условиях нефтяного загрязнения // Вестник Башкирского университета, 2014. Т. 19. № 2. С. 474–478.
- [3] Назарько М.Д., Щербаков В.Г., Александрова А.В. Перспективы использования микроорганизмов для биодegradации нефтяных загрязнений почв // Изв. вузов. Пищевая технология, 2004. № 4. С. 89–91.
- [4] Iskandar N.L., Zainudin N., Tan S.G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem // J. of Environmental Sciences, 2011, v. 23, pp. 824–830.
- [5] Mishra R., Sarma V. Mycoremediation of Heavy Metal and Hydrocarbon Pollutants by Endophytic Fungi // Mycoremediation and Environmental Sustainability. Fungal Biology, 2017, v. 1, pp. 133–151.
- [6] Марченко М.Ю., Шуктуева М.И. Биоремедиация нефтезагрязненных почв // Башкирский химический журнал, 2011. Т. 18. № 4. С. 191–195.
- [7] Леднев А.В. Изменение свойств дерново-подзолистых суглинистых почв Среднего Предуралья при создании мульчирующего слоя: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.03. М., 1998. 24 с.
- [8] Лямзин В.И., Бухарина И.Л., Здобяхина О.В., Исламова Н.А., Загребина В.С. Исследование эффективности совместного применения биопрепарата-нефтедеструктора и эндотрофных грибов на этапе биологического восстановления нефтезагрязненных земель // Астраханский вестник экологического образования, 2018. № 3 (45). С. 94–98.
- [9] Chaineau C.H., Morel J.L., Oudot J. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize // J. of Environ. Quality, 2000, v. 29, pp. 569–578.
- [10] Christofi N., Ivshina I.B., Kuykina M.S. Biological treatment of crude oil contaminated soil in Russia // Contaminated Land and Groundwater. Future Directions. London: Geological Society Engineering Geology Publications, 1998, v. 14, pp. 45–51.
- [11] Лямзин В.И., Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Здобяхина О.В. Роль микроскопических грибов в восстановлении нефтезагрязненных земель // Биологическая рекультивация нарушенных земель: Материалы X Всерос. науч. конф. с междунар. участием, Екатеринбург, 04–07 сентября 2017 г. Екатеринбург: Изд-во УГЛТУ, 2017. С. 179–185.
- [12] Киреева Н.А., Галимзянова Н.Ф., Мифтахова А.М. Микробиоты почв, загрязненных нефтью, и их фитотоксичность // Микология и фитопатология, 2000. № 1. С. 36–41.
- [13] Мифтахова А.М. Некоторые аспекты взаимоотношений высших растений и микроскопических грибов в почвах, загрязненных нефтью // Вестник Башкирского университета, 2005. № 3. С. 41–46.
- [14] Nwoko C.O. The Contributions of mycorrhizas in the mineralization of organic contaminants // Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants, 2017, pp. 101–116.
- [15] Siddiqui Z.A., Pichtel J. Mycorrhizae: an overview // Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry, 2008, pp. 1–35.
- [16] Vosatka M, Rydlova J., Sudova R., Vohnik M. Mycorrhizal fungi as helping agents in phytoremediation of degraded and contaminated soils // Phytoremediation Rhizoremediation, 2006, pp. 237–257.
- [17] Gao Y., Cheng Z., Ling W., Huang J. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots // Bioresour Technol, 2011, no. 101, pp. 6895–6901.

- [18] Prabhu A.A., Chityala S., Jayachandran D., Naik N., Dasu V.V. Rhizoremediation of Environmental Contaminants Using Microbial Communities // Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives, 2017, pp. 433–453. DOI: 10.1007/978-981-10-6593-4_17
- [19] Hoorman J. The role of soil fungus // Fact Sheet Agriculture and Natural Resources. Ohio: The Ohio State University Extensions, 2011, pp. 1–6.
- [20] Mathur N., Singh J., Bohra S. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Potential Tool for Phytoremediation // J. of Plant Sciences, 2007, v. 2, pp. 127–140.
- [21] Tarkka M.T., Frey-Klett P. Mycorrhiza Helper Bacteria // Mycorrhiza, 2008, pp. 113–132.
- [22] Garg N., Chandel S. Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. A review // Agronomy for sustainable, 2010, v. 30, pp. 581–599.
- [23] Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Лебедева М.А., Шашов Л.О. Влияние инокулята *Cylindrocarpon magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к стрессовым факторам // Аграрная Россия, 2019, № 12, С. 26–32.
- [24] Bukharina I.L., Islamova N.A., Lebedeva M.A. Species of fungi in the root system of woody plants in urban plantations // The Fourth International Scientific Conference Ecology and Geography of Plants and Plant Communities. KnE Life Sciences, 2018, pp. 49–55.
- [25] Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K., Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment // International J. of Advanced Biotechnology and Research, 2016, v. 7 (4), pp. 138–394.
- [26] Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Способ приготовления и внесения грибного биопрепарата для повышения устойчивости растений / Патент 2722206 Российская Федерация, МПК C12N15/11, заявитель и патентообладатель Удмурт. гос. ун-т. Бюл. № 16. 16 с.
- [27] ГОСТ Р 54039–2010. Экспресс-метод спектроскопии в ближней инфракрасной области для определения содержания нефтепродуктов. М.: Стандартинформ, 2019. 8 с.
- [28] Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 270 с.
- [29] Рябов В.Д. Химия нефти и газа. М.: ФОРУМ, 2009. 336 с.
- [30] Ковриго В.П., Кауричев И.С., Бурлакова Л.М. Почвоведение с основами геологии. М.: Колос, 2000. 416 с.

Сведения об авторах

Бухарина Ирина Леонидовна [✉] — д-р биол. наук, директор Института гражданской защиты, зав. кафедрой инженерной защиты окружающей среды, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», buharin@udmlink.ru

Исупова Анастасия Анатольевна — аспирант, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», isupova.anastasiya.96@mail.ru

Лямзин Владимир Иванович — ст. преподаватель кафедры инженерной защиты окружающей среды, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», v-lyamzin@mail.ru

Лебедева Мария Андреевна — ст. преподаватель кафедры инженерной защиты окружающей среды, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», mariya-lebedeva-7@bk.ru

Поступила в редакцию 10.06.2022.

Одобрено после рецензирования 20.09.2022.

Принята к публикации 07.10.2022.

USE PROSPECTS FOR MICROORGANISMS CONSORTIUMS AND HIGHER PLANTS IN OIL-CONTAMINATED LANDS RESTORATION

I.L. Bukharina , A.A. Isupova, V.I. Lyamzin, M.A. Lebedeva

Udmurt State University, 1, Universitetskaya st., 426034, Izhevsk, Russia

buharin@udmlink.ru

The article presents the research results on the use of microscopic endotrophic fungi cultures in oil-contaminated soils bioremediation. The resistance limits of microscopic fungi *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc and *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw isolates (cultures), isolated from urban soils with a high level of pollution, were studied to various oil concentrations. Wide limits of microscopic fungi tolerance to oil content were revealed. Also, the cleaning efficiency and restoring the biological activity of oil-contaminated soils was studied using a ameliorants consortium: the biological product «Mikrozim Petro Treat», containing a number of oil degrading bacteria, the plant ameliorant Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) and microscopic fungi. A laboratory experiment was carried out to simulate 5 and 10 % soil pollution (sandy loam and loamy soddy podzolic soils) with oil. The greatest efficiency was established when using the full ameliorants composition with microscopic fungi cultures *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw (the biological product + plant ameliorant + microscopic fungi): at the end of the experiment, in variants with 5 % oil content on both soil textures and 10 % oil pollution (loamy soil), the oil content was significantly lower than in the control (using only a biological product). On loamy soil at 5 and 10 % oil content, the invertase activity indicator of soils at the end of the experiment exceeded the control in the variant with the use of a combination of ameliorants plant ameliorant + fungi, and maximum — in the variant of the complete ameliorant consortium. These results were obtained using both cultures of microscopic fungi. On sandy loamy soils, a significant increase in the biological activity of soils compared to the control was established only at 5 % oil content and only in the variant using a complete consortium of ameliorants with the fungi *Cylindrocarpon magnusianum* Wollenw. The results obtained allow us to state the efficiency of the joint application of the biological product, higher plants and microscopic fungi in bioremediation of oil-contaminated soils.

Keywords: oil pollution, bioremediation, biological activity of soil, micromycetes, biological product

Suggested citation: Bukharina I.L., Isupova A.A., Lyamzin V.I., Lebedeva M.A. *Perspektivy ispol'zovaniya konsortiumov mikroorganizmov i vysshikh rasteniy v vosstanovlenii neftezagryaznennykh zemel'* [Use prospects for microorganisms consortiums and higher plants in oil-contaminated lands restoration]. *Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin*, 2022, vol. 26, no. 6, pp. 14–23. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-6-14-23

References

- [1] Arzhannikov V.P., Gromova O.V. *Agromelioratsiya — effektivnyy metod vosstanovleniya biopotsiala neftezagryaznennykh zemel' v usloviyakh Severa* [Agromelioration is an effective method for restoring the biopotential of oil-contaminated lands in the North]. *Osvoenie Severa i problemy prirodovosstanovleniya. Tezisy V mezhdunarodnoy konferentsii* [Development of the North and the problems of nature restoration: Tez. V Intern. Conf.], 2001, pp. 8–9.
- [2] Novoselova E.I., Kireeva N.A., Garipova M.I. *Rol' fermentativnoy aktivnosti pochv v osushchestvlenii eyu troficheskoy funktsii v usloviyakh neftyanogo zagryazneniya* [The role of enzymatic activity of soils in the exercise of its trophic function under conditions of oil contamination]. *Vestnik Bashkirskogo universiteta* [Bulletin of the Bashkir University], 2014, v. 19, no. 2, pp. 474–478.
- [3] Nazar'ko M.D., Shcherbakov V.G., Aleksandrova A.V. *Perspektivy ispol'zovaniya mikroorganizmov dlya biodegradatsii neftyanykh zagryazneniy pochv* [Prospects of using microorganisms for biodegradation of oil contamination of soils]. *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya* [News Universities. Food technology], 2004, no. 4, pp. 89–91.
- [4] Iskandar N.L., Zainudin N., Tan S.G. *Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem*. *J. of Environmental Sciences*, 2011, v. 23, pp. 824–830.
- [5] Mishra R., Sarma V. *Mycoremediation of Heavy Metal and Hydrocarbon Pollutants by Endophytic Fungi*. *Mycoremediation and Environmental Sustainability. Fungal Biology*, 2017, v. 1, pp. 133–151.
- [6] Marchenko M.Yu., Shukhtueva M.I. *Bioremediatsiya neftezagryaznennykh pochv* [Bioremediation of oil contaminated soils]. *Bashkirskiy khimicheskii zhurnal* [Bashkir chemical journal], 2011, v. 18, no. 4, pp. 191–195.
- [7] Lednev A.V. *Izmenenie svoystv dernovo-podzolistykh suglinistykh pochv Srednego Predural'ya pri sozdanii mul'chiruyushchego sloya* [Properties changes of soddy-podzolic loamy soils of the Middle Urals at creating a mulch layer]. *Dis. Cand. Sci (Agric.)* 06.01.03. Moscow, 1998, 24 p.
- [8] Lyamzin V.I., Bukharina I.L., Zdobyakhina O.V., Islamova N.A., Zagrebina V.S. *Issledovanie effektivnosti sovmestnogo primeneniya biopreparata-neftedestruktora i endotrofnyykh gribov na etape biologicheskogo vosstanovleniya neftezagryaznennykh zemel'* [Research of the effectiveness of the joint application of the biological product and endotrophic fungi at the stage of biological recovery of oil contaminated soils]. *Astrakhanskiy vestnik ekologicheskogo obrazovaniya* [Astrakhan bulletin of ecological education], 2018, no. 3 (45), pp. 94–98.
- [9] Chaineau C.H., Morel J.L., Oudot J. *Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize*. *J. of Environ. Quality*, 2000, v. 29, pp. 569–578.
- [10] Christofi N., Ivshina I.B., Kuykina M.S. *Biological treatment of crude oil contaminated soil in Russia*. *Contaminated Land and Groundwater. Future Directions*. London: Geological Society Engineering Geology Publications, 1998, v. 14, pp. 45–51.
- [11] Lyamzin V.I., Bukharina I.L., Islamova N.A., Zdobyakhina O.V. *Rol' mikroskopicheskikh gribov v vosstanovlenii neftezagryaznennykh zemel'* [The role of microscopic fungi in the bioremediation of oil contaminated soils]. *Biologicheskaya*

- rekul'tivatsiya narushennykh zemel': Materialy X Vserossiyskoy nauchnoy konferentsii s mezhdunar. uchastiem [Biological remediation of disturbed lands: Materials of the X All-Russian scientific conference with international participation]. Ekaterinburg, 04–07 sentyabrya 2017. Yekaterinburg, Ural Forest Engineering University, 2017, pp. 179–185.
- [12] Kireeva N.A., Galimzyanova N.F., Miftakhova A.M. *Mikromitsety pochv, zagryaznennykh nefi'yu, i ikh fitotoksichnost'* [Micromycetes of soils polluted with oil and their phytotoxicity]. Mikologiya i fitopatologiya [Mycology and phytopathology], 2000, no. 1, pp. 36–41.
- [13] Miftakhova A.M. *Nekotorye aspekty vzaimootnosheniy vysshikh rasteniy i mikroskopicheskikh gribov v pochvakh, zagryaznennykh nefi'yu* [Some aspects of the relationship between higher plants and microscopic fungi in soils polluted with oil]. Vestnik Bashkirskogo universiteta [Bulletin of the Bashkir University], 2005, no. 3, pp. 41–46.
- [14] Nwoko C.O. The Contributions of mycorrhizas in the mineralization of organic contaminants. *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants*, 2017, pp. 101–116.
- [15] Siddiqui Z.A., Pichtel J. Mycorrhizae: an overview. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 2008, pp. 1–35.
- [16] Vosatka M., Rydlova J., Sudova R., Vohnik M. Mycorrhizal fungi as helping agents in phytoremediation of degraded and contaminated soils. *Phytoremediation Rhizoremediation*, 2006, pp. 237–257.
- [17] Gao Y., Cheng Z., Ling W., Huang J. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. *Bioresour Technol*, 2011, no. 101, pp. 6895–6901.
- [18] Prabhu A.A., Chityala S., Jayachandran D., Naik N., Dasu V.V. Rhizoremediation of Environmental Contaminants Using Microbial Communities. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*, 2017, pp. 433–453. DOI: 10.1007/978-981-10-6593-4_17
- [19] Hoorman J. The role of soil fungus. *Fact Sheet Agriculture and Natural Resources*. Ohio: The Ohio State University Extensions, 2011, pp. 1–6.
- [20] Mathur N., Singh J., Bohra S. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: A Potential Tool for Phytoremediation. *J. of Plant Sciences*, 2007, v. 2, pp. 127–140.
- [21] Tarkka M.T., Frey-Klett P. Mycorrhiza Helper Bacteria. *Mycorrhiza*, 2008, pp. 113–132.
- [22] Garg N., Chandel S. Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. *A review. Agronomy for sustainable*, 2010, v. 30, pp. 581–599.
- [23] Bukharina I.L., Islamova N.A., Zhavad A.F., Lebedeva M.A., Shashov L.O. *Vliyaniye inokulyata *Cylindrocarpon magnusianum* na formirovaniye adaptivnykh reaksiiy rasteniy k stressovym faktoram* [Influence of *Cylindrocarpon magnusianum* inoculate on the formation of adaptive reactions of plants to stress factors]. *Agrarnaya Rossiya* [Agrarian Russia], 2019, no. 12, pp. 26–32.
- [24] Bukharina I.L., Islamova N.A., Lebedeva M.A. Species of fungi in the root system of woody plants in urban plantations. *The Fourth International Scientific Conference Ecology and Geography of Plants and Plant Communities*. KnE Life Sciences, 2018, pp. 49–55.
- [25] Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K., Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant roots in urban environment. *International J. of Advanced Biotechnology and Research*, 2016, v. 7 (4), pp. 138–394.
- [26] Bukharina I.L., Islamova N.A. *Sposob prigotovleniya i vneseniya gribnogo biopreparata dlya povysheniya ustoychivosti rasteniy* [Method of preparation and application of a fungi biological product to increase plant resistance]. Patent RF, no 2722206, 2020.
- [27] GOST R 54039–2010. *Ekspress-metod spektroskopii v blizhney infrakrasnoy oblasti dlya opredeleniya sodержaniya nefteproduktov* [State Standard 54039–2010. Soil quality. Rapid near-infrared spectroscopic method for the determination of oil products]. Moscow: Standartinform, 2019, 8 p.
- [28] Drugov Yu.S., Rodin A.A. *Ekologicheskie analizy pri razlivakh nefi i nefteproduktov prakticheskoe rukovodstvo* [Environmental analyses in oil and petroleum product spills: a practical guide]. Moscow: Binom, 2007, 270 p.
- [29] Ryabov V.D. *Khimiya nefi i gaza* [Chemistry of oil and gas: a textbook]. Moscow: Forum, 2009, 336 p.
- [30] Kovrigo V.P., Kaurichev I.S., Burlakova L.M. *Pochvovedeniye s osnovami geologii* [Soil science with the geology basics]. Moscow: Kolos, 2000, 416 p.

Authors' information

Bukharina Irina Leonidovna — Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of Institute of Civil Defense and Department of Environmental Engineering of Udmurt State University, buharin@udmlink.ru

Isupova Anastasiya Anatol'evna — pg. of Udmurt State University, isupova.anastasiya.96@mail.ru

Lyamzin Vladimir Ivanovich — Senior Lecturer of the Department of Environmental Engineering of Udmurt State University, v-lyamzin@mail.ru

Lebedeva Mariya Andreevna — Senior Lecturer of the Department of Environmental Engineering of Udmurt State University, mariya-lebedeva-7@bk.ru

Received 10.06.2022.

Approved after review 20.09.2022.

Accepted for publication 07.10.2022.

Вклад авторов: все авторы в равной доле участвовали в написании статьи
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Authors' Contribution: All authors contributed equally to the writing of the article
The authors declare that there is no conflict of interest