

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
(НИЦЭБ РАН)**

На правах рукописи

Орлова Ольга Геннадьевна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С
ПРОДУКТАМИ ГИДРОЛИЗА ИПРИТА**

Специальность 03.00.07 - микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
д.т.н. Медведева Н.Г.**

**Научный консультант:
к.б.н. Зайцева Т.Б.**

**Санкт-Петербург
2007**

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Физико-химические и биологические свойства иприта и продуктов его гидролиза.....	9
1.2. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на живые организмы.....	15
1.2.1. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на макроорганизмы....	15
1.2.2. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на микроорганизмы....	20
1.3. Способы уничтожения иприта и продуктов его гидролиза.....	21
1.3.1. Физико-химические способы уничтожения иприта и продуктов его гидролиза.....	21
1.3.2. Биологическая деструкция иприта и продуктов его гидролиза.....	24
1.4. Влияние продуктов гидролиза иприта на биологическую активность почв	31
Глава 2. Объекты и методы исследования.....	36
2.1. Объекты исследования.....	36
2.2. Методы исследования морфологических и физиолого- биохимических признаков микроорганизмов.....	38
2.2.1. Определение морфологических признаков.....	38
2.2.2. Определение физиолого-биохимических признаков.....	38
2.3. Выделение микроорганизмов-деструкторов продуктов гидролиза иприта из почвенных образцов.....	41
2.4. Изучение морфолого-культуральных и физиолого- биохимических признаков выделенной культуры-деструктора.....	43

2.5. Токсикологическая оценка выделенной культуры-деструктора	44
2.6. Хранение и культивирование бактерий, методы контроля за процессом культивирования.....	45
2.7. Определение тиодигликоля, хлорорганических соединений, продуктов трансформации продуктов гидролиза иприта бактериями.....	46
2.8. Исследование почвенных образцов.....	48
2.9. Математическая обработка результатов.....	49
Глава 3. Влияние продуктов гидролиза иприта на рост и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов.....	51
3.1. Рост актиномицетов, бактерий, микромицетов и дрожжей на средах, содержащих продукты гидролиза иприта.....	52
3.2. Действие продуктов гидролиза иприта на некоторые морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов.....	59
3.2.1. Влияние продуктов гидролиза иприта на морфологические признаки микромицетов.....	59
3.2.2. Изменение клеточной проницаемости и жирнокислотного состава липидов микромицетов под действием продуктов гидролиза иприта.....	64
3.2.3. Влияние продуктов гидролиза иприта на физиолого-биохимические признаки микромицетов.....	68
3.2.3.1. Влияние продуктов гидролиза иприта на активность ферментов	68
3.2.3.2. Влияние продуктов гидролиза иприта на образование пигментов и полисахаридов	75

Глава 4. Выделение и отбор бактериальных культур-деструкторов продуктов гидролиза иприта.....	78
4.1. Выделение и отбор высокоактивных деструкторов продуктов гидролиза иприта.....	78
4.2. Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки выделенной культуры	81
4.3. Определение патогенности культуры <i>Pseudomonas</i> sp. Y-13.....	82
Глава 5. Изучение процесса деструкции и потребления продуктов гидролиза иприта культурой <i>Pseudomonas</i> sp. Y-13.....	84
5.1. Влияние условий культивирования на деструкцию и потребление продуктов гидролиза иприта культурой <i>Pseudomonas</i> sp. Y-13.....	84
5.2. Образование и потребление промежуточных продуктов деструкции тиодигликоля культурой <i>Pseudomonas</i> sp. Y-13.....	92
Глава 6. Деструкция смеси продуктов гидролиза иприта культурой <i>Pseudomonas</i> sp. Y-13 в почвенных образцах.....	98
ВЫВОДЫ.....	103
Список литературы.....	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

К числу хлорорганических соединений, представляющих собой устойчивые поллютанты, относится иприт и продукты его гидролиза.

В силу повышенной токсичности иприта и продуктов его гидролиза они длительное время сохраняются в экосистемах без снижения ингибиторного действия на живые организмы. В природную среду они попадают в результате несовершенных способов хранения, при транспортировке, авариях и других ситуациях. И если проблема уничтожения запасов иприта в значительной степени решена, способы очистки природных экосистем – почв и водоемов от иприта и продуктов его гидролиза находятся только на стадии разработки.

Одним из современных методов, используемых при разработке экологически чистых технологий защиты природной среды, является биоремедиация, как наиболее щадящий метод сохранения биоразнообразия и обеспечения устойчивости очищенных биоценозов.

По мнению большинства исследователей этой проблемы, использование для этой цели активных штаммов микроорганизмов-деструкторов, устойчивых к загрязнителям, является наиболее перспективным способом биоремедиации почв и водоемов.

Сообщения в доступной литературе о характере действия иприта и продуктов его гидролиза на морфологические и физиологические свойства различных микроорганизмов, равно как о механизмах деструкции этих загрязнителей весьма ограничены и представляют собой единичные и разрозненные сообщения.

Цель исследований – провести сравнительное изучение чувствительности микроорганизмов различных таксономических групп к продуктам гидролиза иприта; из числа наиболее устойчивых выделить культуру высокоактивного

деструктора этих продуктов; определить возможный механизм их биодеструкции.

В соответствии с целью исследования в работе были поставлены следующие задачи:

- Определить уровень биоцидного действия смеси продуктов гидролиза иприта (ПГИ) и основного из них – тиодигликоля (ТДГ) на микроорганизмы различных таксономических групп.
- Изучить характер действия ПГИ на морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов, наиболее чувствительных к этим продуктам.
- Выделить культуры-деструкторы ПГИ, определить наиболее активную культуру по способности потреблять ТДГ из смеси ПГИ и изучить ее основные морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства.
- Идентифицировать промежуточные и конечные продукты деструкции ПГИ выделенной культурой и определить возможный механизм деструкции.
- Провести модельные испытания выделенной культуры как деструктора ПГИ в условиях почвы.

Научная новизна полученных результатов

Впервые изучен характер и степень воздействия смеси продуктов гидролиза иприта на рост микроорганизмов различных таксономических групп. Показано, что повышенная чувствительность к этому загрязнителю характерна для микромицетов и актиномицетов и в меньшей степени для дрожжей. Наиболее устойчивыми являются бактерии.

С использованием микромицетов показано, что действие на них смеси ПГИ весьма многообразно и касается как морфолого-культуральных, так и многих физиолого-биохимических свойств, что в конечном итоге может являться причиной фунгицидного эффекта.

В результате скрининга толерантных к смеси ПГИ бактерий выделена культура, отличающаяся способностью к полному их потреблению при достаточно высоких концентрациях в среде 2,3 г/л ХОС и 20 г/л ТДГ и идентифицирована как *Pseudomonas* sp. Y-13. Установлено, что выделенная культура отличается отсутствием патогенных свойств по отношению к теплокровным животным.

Показано, что основным путем деструкции ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13 является окисление его первичных спиртовых групп с образованием тиодигликолевой кислоты (ТДГК) и тиогликолевой кислоты (ТГК), последующая трансформация которых сопровождается образованием ацетата. В продуктах трансформации ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13 впервые обнаружен β -меркаптоэтанол, который в дальнейшем также трансформируется в ТГК. Все образующиеся продукты деструкции используются выделенной культурой в качестве единственных источников углерода.

Практическая значимость полученных результатов

Показано, что поиск и выделение деструкторов ПГИ целесообразно проводить среди бактерий, отличающихся от микроорганизмов других таксономических групп повышенной толерантностью к этим продуктам и способностью использовать их в качестве источника углерода.

На модельных испытаниях показано, что внесение в почву, загрязненную смесью ПГИ, клеток культуры *Pseudomonas* sp. Y-13 в значительной степени ускоряет очистку почв и способствует снижению их фитотоксичности.

Такие критерии оценки выделенной культуры как деструктивная активность, толерантность к такому типу загрязнителей, как продукты гидролиза иприта, безопасность для теплокровных животных и растений свидетельствуют о целесообразности использования *Pseudomonas* sp. Y-13 для разработки биопрепаратов с целью детоксикации ПГИ в природных экосистемах – почвах и водоемах.

Апробация работы

Результаты работы доложены: на 13-м международном симпозиуме по биоповреждениям и биодegradации (Испания, Мадрид, 4-9 сентября 2005г.); на международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды» (Саратов, 14-16 сентября 2005г.); на международной конференции ConSoil 2005 (Франция, Бордо, 3-7 октября 2005г.); на 10-м международном симпозиуме «Генетика промышленных микроорганизмов» (Прага, 24-28 июня 2006г.); на VIII международной конференции «Защита и восстановление окружающей среды» (Греция, 3-7 июля 2006г.); обсуждены на заседании лаборатории микологии и микробиологии НИЦЭБ РАН.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 2 статьи и 5 тезисов.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и списка литературы.

Работа изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, 21 рисунок, из них 8 фотографий. Библиография включает 172 источника.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ # 2488 «Разработка технологии микробиологической биоремедиации почв, загрязненных отравляющим веществом ипритом».

Список принятых сокращений: ХОС – хлорорганические соединения; ПГИ – продукты гидролиза иприта; ТДГ – тиодигликоль; ТДГК – тиодигликолевая кислота; ТГК – тиогликолевая кислота; а.с.б. – абсолютно сухая биомасса; а.с.п. – абсолютно сухая почва.

Глава 1.

Обзор литературы

1.1. Физико-химические и биологические свойства иприта и продуктов его гидролиза

Значительную опасность для всех живых организмов представляют целенаправленно синтезируемые вещества с повышенной токсичностью. К их числу относится иприт (2,2-дихлордиэтилсульфид, HD) - отравляющее вещество кожно-нарывного действия.

До недавнего времени во многих странах, в том числе и в России, имелись значительные запасы иприта [Александров и др., 1989; Умяров и др., 1993]. Способы хранения иприта не столь совершенны, чтобы обеспечить полную защиту окружающей среды от различного рода утечек. Загрязнение почв и водоемов ипритом могло происходить в процессе его хранения, при транспортировке, при аварийных ситуациях и др.

Попадая в окружающую среду, иприт в силу своей токсичности и устойчивости длительное время сохраняется в ней и оказывает губительное действие на все живое. Проблема обеззараживания, очистки почв и водоемов, загрязненных ипритом и продуктами его гидролиза, еще не решена из-за отсутствия для этого эффективных и безопасных способов. Разработка таких способов объективно представляет собой очень сложную задачу, и для ее решения потребуются усилия специалистов во многих областях науки.

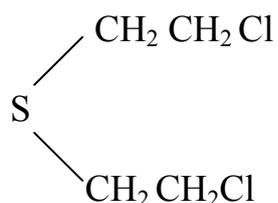
Учитывая повышенную устойчивость иприта в природных условиях можно предположить, что эта проблема еще долго будет оставаться актуальной.

Иприт – отравляющее вещество повышенной токсичности и неспецифическим действием, может быть представлен в виде двух основных форм: технического иприта (H) и химически чистого иприта (HD).

Технический иприт – маслянистая темно-коричневая жидкость, с запахом чеснока или горчицы. Минимальное количество вещества, при котором ощутим запах - 0,001-0,002 мг/л [Франке, 1973]. Основным компонентом И (80% от общего количества веществ) составляет 2,2–дихлордиэтилбисульфид. Остальные 20% содержат 1,4-дитиол, бис-(2-хлорпропил)дисульфид, бис-(2-хлорэтил)трисульфид, 1,2–бис–(2хлорэтилтио)этан, дихлорэтан, сера, хлористый водород [Франке, 1973; Трофимов и др., 1994].

Химически чистый, или перегнанный, иприт (HD, 2,2' - дихлордиэтилсульфид) – представляет собой прозрачную маслянистую жидкость, запахом практически не обладает. Температура кипения +217°C, температура замерзания +14°C, удельный вес – 1,3.

Структурная формула иприта [Франке, 1973]:



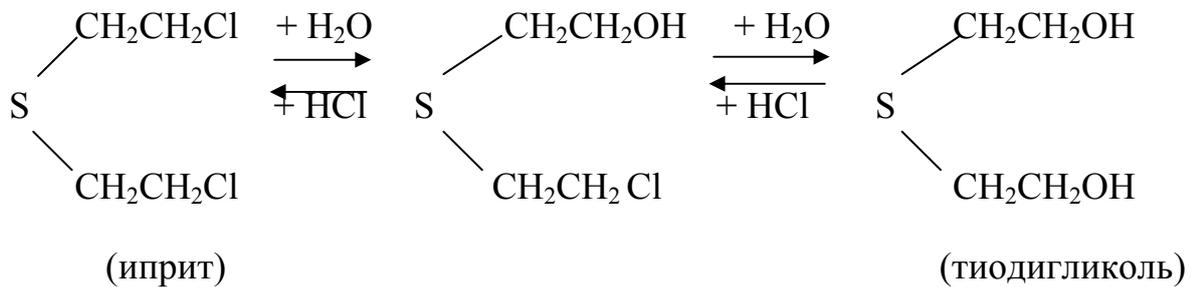
HD обладает рядом свойств способствующих его повышенной опасности для всего живого. Так, при распространении паров иприта (в 5,4 раз тяжелее воздуха), они концентрируются, в основном, по низинам, достигая максимальной концентрации до 0,6 мг/л при 20°C. При попадании иприта в воду наблюдается сходная картина, HD оседает на дно водоема (из-за низкой растворимости - 0,8 г/л при 20°C) и обволакивает любые, в том числе вертикальные, поверхности (из-за повышенной вязкости, превышающей вязкость воды) [National Toxicology Program, 2002]. Наряду с этим, HD хорошо растворим в органических растворителях, растительных или животных жирах, маслах.

Вследствие своей высокой диффузионной способности иприт быстро проникает через ткани, кожу, картон, бумагу и тонкую резину. Он быстро впитывается в пористые неоднородные материалы, такие как кирпич, бетон,

необработанная древесина. По материалам с однородной поверхностью (стекло, кафель, масляные покрытия) он растекается [Франке, 1973].

По отношению к металлам при обычной температуре иприт инертен, он почти не действует на свинец, латунь, цинк, сталь, алюминий; при повышении температуры сталь разрушается. Загрязненный иприт вызывает коррозию стали.

Гидролиз. В водной среде происходит растворение иприта. Реакция протекает очень медленно, в связи с чем, рассматривается как лимитирующая стадия в дальнейшем процессе химического преобразования иприта. Растворившаяся часть HD подвергается реакции гидролиза (в присутствии избытка соляной кислоты реакция обратима) [Yang et. al., 1988; Yang et. al., 1992]:



Конечным и основным продуктом гидролиза иприта в воде является менее токсичное вещество - тиодигликоль. С увеличением температуры скорость гидролиза растворенного в воде HD возрастает: при 0,6°C половина ОВ разлагается за 3 часа, при 20°C за 9 минут, а при 37°C – за 3 мин. Полный гидролиз HD в кипящей воде происходит за 20-30 мин. Кроме того, на скорость химического гидролиза значительно влияет pH среды (pH_{optim} 6,5) [Савин и др., 1995].

В среде, содержащей галогены, гидролиз HD идет с образованием продуктов, не только препятствующих дальнейшему растворению иприта, но и вступающих во взаимодействие с ипритом и между собой, образуя ряд

токсичных сульфониевых соединений, превышающих в несколько раз по токсичности сам иприт [Александров, Емельянов, 1990].

Более того, при отсутствии в воде акцепторов хлористого водорода может наступить равновесие, способствующее длительному сохранению иприта в воде в значительных концентрациях [De Ley, Kersters, 1964].

Подробное изучение путей гидролиза ИД подтвердило, что механизм гидролиза напрямую зависит от условий реакции [Yang et. al., 1988]. При невысоких концентрациях (не более 0,001M), в условиях предварительного растворения субстрата в органическом растворителе реализуется схема гидролиза представленная на рисунке 1.

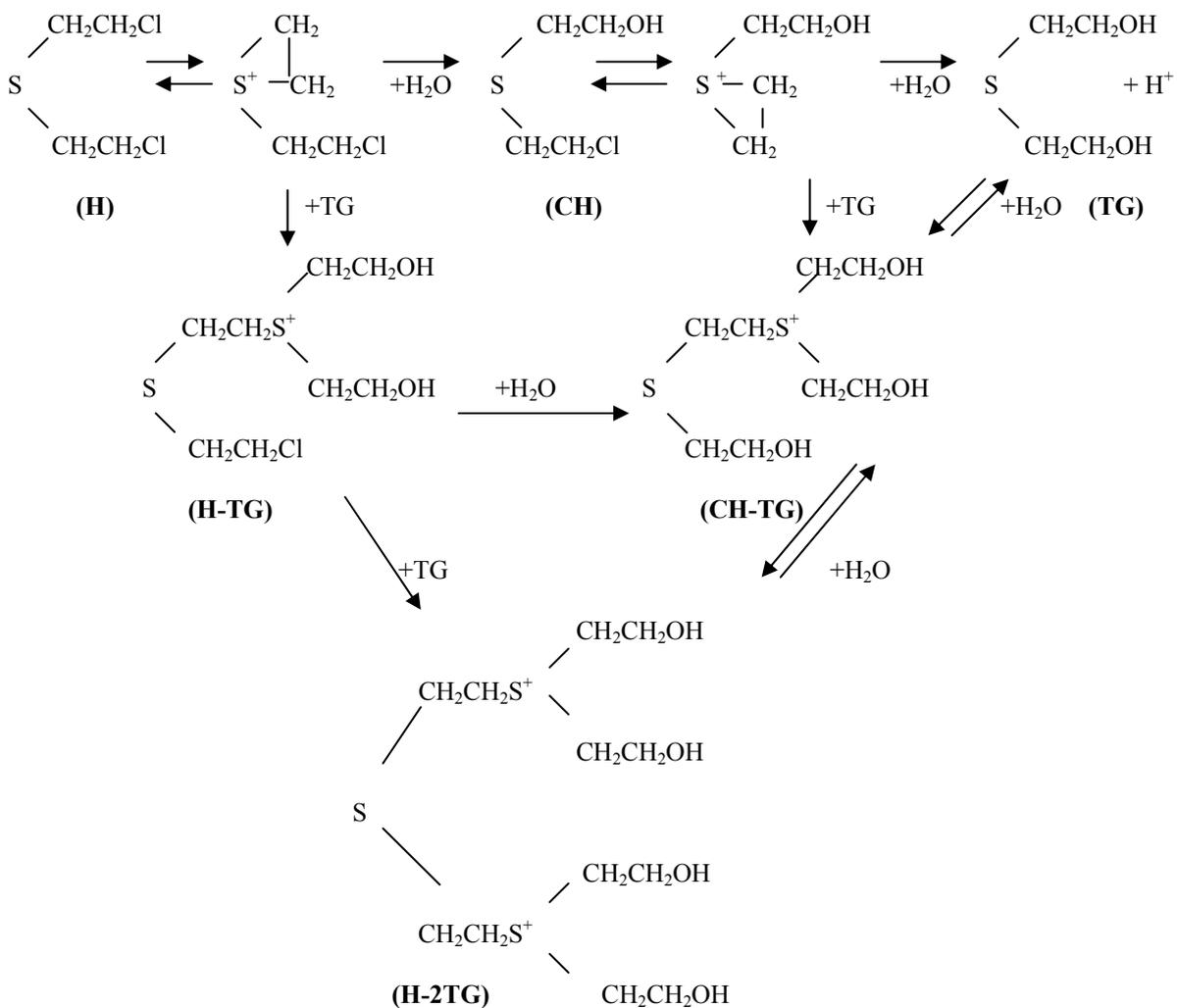
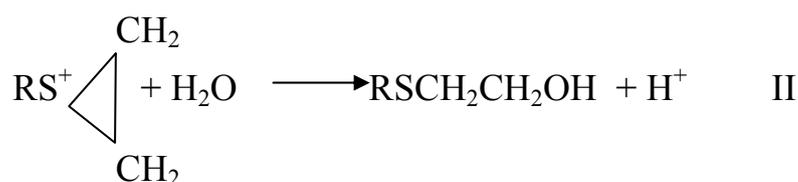
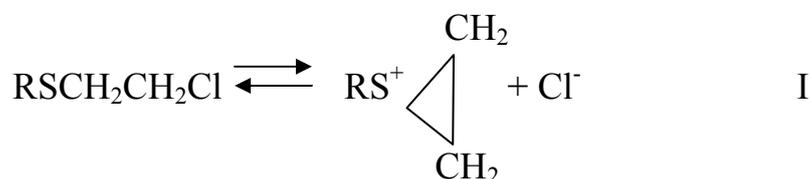


Рис.1. Схема гидролиза иприта.

При высоких концентрациях субстрата возможно образование димерных сульфониевых соединений, вследствие чего процесс приобретает более сложный характер.

Промежуточное соединение реакции гидролиза - хлористый сульфоний – относительно стабильное соединение. В процессе его распада происходит образование циклического сульфониевого катиона, который затем может вступить в реакцию с водой (с образованием гидроксиэтил сульфида), или вернуться в исходное состояние в результате обратной реакции [Yang et. al., 1988].

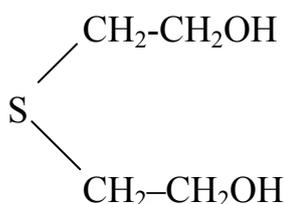


Обратимая реакция образования исходного вещества является возможным объяснением рецидивов токсичности иприта, как в организме человека, так и в окружающей среде. В присутствии сильного нуклеофила, каким является тиосульфат, может происходить эффективное связывание неустойчивого иона этилсульфония – промежуточного соединения, образующегося на начальном этапе гидролиза. Все димерные сульфониевые соединения элиминируются из раствора в присутствии аниона тиосульфата. Скорость реакции при концентрации субстрата 0,1 – 0,2 М соответствует скорости реакции, происходящей по механизму, наблюдаемому при концентрациях субстрата ниже 0,001 М. (рис.1).

Описанная выше схема гидролиза иприта реализуется при любой локализации токсиканта (вода, почва, организм человека и животных), в тех

или иных вариантах. Основным продуктом гидролиза иприта является тиодигликоль, а остальные производные образуются в значительно меньших количествах.

Как указано выше, основным продуктом гидролиза иприта в воде является тиодигликоль [ТДГ] – 2,2'-тиодиэтанол:



Тиодигликоль – бесцветная жидкость с температурой кипения 130-168°C, теплотой плавления 16°C, плотностью – $d_4^{20} = 1,1817$. Хорошо растворим в воде, этаноле, хлороформе, плохо растворим в бензоле, эфире [Химический энциклопедический словарь, 1983]. В сравнении с ипритом ТДГ мало токсичен, однако он тоже входит в список ОВ, которые, согласно Международной Конвенции по уничтожению химического оружия, должны быть уничтожены наряду с самими отравляющими веществами.

В силу этого, вопрос о детоксикации и деструкции ТДГ тесно связан с проблемой уничтожения запасов иприта, очистки почв и водоемов, загрязненных этим экосупертоксиантом.

Загрязнение среды ТДГ происходит также в результате широкого использования его в промышленности, главным образом, в химической (изготовление типографских красителей), текстильной и др. [Garcia-Ruiz et. al., 2002].

1.2. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на живые организмы

1.2.1. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на макроорганизмы

Иприт, как отравляющее вещество кожно-нарывного действия, обладает многосторонним поражающим действием на все живые организмы, и, прежде всего, на макроорганизмы [Александров и др., 1989].

Так, поражение глаз наступает при концентрации иприта 0,001 мг/л и экспозиции 30 мин., результатом которого могут быть хронические заболевания той или иной степени тяжести или потеря зрения [Javadi et. al., 2005].

Под действием паров иприта наблюдаются значительные патологические изменения в легких и дыхательных путях, которые также могут привести к летальному исходу [Александров и др., 1989; McClintock et. al., 2005]. Смертельная концентрация при действии через органы дыхания в течение 1,5 ч - около 0,015 мг/л [Dacre, Goldman, 1996].

Особенно тяжело протекает отравление ипритом при попадании его в желудочно-кишечный тракт [Франке, 1973; Dacre, Goldman, 1996; Vijayaraghavan et. al., 2005].

В капельно-жидком и парообразном состоянии HD поражает кожу уже в концентрации 0,1 мг/см², смертельная доза составляет 70 мг/кг [Wormser et. al., 2005]. В результате своей высокой проникающей способности, иприт может быть обнаружен в крови уже через 15-20 минут, в зависимости от дозы заражения.

Таким образом, при любом местном поражении иприт вызывает общее отравление организма, вследствие высокой растворимости HD в липидах и его высокой проникающей способности [Debouzy et. al., 2002].

Действие иприта на клеточном уровне также многообразно и выражается в повреждении или остановке различного рода процессов, происходящих в клетке, что приводит к сильным изменениям в метаболизме и чаще всего - к гибели клетки [Mahmoudi et. al., 2005].

Цитоплазматическая мембрана клетки, являясь барьером между цитоплазмой и внешней средой, первая вступает во взаимодействие с ипритом. Как известно, основой мембраны является двойной слой, образованный фосфолипидами, кроме того, в мембране широко представлены белки. Фосфолипиды, в качестве основных структурных компонентов, определяют строение и проницаемость клеточных мембран, а также активность ряда локализованных в мембранах ферментов. Именно, фосфолипиды являются основной мишенью действия для молекул иприта [Debouzy et. al., 2002]. В ответ на действие токсиканта изменяется состав фосфолипидов мембраны. Так, количество арахидоновой кислоты (важнейшего из метаболитов линолевой кислоты), под действием иприта (0.3 мМоль/л) резко уменьшается (на 60-80%) [Ray et. al., 1995].

Кроме того, в составе фосфолипидов наблюдается увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот [DeLong, Yayanos, 1985; Rock, Cronan, 1985], повышается текучесть мембран [Debouzy et. al., 2002]. Это обуславливает нарушение конформации их липопротеидных комплексов и связанное с этим снижение активности белков и ферментных систем [Богач и др., 1981].

Кроме того, изменяется ряд физико-химических параметров мембраны клеток макроорганизмов - нарушается ее текучесть и проницаемость [Naghii, 2002]. Подобные нарушения связаны с изменениями, происходящими в результате присоединения молекул иприта к цепочкам метиленовых групп, которые входят в состав фосфолипидов [Debouzy et. al., 2002].

Изменение текучести мембран связано еще и с активацией процесса перекисного окисления мембранных липидов [Naghii, 2002]. Пусковым механизмом процесса окисления является атака ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембран свободными гидроксильными радикалами, причиной появления которых также является иприт.

Сходное действие иприт оказывает и на мембраны внутриклеточных органелл. Так, обнаружено, что HD вызывает нарушение целостности и дисфункцию ядерной мембраны, нарушает мембранный потенциал митохондрий [Han Suhua et. al., 2004]. Под действием иприта происходит резкий выброс ионов $[Ca^{2+}]$ (до 30%) из специфических ион-связывающих центров, расположенных в составе эндоплазматического ретикулума и митохондрий, что приводит к их разбуханию и нарушению нормального функционирования [Ray et. al., 1995]. Авторы объясняют это нарушением работы Ca^{2+} -АТФ-аз, которые регулируют выброс $[Ca^{2+}]$, и являются очень чувствительными к поражению свободными радикалами.

Состояние мембран имеет решающее значение в жизнеспособности клетки, так как оказывает влияние на активность связанных с ней ферментов.

Стимулирующее действие иприт оказывает на активность протеолитических ферментов [Cowan et. al., 1991; Cowan et. al., 1992; Sklyar et. al., 1999]. Обнаружено, что в присутствии иприта происходит увеличение протеазной активности в клетках периферических лимфоцитов человека [Cowan et. al., 1992]. Для нейтрализации негативного действия токсиканта авторы предлагают снизить протеазную активность в клетках с помощью специфических ингибиторов протеазной активности [Cowan et. al., 1991]. Увеличение защитных свойств клеток обнаружено, также, при действии ингибиторов протеазной активности на пораженные ипритом эпидермальные кератиноциты [Chakrabarti et. al., 1998].

Иприт оказывает ингибирующее действие на н-нитрофенилфосфатазу [Brimfield, 1995], серин/треонин фосфатазу и гексокиназу [Brimfield, 1995;

Brimfield et. al., 1998], что приводит к нарушению углеводного и биоэнергетического процессов. Так, гексокиназу (фермент, переносящий остаток фосфорной кислоты с АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата) иприт алкилирует по атому азота. В итоге фермент утрачивает каталитическую активность, нарушаются процессы переноса и потребления энергии.

В дозах меньших, чем сублетальная иприт вызывает активацию ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза) [Korff et. al., 1994; Husain et. al., 1996; Elsayed Nabil, Stanley, 2004], что свидетельствует о том, что клетка переживает окислительный стресс [Han Suhua et. al., 2004]. Кроме того, иприт вызывает увеличение уровня активных форм кислорода, в частности, свободных гидроксильных радикалов. Избыток, которых приводит, в частности, к активации процесса перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав мембранных фосфолипидов [Debouzy et. al., 2002].

Многочисленные исследования, направленные на изучение защитных свойств различных антиоксидантов в борьбе с токсическим действием иприта на макроорганизмы, показывают хорошие результаты в опытах как *in vitro*, так и *in vivo* [Husain et. al., 1996; Lachance et. al., 1999; Kumar et. al., 2001]. Так инсталляция липосом, содержащих ферменты супероксиддисмутазу, каталазу в легкие крыс, зараженных азотистым аналогом иприта – 2-хлорэтил сульфидом, уменьшает наносимый им вред на 80% [McClintock et. al., 2005]. В тех же экспериментах обнаружено, что роль защиты от неблагоприятного действия токсиканта выполняют так же N-ацетилцистеин и глутатион (субстрат, используемый пероксидазой для окисления его перекисью водорода), истощение запасов последнего характерный признак клеток, подвергшихся действию иприта [Amir et. al., 1998; McClintock et. al., 2005].

Кроме иприта, негативное действие на живые организмы оказывают и продукты его гидролиза, основным из которых является - тиодигликоль. ТДГ

также обладает токсическим действием [Sklyar et. al., 1999]. Однако, в отличие от иприта, тиодигликоль является веществом менее токсичным и более персистентным [Munro et. al., 1999].

При поражении тиодигликолем молекулы токсиканта обнаруживают во всех органах и тканях пораженного животного (наибольшая концентрация отмечается в составе крови и моче) [Black, Read, 1988; Black et. al., 1993; Graham et. al., 2000; Carascio et. al., 2004]. По данным одних авторов, около 90% введенного в организм тиодигликоля выводится с мочой в первые 24ч после заражения [Roberts, Warwick, 1963; Black et. al., 1993], по данным других авторов высокий уровень ТДГ поддерживается в моче в течение 24-96 часов с момента заражения [Graham et. al., 2000], а следовые количества токсиканта обнаруживают и через 45 суток после первичного поражения [Carascio et. al., 2004].

Очищение организма от ТДГ происходит не только благодаря работе выделительной системы. Ряд авторов сообщают о наличии естественного защитного механизма от токсического действия иприта – деградации с помощью алкогольдегидрогеназ [Brimfield et. al., 1998; Dudley et. al., 2000; D'Agostino et. al., 2004]. А участие NAD^+ зависимых алкогольдегидрогеназ в процессе окисления ТДГ у макроорганизмов подтверждено экспериментально [Brimfield et. al., 1998; Dudley et. al., 2000; Lee et. al., 2000]. Тиодигликоль, как и многие другие продукты гидролиза иприта, окисляется алкогольдегидрогеназами, содержащимися во многих тканях и органах животных (глаза, ротовая полость, легкие, кожа и т.д.). Установлено, что деградация ТДГ происходит во всех перечисленных выше локализациях с помощью присутствующих там алкогольдегидрогеназ, но с разной скоростью. Скорость разрушения токсиканта напрямую зависит от активности фермента [Dudley et. al., 2000; D'Agostino et. al., 2004].

Действие, которое оказывает ТДГ на живую клетку на биохимическом уровне, сходно с действием самого HD. Так, мишенью действия тиодигликоля

также оказывается ферментная система (ингибирующее действие на серинтреонин фосфотазу). Присутствие ТДГ влияет на уровень НАД, его количество уменьшается. В конечном итоге это приводит к ингибированию фосфотазной активности в клетке [Brimfield et. al., 1998; D'Agostino et. al., 2004]. Кроме того, ТДГ оказывает негативное влияние на процессы энергетического метаболизма, нарушает нормальный режим трансляции и транскрипции [Kan et. al., 2003].

1.2.2. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на микроорганизмы

Жизнедеятельность микроорганизмов тесно связана с условиями их обитания. При изменении этих условий, в том числе и под воздействием веществ, обладающих токсическими свойствами, в клетке возможны нарушения, ведущие к изменению ее структуры и/или функций [Авцин, Шахламов, 1979]. Иприт и продукты его гидролиза могут оказывать на микробную клетку преимущественно неспецифическое действие и влияют на многие стороны метаболизма.

К сожалению, в доступной литературе сведения о влиянии иприта или продуктов его гидролиза на микроорганизмы носят эпизодический характер, что не позволяет оценить характер этого действия. Остается предполагать, что действие иприта и продуктов его гидролиза, как токсикантов неспецифического действия, на микробную клетку, сходно с действием на клетки макроорганизмов и приводит к расстройству механизмов регуляции функций микробной клетки.

Изучено негативное воздействие со стороны HD на генетический аппарат микроорганизмов. Так алкилирование ипритом пуриновых оснований является причиной изменения наследственных признаков [Kircher et. al., 1979; Lodhi et. al., 2001]. В экспериментах, проведенных с гаплоидными дрожжами рода *Saccharomyces* было показано, что иприт оказывает на них летальное или

мутагенное действие: в его присутствии, количество межнитевых поперечных сшивок в ДНК возрастает пропорционально количеству иприта [Kircher et. al., 1979; Kircher, Brendel, 1983]. При изучении действия аналога иприта 2-хлорэтилэтил сульфида (CEES) на работу генетического аппарата клеток *Escherichia coli*, было показано, что в присутствии изучаемого вещества происходит ингибирование таких процессов как транскрипция, трансляция и пост-трансляционная модификация [Venitt, 1968; Ichinotsubo et. al., 1977]. В молекуле ДНК *Salmonella typhimurium* в результате действия иприта, резко возрастает количество генных мутаций [Ichinotsubo et. al., 1977]. В пораженных клетках микроорганизмов нарушается нормальная работа генов, препятствующих спонтанному апоптозу, в результате чего наблюдается их ускоренная гибель [Hur et. al., 1998].

1.3. Способы уничтожения иприта и продуктов его гидролиза

1.3.1. Физико-химические способы уничтожения иприта и продуктов его гидролиза

Уничтожение запасов иприта, очистка почв и водоемов, загрязненных ипритом, представляют собой очень важную и сложную для решения проблему [Удальцова и др., 1993; DeFrank et. al., 1995; Mulbry, Rainina, 1998].

До недавнего времени под понятием “уничтожение” иприта, как химического оружия, подразумевалось лишь его захоронение. Наиболее быстрыми и дешевыми способами являлись - захоронение в землю, затопление в море [Бекер и др., 1993; Луганский и др., 1994]. Кроме того, был предложен метод сжигания иприта на открытом воздухе, однако, этот процесс сопровождается образованием большого количества твердых и газообразных отходов – потенциальных источников загрязнения окружающей среды

[Боронин и др., 1999]. В настоящее время использование этих способов, как экологически опасных, запрещено Женевской конвенцией [Бекер и др., 1993].

Современные экологические требования определяют необходимость создания способа и технологий деструкции иприта до экологически безопасных продуктов.

Проблема осложняется еще и тем, что в результате длительного хранения запасов иприта содержание в них основного вещества снижается, а количество вязких, смолообразных масс увеличивается, что в определенной мере затрудняет процесс его уничтожения, биодеструкции [Умяров и др., 1993].

Существует ряд требований к разработке технологии уничтожения химического оружия: обеспечение безопасности в процессе реализации технологии, невысокую стоимость технологии и обеспечение надежного контроля при осуществлении технологического процесса. Кроме того, условия хранения и возможность транспортировки запасов токсичных веществ к местам уничтожения акцентирует внимание на разработке технологий, позволяющих проводить работы по детоксикации, как в стационарных заводских условиях, так и непосредственно в местах захоронения оружия [Боронин и др., 1996].

В основу известных технологий уничтожения запасов HD положены химические, термические, каталитические и энергетические способы [Умяров и др., 1993; Савин и др., 1995; Lois Ember, 1993].

К числу химических способов относятся:

1. Химическая нейтрализация иприта, при которой образуются соединения менее токсичные, чем исходное вещество. Среди этих методов выделяют два основных - водный или водно-щелочной гидролиз и нейтрализация с использованием водноспиртовых растворов щелочей. Общими недостатками указанных способов являются низкая скорость процесса, большой объем дегазирующего раствора. По мнению некоторых авторов, щелочной гидролиз иприта сопровождается образованием в значительных количествах

полимеризованных продуктов, биодegradация которых затруднительна [Yang et. al., 1988].

2. Метод окислительного хлорирования суспензиями хлорной извести или растворами гипохлорита кальция. Существенным недостатком этого метода является образование токсичных хлорорганических соединений и большого количества отходов.

В России разработан двухступенчатый способ уничтожения иприта, заключающийся в его детоксикации (I ступень) и последующем сжигании реакционных масс (II ступень) [Боронин и др., 1996]. Детоксикация проводится с использованием смеси моноэтаноламина и этиленгликоля в массовом соотношении 9:1 [Луганский и др., 1994]. Недостатком этого метода является накопление на I ступени в реакционной смеси продуктов конденсации фрагментов иприта, этиленгликоля и моноэтаноламина, а на второй – выделение токсичных газов при сжигании реакционных масс.

Обращает на себя внимание исследование [Боронин и др., 1999], в котором разработаны научные основы комплексной экологически безопасной технологии уничтожения запасов иприта, включающей 3 основных стадии.

На первой стадии проводится химическая детоксикация иприта с использованием смеси щелочи, соды, сульфанола (алкилбензолсульфаната Na - 90%), моноэтаноламина и воды в соотношении 1: 1: 0,02: 1: 20 при температуре 80°С в течение 2 ч. Основным компонентом реакционных масс, образующихся при этом, является ТДГ. Для окисления ТДГ реакционные массы подвергают электролизу, а затем направляют на биоочистку, в биосорбере, где процесс очистки от органических продуктов электрохимической деструкции ТДГ осуществляется спонтанным сообществом микроорганизмов, иммобилизированных на поверхности взвешенного слоя гранулированного активированного угля.

Другой способ гидролиза и окисления продукта гидролиза иприта - ТДГ предложен Lachance с соавт. В соответствии с этим методом ТДГ подвергали деградации при температуре 400-525°C под давлением в присутствии окислителей либо без них [Lachance et. al., 1999]. В результате этой реакции происходила деструкция ТДГ. Однако продукты подобного физико-химического воздействия не являются экологически безопасными и требуют дальнейшей утилизации.

С целью уничтожения иприта исследуется также возможность использования его в качестве исходного сырья для получения продуктов, которые возможно использовать в промышленности.

Так, проведена экспериментальная оценка возможных путей использования иприта с целью получения высокоэффективных комплексообразователей, катализаторов межфазного переноса, пластификаторов, полисульфидных полимеров и др. Однако, практическая реализация этого, несомненно, интересного направления осложняется наличием в техническом, длительно хранящемся иприте смолообразных продуктов [Евстафьев и др., 1991; Умяров и др., 1993].

Таким образом, известные физико-химические способы уничтожения иприта сложны, длительны, неэкономичны, а часто и неприемлемы с позиций экологии, так как их реализация связана с образованием больших количеств газообразных, жидких и твердых отходов, неблагоприятных для окружающей среды.

1.3.2. Биологическая деструкция иприта и продуктов его гидролиза

С целью решения проблемы обезвреживания ксенобиотиков в природных условиях изучается возможность использования селекционированных микроорганизмов для детоксикации иприта и продуктов его гидролиза

[Боронин и др., 1999; Ермакова и др., 2002; Медведева и др., 1998; Медведева и др., 2000; Медведева и др., 2006]. Показано, что благодаря чрезвычайно высокой гетерогенности природных популяций микроорганизмов, а также их способности адаптироваться к неблагоприятным условиям существования, многие ксенобиотики (в т.ч. хлорорганические соединения), могут в той или иной степени ими усваиваться [Мицевич и др., 2000; Ogawa et. al., 2003]. С большой долей вероятности обнаружить микроорганизмы-деструкторы можно в местах, длительное время загрязненных соответствующим токсикантом, ксенобиотиком [Мицевич и др., 2000; Ermakova et. al., 2002].

Сообщений о микробиологической деструкции иприта в доступной литературе мало, что свидетельствует о недостаточном уровне изученности этой проблемы. Тем не менее, из результатов известных исследований следует, что биодеструкция иприта микроорганизмами возможна. С целью решения данной задачи предлагается использование *комбинированного* двух стадийного способа, на первой стадии которого проводится гидролиз иприта, а на второй – биопотребление продуктов гидролиза, основным из которых является ТДГ [Петров и др., 1995]. Lee с соавторами предложил метод минерализации иприта, включающий химический гидролиз иприта и биологическую утилизацию образующегося при этом ТДГ как источника углерода и энергии. В качестве биологического агента использовали различные штаммы бактерий рода *Alcaligenes*. Биодеструкцию ТДГ проводили в лабораторном реакторе резервуарного типа при содержании ТДГ в среде в концентрации, не превышающей 30 мМоль/л (18,3 г/л) [Lee et. al., 1997].

Другой двустадийный способ уничтожения ТДГ, разработанный Российскими учеными, основан на применении физико-химической обработки ТДГ с последующим использованием микроорганизмов, способных потреблять образующиеся при этом продукты [Боронин и др., 1999].

Особый интерес, с научной и практической позиций, представляют исследования процессов детоксикации иприта микроорганизмами как с прокариотным, так и с эукариотным типом строения.

Так, учитывая способность базидиомицетов подвергать метаболической деструкции тринитротолуен (или тринитротолуол), хлорфенолы, серосодержащие гетероциклические соединения и другие токсические вещества [Rozmiarek et. al., 1973; Takeshima et. al., 1994] японские ученые провели исследования с использованием этих грибов для детоксикации иприта [Itoh et. al., 1997]. Показано, что две культуры: *Coriolus versicolor* и *Tyromyces palustris* трансформируют аналог иприта (бис(2-бромэтил) сульфид) с образованием ТДГ и бензил сульфида. При этом ТДГ, в концентрации 0,5мМ (0,061г/л), подвергается быстрой, за 50 часов, биодеструкции (схема деструкции не приведена). Второе соединение - бензилсульфид, подвергается гидролизному дегалогенизированию. Эти данные позволили авторам предположить возможность использования базидиомицетов для детоксикации иприта.

Среди изучаемых штаммов бактерий, проявляющих способность к деструкции иприта и продуктов его гидролиза, основная масса выделена из природных источников с помощью метода накопительных культур. В основе метода лежит инкубирование загрязненных продуктами гидролиза иприта почв в течение нескольких месяцев. Подобные условия, позволяют развиваться в почве только тем микроорганизмам, которые обладают толерантностью по отношению к ПГИ или могут использовать их в качестве единственного источника углерода и энергии [Тихонова и др., 2002; Medvedeva et. al., 2000].

Так, выделенные из почвы штаммы *Pseudomonas* sp.8-2 и *Micrococcus* sp.6-2 использовали продукты гидролиза иприта в качестве источника углерода и энергии. Выделенные микроорганизмы проявляли способность осуществлять полную (на 100%) трансформацию ТДГ в концентрации 7,8 г/л из смеси ПГИ (0,50 г ХОС/л). При увеличении концентрации ПГИ до 0,80 г ХОС/л (15,4 г/л ТДГ) обе культуры осуществляют утилизацию ТДГ лишь на 53-63%. Увеличить

активность процесса удалось лишь в случае его ведения в две стадии (при дополнительном внесении культуры-деструктора на второй стадии). Максимальная концентрация токсиканта, при которой наблюдалось полное потребление ТДГ при 2-х стадийном культивировании, достигала 1,52 г ХОС/л (23,2 г/л ТДГ) [Медведева и др., 2000]. Следует отметить, что авторы не приводят схемы трансформации ТДГ выделенными микроорганизмами, и не уточняют, до каких именно конечных продуктов происходит процесс трансформации.

Другие бактериальные штаммы *Pseudomonas pikettii* (SH18) и *Alcaligenes xylosoxydans* (*ssp. xylosoxydans* SH42) были выделены из почвенных образцов, загрязненных ипритом. Обе культуры используют ТДГ в качестве единственного источника углерода и энергии. С помощью метода радионуклеоидного анализа показано, что культуры способны трансформировать 84% (SH18) и 97% (SH42) ТДГ в концентрации 160 г/л и 20-30 г/л (соответственно). Конечным продуктом трансформации ТДГ у обеих культур является тиодигликоль сульфоксид [Yang Y.C. et. all 1992]. Образующийся продукт не подвергается дальнейшей микробиологической деструкции и является тупиковым, что приводит к его накоплению и не позволяет рассматривать эти культуры в качестве перспективных для создания технологий по очистке открытых экосистем от ПГИ [Harvey S.P. et. all 1993].

В основной массе научных трудов по изучению процесса деградации иприта в качестве изучаемого вещества используется ТДГ, как основной продукт его гидролиза. Как и иприт, ТДГ является труднодоступным субстратом для микроорганизмов, и долгое время может сохраняться в различного рода экосистемах (почва, вода) в неизменном виде [Lee et. al., 1997; Munro et. al., 1999].

В процессе разработки способов деструкции и детоксикации ТДГ, были обнаружены штаммы бактерий, использующие ТДГ в качестве источника углерода. При изучении промежуточных продуктов, образуемых *Alcaligenes*

xylosoxydans (*ssp. xylosoxydans* SH91), в процессе утилизации ТДГ (в концентрации 25мМ или 0,3%) было обнаружено, что основными реакциями метаболизма ТДГ культурой *Alcaligenes xylosoxydans* являются окисление ТДГ до тиодигликолевой кислоты с последующим разрывом С-S связей в образовавшихся продуктах (ТДГК и ТГК). Образующийся в результате ацетат, вовлекается в реакции центрального метаболизма и является для клетки источником углерода и энергии [Lee et. al., 1997; Pham et. al., 1996].

Как следует из приведенной на рисунке 2 схемы идентифицированными промежуточными продуктами утилизации ТДГ в данном случае являются: дигликольсульфоксид (ДГСО), S-(2-гидроксиэтилтио)уксусная кислота (НЭТА) и тиодигликолевая кислота (ТДГК) [Lee et. al., 1997]. При увеличении концентрации ТДГ до 40-100мМ (4,8-12 г/л) потребление ТДГ прекращается.

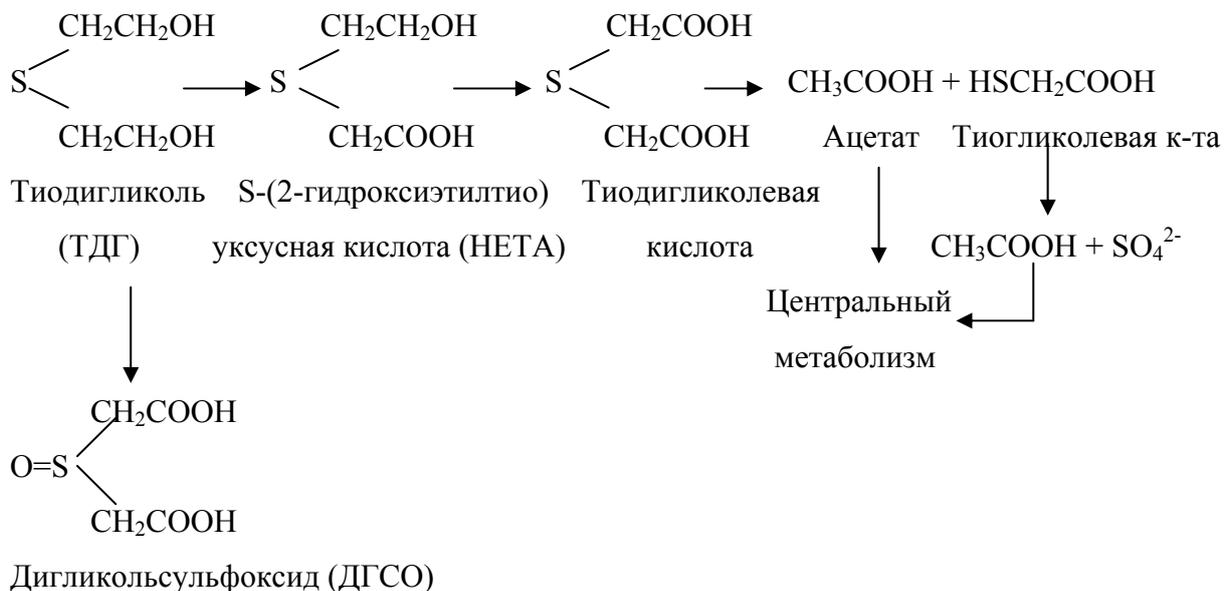


Рис.2. Схема метаболизма ТДГ культурой *Alcaligenes xylosoxydans* (*ssp. xylosoxydans* SH91)

Изучение возможности ассимиляции промежуточных продуктов окисления ТДГ показало, что дигликольсульфоксид (ДГСО) в концентрации от 0,5 г/л до 1,5 г/л не используется культурой *Alcaligenes xylosoxydans* в качестве источника

углерода, но и не ингибирует рост бактерий. Основная масса дигликольсульфоксида накапливается в период активного роста культуры и практически отсутствует при окислении ТДГ интактными клетками. Авторы считают, что окисление ТДГ с образованием ДГСО является тупиковой ветвью метаболизма и осуществляется за счет широкой субстратной специфичности различных оксигеназ [Ермакова и др., 2002].

В отличие от ДГСО тиодигликолевая кислота (ТДГК) используется культурой *Alcaligenes xylosoxydans* (ssp. *xylosoxydans* SH91) как источник углерода для роста [Lee et. al., 1997; Lee et. al., 2000]. Кроме того, эта кислота активно окисляется интактными клетками бактерий до тиогликолевой кислоты, ацетата и ионов SO_4^{2-} .

Иммобилизированные на криогеле клетки *Alcaligenes xylosoxydans* (ssp. *xylosoxydans* SH91) могут трансформировать ТДГ в концентрациях, не превышающих 200 мМ (24 г/л) и сохраняют активность в течение 3 месяцев [Kim et. al., 1997]. Однако авторы предлагают использование этой культуры для трансформации ТДГ только в биореакторах. Реализация этого процесса в природных условиях не рассматривается.

Другой штамм *Alcaligenes xylosoxydans* PGH10 оказался не способен использовать ТДГ в качестве источников углерода и энергии, только интактные клетки этого штамма могут трансформировать ТДГ в концентрации до 7,2 г/л. [Garcia-Ruiz et. al., 2002]. В связи с этим использование данного штамма в качестве активного деструктора ТДГ не целесообразно.

Оптимизация процесса утилизации ТДГ на примере *Alcaligenes xylosoxydans* PGH10 показала, что наибольшей активностью обладают клетки в начале стационарной фазы роста. А эффективность процесса трансформации ТДГ возрастает при добавлении в экспериментальную среду цитрата или фруктозы, в качестве дополнительных источников углерода и энергии [Garcia-Ruiz et. al., 2002].

Изучение возможности штамма *Alcaligenes xyloxydans* TD2 к трансформации ТДГ выявило, что рост культуры возможен при концентрации ТДГ от 0,8 г/л до 39 г/л. Однако, на кривой роста культуры отмечают фазы замедления, что, по мнению авторов, связано с лимитированием или ингибированием роста бактерии продуктами трансформации ТДГ (ДГСО и ТДГК) [Тихонова и др., 2002]. Этот факт, по мнению авторов, ставит под сомнение использование данного штамма в качестве культуры-деструктора.

При определении промежуточных продуктов трансформации ТДГ культурой *Pseudomonas sp.* 8-2, были идентифицированы только органические кислоты: 2-оксиэтилгликолевая кислота; тиодигликолевая кислота [Медведева и др., 2000а]. Штамм уксуснокислой бактерии *Gluconobacter oxydans* L-1 трансформирует ТДГ в высоких концентрациях – до 100 г/л, с образованием 2-оксиэтилтиогликоля и ТДГК, в качестве основных продуктов метаболизма. Дальнейшей трансформации и тем более утилизации образующихся продуктов не происходит [Медведева и др., 1996; Медведева и др., 2000б].

ТДГ может использоваться бактериями и как источник серы. Так, при росте культуры *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968) в среде с глицерином и 2-хлордиэтил-сульфидом (хлорированным аналогом ТДГ), в качестве источника серы, была идентифицирована 2-хлорэтансульфиновая кислота [Kilbane, Jakowski, 1996].

Изучается возможность деструкции иприта с помощью микробных ферментов. Израильские ученые предложили использовать для деградции иприта смесь, состоящую: из грибной хлоропероксидазы (источником которой является *Caldariomyces fumago*); 0,5М раствора NaCl; смеси глюкозы с глюкозооксидазой (*Aspergillus niger*), в качестве альтернативного источника H₂O₂. Ученым удалось найти такое соотношение компонентов в данной смеси, которое позволяло добиться полной деградции растворенного иприта (10микроМ/л) за 30 минут при 25°C, pH 2.75 [Amitai et. al., 2003].

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что, по мнению большинства исследователей, самым перспективным методом для очистки различного рода экосистем от загрязнения ипритом является именно микробиологический метод. Однако на пути реализации этой задачи ученые столкнулись с рядом проблем. Основная сложность состоит в выделении или получении методами генетики и/или селекции высокоактивной культуры микроорганизмов, обладающей свойством осуществлять не только процесс трансформации иприта до менее токсичных его производных, или тиодигликоля в высоких концентрациях, но и осуществлять полную деструкцию токсиканта с полным потреблением всех промежуточных продуктов этого процесса. Кроме того, культура не должна являться токсичной для других организмов, поскольку это послужит препятствием ее использования для очистки открытых экосистем. Не менее важное значение, имеет определение условий ведения процесса с учетом свойств используемой культуры.

1.4. Влияние продуктов гидролиза иприта на биологическую активность почв

Основными компонентами микробной биомассы почв являются микроскопические грибы [Полянская и др., 1977; Anderson et. al., 1975] и бактерии [Мишустин, Емцев, 1987]. Они принимают активное участие в разложении поступающего в почву органического материала и формировании гумуса [Мирчинк, 1988; Christensen, 1989]. В целом, видовой и количественный состав микробиоты почв зависит от климатической зоны, характеристики почвы и ее состояния, времени года и т.д. Таким образом, микробиологический состав почв представляет собой весьма динамическую систему, каждая

составляющая которой вносит свой вклад в сохранение структурной и функциональной целостности сообщества в целом.

Для разработки научно обоснованной методологии реабилитации экосистем от ипритного загрязнения необходимо оценить возможность самой экосистемы (и микробиоты как ее составляющей части) по преодолению вредных воздействий.

Особенность почв, загрязненных ипритом и его производными, состоит в том, что они сохраняют высокую токсичность в течение длительного времени, что, по-видимому, связано с тем, что полного разложения этих веществ, т.е. самоочищения в почве не происходит [Medvedeva et. al., 2000]. Более того, в том случае если загрязнение почвы ипритом произошло в глубоких слоях, то оно может сохранять в неизменном виде годами [Watson, 1992; Munro et. al., 1999].

Существует два основных пути деградации иприта в почве: химический гидролиз и биodeградация. Скорость химического гидролиза зависит от влажности, температуры и типа почвы, уровня загрязнения. При относительной влажности менее 50%, химический гидролиз в почве не идет [Medvedeva et. al., 2000]. В условиях повышенной влажности и высокой температуры – химический гидролиз ускоряется, но никогда не достигает 100%. Остаточное количество иприта и его высокотоксичных хлорорганических производных сохраняется в почве и через 12 месяцев после загрязнения [Медведева и др., 2000б]. Что касается типа почвы, то быстрее всего иприт подвергается гидролизу в почвах со щелочным pH [Franke, 1967].

Одним из важнейших показателей биологической активности почв является активность почвенных ферментов. Иприт и его производные негативным образом влияют на биохимические процессы в почвах, что приводит к резкому падению их биологической активности. Под действием иприта снижается активность инвертазы, уреазы, дегидрогеназы. Отрицательное влияние оказывает иприт и на такой важнейший показатель биохимических процессов в почве как интенсивность выделения углекислоты - дыхание почвы. Восстановление исходных (до загрязнения) показателей

активности почвенных ферментов не достигается даже через год после первичной обработки токсикантом [Medvedeva et. al., 2000].

Кроме того, высокой чувствительностью к иприту обладают высшие растения: даже в незначительных концентрациях он полностью подавляет рост и развитие исследованных зерновых и бобовых культур: овса, пшеницы, гороха, овсяницы луговой, костра безостого, полевицы белой [Medvedeva et. al., 2000].

Таким образом, загрязненные ипритом почвы отличаются высокой токсичностью и замедленным характером протекания биологических процессов, их детоксикация естественным путем происходит крайне медленно.

Наиболее значимым показателем устойчивости почв к антропогенным воздействиям служит активность микробных сообществ [Ohtonen, 1994]. По данным Медведевой с соавт. [Medvedeva et. al., 2000], кантоминация почвы ипритом приводит, как к изменению характеристик почвы (изменение активности ферментов, снижение интенсивности дыхания и т.д.), так и к изменению численности и структуры сообщества почвенных микроорганизмов.

В загрязненных ипритом и тиодигликолем почвах происходит увеличение показателей доминирования, снижение показателей сходства и видового разнообразия почвенной микрофлоры, что свидетельствует о снижении устойчивости системы в целом [Medvedeva et. al., 2000]. В результате экспериментов обнаружено, что в загрязненных ипритом и ТДГ почвах значительно подавляется жизнедеятельность целлюлозоразрушающих бактерий, а жизнедеятельность микромицетов и актиномицетов подавляется практически полностью [Medvedeva et. al., 2000]. Так, через год после кантоминации дерново-подзолистой почвы продуктами гидролиза иприта в концентрации 0,07 г/л ХОС численность микромицетов и актиномицетов составляла около 5-10% от исходного количества. Столь сильное подавление активности микроорганизмов почвы приводит к тому, что разложение ксенобиотиков содержащимися в почве аборигенными микроорганизмами происходит крайне медленно.

Отрицательное воздействие, оказываемое ипритом и продуктами его гидролиза на экосистему в целом, может привести к тому, что она не вернется к первоначальному устойчивому состоянию и будет необратимо деградировать.

При сравнительно низких концентрациях токсикантов в почве постепенно происходит активизация местного микробиоценоза - увеличение численности различных микроорганизмов, что связано со снижением токсического действия загрязнителя, под их воздействием. Так, количество бактерий в торфяно-глеевой почве, содержащей смесь ПГИ в концентрации (0,24-0,97 г/л ХОС) и дерново-подзолистой почве, содержащей смесь ПГИ в концентрации (0,07-0,24 г/л ХОС) почвах, восстанавливается до уровня контроля в течение 6 месяцев с момента загрязнения [Medvedeva et. al., 2000].

Способность почвенных микроорганизмов сохраняться в неблагоприятных и восстанавливать популяцию в благоприятных условиях, делает их незаменимыми в современных экологических исследованиях для ранней диагностики изменений, происходящих в экосистемах под воздействием токсичных веществ и возможности их микробной деструкции [Звягинцев, 1987б; Сулей, 1989]. Большинство исследователей проблемы биоремедиации почв загрязненных продуктами гидролиза иприта, предлагают использование для этой цели активных штаммов микроорганизмов-деструкторов, устойчивых к повышенным концентрациям токсикантов. Этот способ представляет особый интерес и важность, так как является наиболее экологически безопасным из числа известных.

Для разработки такого способа очистки необходимо изучить вопрос о характере и механизмах действия смеси ПГИ и ТДГ как на природные микробиоценозы в целом, так и на отдельные их компоненты. Эти исследования позволят не только объяснить изменение видового разнообразия микробных сообществ в почве под действием ПГИ и ТДГ, но и определить наиболее перспективные микроорганизмы для использования их с целью очистки почв от этих поллютантов.

Важнейшей, центральной задачей этой проблемы является выделение (получение) микроорганизмов - высокоэффективных деструкторов этих ксенобиотиков, изучение продуктов деструкции, с целью оценки их безопасности для живых организмов, растений.

Внесение в почву микроорганизмов – деструкторов в сочетании с различными агрохимическими приемами, следует рассматривать как оптимальное решение проблемы очистки территорий, загрязненных ПГИ.

Глава 2

Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

В работе использовали микроорганизмы различных таксономических групп – бактерии, актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы. Культуры получали из различных коллекций, указанных, как и названия культур, в таблице 1.

Таблица 1

Список культур микроорганизмов

№ п/п	Название культуры	Коллекция, из которой получена
Бактерии		
1	<i>Arthrobacter globiformis</i> (Cohn.) Connet Dimmick	ВКМ
2	<i>Bacillus megaterium</i> De Bary 1884	ВКМ
3	<i>Bacillus mycoides</i> - 412	ВКМ
4	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn.	ВКМ
5	<i>Brevibacterium flavum</i>	НИИА (г.Ереван)
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	НИЦФ
7	<i>Micrococcus lysoducticus</i> Fleming - 109	ВКМ
8	<i>Mycobacterium lacticola</i> Lehmann et Neumann - 356	ВКМ
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula - 584	ВКМ
10	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Trevisan) Migula - 542	ВКМ
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	НИЦФ
13	<i>Staphylococcus citereus</i>	ВКМ
Актиномицеты		
14	<i>Micromonospora echinospora</i>	ВНИТИАФ
15	<i>Micromonospora</i> sp.	ВНИТИАФ
16	<i>Nocardia dossonsillei</i>	ВНИТИАФ
17	<i>Nocardia baciliensis</i>	ВНИТИАФ
18	<i>Streptomyces roseviolaceus</i> Sveshnicova - 1273	ВКМ
19	<i>Streptomyces globisporus</i> Krassilnicov - 1151	ВКМ
20	<i>Streptomyces violancens</i> Preobrazhenskaya - 1138	ВКМ
21	<i>Streptomyces flaveolus</i> (Waksman) Krassilnicov - 1035	ВКМ

22	<i>Streptosporangium sp.</i>	ВНИТИАФ
23	<i>Streptosporangium sp.</i>	ВНИТИАФ
Дрожжи		
24	<i>Candida utilis П-61</i>	ВНИИ синтез-белок
25	<i>Candida humicola - 6</i>	ВНИИ гидролиз
26	<i>Cryptococcus flavus Y-2232</i>	ВКМ
27	<i>Cryptococcus humicola (Daszewska 1912) Golubev 1981 Y1613</i>	ВКМ
28	<i>Rhodotorula VI</i>	ВНИИ синтез-белок
29	<i>Torula roseum</i>	ВНИИ синтез-белок
30	<i>Trichosporon cutaneum Нем.2(70)</i>	ВНИИ гидролиз
31	<i>Lipomyces lipotereus 1415</i>	ВКМ
32	<i>Saccharomyces cerevisiae Hansen - 379</i>	ВКМ
33	<i>Saccharomyces cerevisiae 4-511</i>	ВКМ
34	<i>Sporobolomyces pararoseus 1632</i>	ВКМ
35	<i>Sporobolomyces pararoseus T</i>	Ин-т Микробиологии, Беларусь
Мицелиальные грибы		
36	<i>Alternaria consortiale 515</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
37	<i>Alternaria radicina 256</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
38	<i>Aspergillus flavus Link 162</i>	ВКМ
39	<i>Aspergillus fumigatus Fresenius F - 28</i>	ВКМ
40	<i>Aspergillus niger F -1119</i>	ВКМ
41	<i>Aspergillus terreus Thom - 2</i>	ВКМ
42	<i>Aspergillus versicolor (Vuillemin) Tiraboschi F - 837</i>	ВКМ
43	<i>Botritis cinerea</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
44	<i>Fusarium oxysporum</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
45	<i>Helminthosporium sativum (Bipolaris sorokiniana)</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
46	<i>Helminthosporium inaeguale (Curvularia inaequalis)</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
47	<i>Mucor hiemalis Wehner F - 1341</i>	ВКМ
48	<i>Mucor murorum</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН
49	<i>Penicillium funiculosum Thom F - 1115</i>	ВКМ
50	<i>Penicillium ochrochloron Biourge F - 1827</i>	ВКМ
51	<i>Penicillium stoloniferum</i>	ГНУ ВНИИ с/х м/б РАСХН

52	<i>Trichoderma viride</i> Persoon F - 426	ВКМ
53	<i>Scopulatoriopsis brevicaulis</i> (Saccarda) Bainier – 85с.	ВКМ

2.2. Методы исследования морфологических и физиолого-биохимических признаков микроорганизмов

2.2.1. Определение морфологических признаков

Морфологию культур микроорганизмов изучали методами просвечивающей электронной микроскопии [Наyat, 1974].

Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-8800, окраску срезов проводили по методу Рейнольдса 0,1%-ным раствором уранилацетата. Препараты исследовали в электронном микроскопе JEM-100С (Япония) при ускоряющем напряжении 80кВ [Spurr, 1969]. Сканирующую микроскопию проводили с использованием микроскопа JSM-35С (Япония) при ускоряющем напряжении 15кВ.

Эти исследования выполнены в ГосНИИОЧБ (г. Санкт-Петербург) с участием д.б.н. Рыбальченко О.В., любезно предоставившей снимки, помещенные в работе.

2.2.2. Определение физиолого-биохимических признаков

Об изменении уровня проницаемости клеток микроорганизмов судили по "утечке" из клеток в среду (инкубационную жидкость) метаболитов, имеющих полосы поглощения в ультрафиолетовой области (220-350 нм) [Federson et. al., 1990]. Полученные спектры обсчитывали с применением метода спектральных моментов, используя для характеристики данных экспериментальных спектров момент нулевого порядка μ_0 [Александров и др., 1993; Иванов, Совков, 1993].

Количественное содержание белка определяли методом Лоури [Lowry, et. al., 1975], количество белка выражали в мкг/г а.с.б.; аминокислот - методом

тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol" [Munavalli et. al., 1988] в системе растворителей 1-пропанол: 25%-ный аммиак в соотношении 1:1. Для выявления пятен использовали 2 % раствор нингидрина в ацетоне, для элюирования пятен использовали 0,5% раствор хлористого кадмия в этаноле.

Ионы калия определяли фотометрически на пламенном фотометре ПАЖ-3 [Аринушкина, 1970], количество ионов калия выражали в мкг/г а.с.б.

Выделение липидов микромицетов проводили методом Фолча [Кейтс, 1975]. Выход липидов рассчитывали на 1 г а.с.б. Для получения метиловых эфиров жирных кислот применяли HCl-метанольный реагент [Кейтс, 1975]. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом газожидкостной хроматографии по ГОСТ Р51483-99 "Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме". Анализ проводили на хроматографе Perkin-Elmer 8410 с пламенно-ионизационным детектором. Температурный режим детектора 200°C. Условия анализа: колонка металлическая микронасадочная, 2м X 1/8 дюйма, неподвижная фаза 3% SP 2310 + 2% SP 2300 на носителе газ-хром Q. Температура печи колонки 50-185°C, скорость нарастания температуры 8°/мин. Температура испарителя 230°C. Газ-носитель – азот (скорость 70 мл/мин). Идентификацию жирных кислот проводили сравнением их времен удержания со временем удержания стандартных веществ.

Эти исследования выполнены во Всероссийском НИИ жиров (г. Санкт-Петербург) с участием к.б.н. Горшковой Э.И.

Амилолитическую активность микроорганизмов определяли методом, основанным на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы. Исследования проводили по общепринятой методике, амилолитическую активность выражали в г крахмала/г а.с.б. [Грачева и др., 1982].

Для определения каталазной активности у микроорганизмов использовали метод, основанный на титрометрическом определении количества разложившейся перекиси водорода в течение определенного времени. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее разложение 1 мкМ H_2O_2 за 1 мин. и выражали в ед./мг а.с.б. [Борисова, 1973].

Для определения активности дегидрогеназ использовали метод, основанный на определении активности различных дегидраз по восстановлению 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорида (ТТХ). Полученные результаты выражали в граммах трифенилформазана из расчета на 100 мг а.с.б. [Логинова, Гужева, 1961].

Активность комплекса целлюлолитических ферментов, выделяемых в культуральную жидкость определяли методом Мандельс-Вебера [Марчева, 1985], для чего микромицеты выращивали на среде Чапека, содержащей в качестве единственного источника углерода фильтровальную бумагу. Целлюлазную активность определяли по количеству редуцирующих сахаров, образующихся при гидролизе фильтровальной бумаги и выражали в ед. (ммоль/мл). Редуцирующие сахара определяли методом Сомоджи-Нельсона, используя в качестве стандарта глюкозу [Somogyi, Babu, 1952]. Прирост биомассы определяли по количеству белка методом Лоури [Lowry et. al., 1975].

Определение глюкозооксидазной активности проводили титрометрическим методом по количеству перекиси водорода, образующейся в процессе окисления глюкозы глюкозооксидазой. За единицу глюкозооксидазной активности принято количество фермента, катализирующее окисление 1 мкМ глюкозы за 1 минуту в оптимальных условиях (при $+30^\circ\text{C}$, избытке кислорода и глюкозы, что сопровождается потреблением 1 мкМ кислорода, равного 22,4 мкг) и выражали в ед./мг а.с.б. [Борисова, 1973].

Определение количества меланина подобных пигментов проводили по методу водно-щелочной экстракции из биомассы микромицетов [Лысенко, Лях, 1977]. Количество пигмента определяли весовым методом и выражали в мг/г а.с.б.

Определение количества экзополисахаридов проводили в культуральной жидкости, используя для их осаждения этанол [Егоров, 1976]. Получаемый осадок осаждали центрифугированием, высушивали при 120°C и взвешивали. Количество экзополисахаридов выражали в мг/г а.с.б.

2.3. Выделение микроорганизмов - деструкторов продуктов гидролиза иприта из почвенных образцов

Микроорганизмы–деструкторы продуктов гидролиза иприта (ПГИ) выделяли из почвенных компостов. Для приготовления почвенных компостов 20-25г воздушно-сухой почвы помещали в бьюкс, увлажняли (до 60% от полной влагоемкости), добавляли смесь продуктов гидролиза иприта из расчета 0,30 г ХОС/кг почвы, тщательно перемешивали и помещали в термостат с температурой +27±1°C. Периодически компосты увлажняли, перемешивали. Время инкубации – 20 суток.

Для выделения культур микроорганизмов из почвенных компостов предварительно получали накопительные культуры. Для этого образцы почвенных компостов вносили на кончике скальпеля в колбы Эрленмейера объемом 250 мл со стерильной жидкой средой № 1, следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 6,0; KH₂PO₄ – 5,0; K₂HPO₄ – 5,0; MgSO₄ – 0,2; содержащую смесь ПГИ в качестве единственного источника углерода (0,78 ± 0,04 г/л ХОС и 7,0 ± 0,2 г/л ТДГ), рН 7,2–7,4. Раствор смеси ПГИ предварительно стерилизовали фильтрованием через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, затем вводили в среду с соблюдением мер асептики одновременно с посевным материалом. Культивирование проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл питательной среды на роторной качалке при 230 об./мин и температуре +28±1°C. Через 7 суток производили пересев – пассаж (5% об.) в колбы со свежей средой того же состава. О наличии прироста биомассы в каждом пассаже судили по изменению рН и по данным нефелометрического анализа

(КФК-2, $\lambda = 540$ нм). Выделение чистых культур бактерий (толерантных к продуктам гидролиза иприта) из накопительных культур (после 4-ого пассажа) проводили методом Коха на плотной питательной среде №1а следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 4,0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,5$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,5$; $\text{MgSO}_4 - 0,2$; с добавлением (г/л) глюкозы – 5,0; дрожжевого экстракта – 2,0; смеси ПГИ ($0,080 \pm 0,006$ г/л ХОС ; $0,72 \pm 0,04$ г/л ТДГ); агара – 20.

Способность отобранных культур осуществлять деструкцию ПГИ определяли двумя методами:

1. по росту на твердой среде №1а с добавлением (г/л): ТДГ – 2,0; $\text{CaCO}_3 - 2,5$; агара – 20; рН 7,2–7,4. Контролируемые показатели – наличие роста и растворение CaCO_3 , что свидетельствует об образовании кислых продуктов деструкции тиодигликоля.

2. по росту в глубинных условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со стерильной жидкой средой №1 с добавлением $\text{CaCO}_3 - 10$ г/л и содержащей смесь ПГИ, в качестве единственного источника углерода ($0,78 \pm 0,04$ г/л ХОС и $7,0 \pm 0,2$ г/л ТДГ). Объем среды в колбе – 50 мл, рН – 6,8 – 7,2. Растворы ПГИ, стерилизовали отдельно и вносили в среду как описано выше, одновременно с засевом колб исследуемой бактериальной культурой. Культивирование проводили в тех же условиях.

Прирост биомассы определяли нефелометрически (КФК-2, $\lambda = 540$ нм) и весовым методом; рН культуральной жидкости измеряли потенциометрически (рНметр-673М); интенсивность аэрации сульфитным методом [Егоров, 1976], на качалке.

На основе полученных данных отобрали наиболее активную культуру-деструктора ПГИ для проведения дальнейших исследований.

2.4. Изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков выделенной культуры-деструктора

Изучение морфолого-культуральных признаков проводили по общепринятым методам [Егоров, 1983].

В качестве физиолого-биохимических признаков изучали способность культуры проявлять ферментативную активность в отношении различных субстратов, используя среду Хью-Лейферсона [Hugh, Leifson, 1953] следующего состава (% масс.): пептон – 0,2 г; NaCl – 0,5; K₂HPO₄ – 0,03; агар-агар – 0,3; бромтимоловый синий (водорастворимый) – 0,003; углеводы – 1; pH – 6,8 – 7,2.

Образование индола определяли по качественной реакции с реактивом Эрлиха [Егоров, 1983], образование сероводорода по почернению индикаторной бумаги (пропитанной насыщенным раствором уксуснокислого свинца) [Егоров, 1983].

Способность культуры к усвоению азота в аммиачной форме изучали по наличию роста на агаризованной синтетической среде следующего состава (г/л): глюкоза – 3,0; NH₄NO₃ – 0,3; K₂HPO₄ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄ – 0,05; NaCl – 0,05; CaCO₃ – 0,5; FeSO₄ – следы; агар-агар – 15; pH 6,8 – 7,2 [Егоров, 1983].

Способность культуры к денитрификации, а также способность восстанавливать нитраты до нитритов определяли по выделению газа на мясопептонном бульоне, содержащем 0,5% KNO₃ и 0,1% глицерина [Sneath, Collins, 1974].

Для обнаружения оксидазной активности использовали 1% раствор солянокислого диметилпарафенилендиамида [Kovacs, 1956]. Каталазную активность выявляли с применением 10% раствора перекиси водорода [Егоров, 1983].

2.5. Токсикологическая оценка выделенной культуры-деструктора

С наиболее активным штаммом-деструктором ПГИ проведены токсикологические исследования с целью изучения его безопасности для теплокровных животных. Оценку безопасности штамма проводили на базе виварного комплекса НИЦ ТБП (Московская область, г. Серпухов), на лабораторных линиях беспородных белых мышей массой 16-18г. и белых крыс живой массой 160-180г. по общепринятым методикам [Лабинская и др., 2004].

Для определения среднесмертельной дозы LD_{50} была приготовлена суспензия микроорганизмов, которая содержала 10^6 - 10^{10} микробных клеток в 1 мл. Полученной суспензией были заражены белые мыши и белые крысы. Использовали два способа заражения: внутрибрюшинно и через пищеварительный тракт. При внутрибрюшинном заражении доза составила 10^6 - 10^8 клеток на одно животное, при заражении через пищеварительный тракт - 10^8 - 10^{10} клеток на одно животное. Контрольным группам животных вводили по 1 мл физиологического раствора той же партии, что использовали для смыва микроорганизма с питательной среды. В каждой подопытной и контрольной группах было по 6 животных. Наблюдения проводили в течение 30 дней с момента заражения.

Для определения токсичности суспензия штамма в концентрации 10^8 - 10^{10} клеток в мл была прогрета при 70°C в течении 30 минут на водяной бане и внутрибрюшинно введена белым мышам. В группе было 6 животных, срок наблюдения за которыми составлял 5 дней.

Определение токсигенности, т.е. способности штамма продуцировать токсины и выделять их в окружающую среду, фильтрат бульонной культуры изучаемого штамма, в объеме 0,25-1,50 мл, вводили белым мышам внутрибрюшинно и через пищеварительный тракт. Контрольным животным

вводили чистую питательную среду. В каждой группе было по 6 животных. Учет токсигенности проводили через 24 часа.

Определение диссеминации во внутренних органах экспериментальных животных [Лабинская и др., 2004] проводили по истечению 30-дневного срока наблюдения над крысами и мышами, зараженными живой культурой микроорганизма. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, а из их внутренних органов (легкие, сердце, печень, почка, селезенка) делали высевы на селективную питательную среду методом отпечатков. За инкубируемыми посевами вели наблюдение в течение 7 дней, отмечая наличие или отсутствие роста бактерий.

2.6. Хранение и культивирование бактерий, методы контроля за процессом культивирования

Культуру-деструктор хранили на твердой питательной среде №1а с добавлением (г/л): глюкозы – 5,0; дрожжевого экстракта – 2,0; смеси ПГИ 0,015 ± 0,001 г/л ХОС (0,14 ± 0,01 г/л ТДГ); агара - 20; рН - 7,0. Хранение производили при 4°C, частота пересевов - 1 раз в месяц.

Выращивание в глубинных условиях проводили в колбах на среде №1 при +28±1°C на роторной качалке (n=230 об/мин) при различных значениях рН - от 6,0 до 9,0. В качестве единственного источника углерода в питательную среду вносили смесь ПГИ (от 0,15 до 2,70 г/л ХОС, содержащую соответственно от 1,2 до 24,4 г/л ТДГ). Растворы ПГИ, стерилизовали фильтрованием и вносили с соблюдением методов асептики в ферментационную среду одновременно с посевным материалом. В качестве посевного материала использовали суспензию клеток, выращенных при 28°C в течение 48-72 часов на агаризованной среде № 1. Количество посевного материала, вносимого в ферментационную среду, составляло 10% от объема среды, с тем расчетом,

чтобы оптическая плотность ферментационной среды после засева составляла $0,4 \pm 0,03$, при длине волны 540 нм.

В процессе и в конце культивирования контролировали уровень pH. Заданный уровень pH (6,0-9,0) поддерживали стерильным раствором 1,0 N NaOH.

Концентрацию биомассы определяли нефелометрически (КФК-2, длина волны 540 нм). В вариантах, содержащих CaCO_3 , при определении биомассы мел предварительно растворяли 20%-ным раствором HCl.

2.7. Определение тиодигликоля, хлорорганических соединений, продуктов трансформации продуктов гидролиза иприта бактериями

Модельную смесь ПГИ получали нагреванием водной смеси 0,65 М ТДГ (ICN 103039 RT, 99%, плотность 1,18) и 0,65 М HCl при 90°C в течение 8 часов. Полученная смесь ПГИ содержит $7,5 \pm 0,03$ г/л ХОС; $67,8 \pm 0,2$ г/л ТДГ.

Количественное определение ТДГ в растворах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе "Hewlett - Packard" HP1090 в режиме обращеннофазовой хроматографии при следующих условиях: температура - 25°C, колонка Luna фирмы Phenomenex, скорость потока – 1 мл/мин., детекция – 215 нм, элюент – 5 %-ый ацетонитрил, объем пробы - 10 мкл.

Для идентификации и количественного определения промежуточных продуктов деструкции ТДГ использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф HP-1090 с диодноматричным УФ-детектором и компьютерной системой управления и сбора данных).

Определение тиогликолевой (ТГК) и тиодигликолевой (ТДГК) кислот и ацетатов проводили с использованием колонки Vydac (USA) 218TP54 (RP-18, 4,6x250мм). Рабочий режим – изократический. В качестве рабочего буфера

использовали 20 мМ тетрабутиламмоний, забуференный 20 мМ фосфатом натрия, рН 6,35, содержащий в случаях анализа ТГК и ТДГК 15% (объемных) ацетонитрила, при анализе ацетатов – 5% (объемных) ацетонитрила.

Определение ТДГК проводили при 20°C, скорость потока составляла 1 мл/мин. Анализ ТДК и ацетата проводили при 50°C и скорости потока 1,5 мл/мин.

Определение меркаптоэтанола (МЭ) после его модификации по методу Элмана [Ellman, 1959] проводили на том же приборе с использованием колонки Waters (С-18, Δ -Pack, 3,9x150мм). Рабочий режим – градиентный. Рабочие буферы: А – 0,1% трифторуксусная кислота, В – 100% ацетонитрил. При анализе использовали линейный градиент от 20% В до 30% В за 8,5 мин, общее время анализа 12 мин., поток 1,5 мл/мин, температура 20°C.

Эти исследования выполнены в ГосНИИОЧБ (г. Санкт-Петербург) с участием ст. научного сотрудника Протасова Е.А.

Содержание хлорорганических соединений – продуктов гидролиза иприта определяли спектрофотометрическим методом на КФК-2, длине волны 420нм (кювета 2см), с последующим использованием калибровочной кривой [Франке, 1973; Issa et. al., 1975]. Для построения калибровочной кривой использовали исходный раствор иприта в гексане с концентрацией $10,0 \pm 1,0$ г/л, из которого готовили ряд стандартных растворов, с диапазоном концентраций 0,050 – 1,0 г/л. К 1 мл из каждой пробы добавляли 3 мл «синего» реактива (1 г тимолфталейна растворенного в 200 мл этанола с добавлением 18 мл 3%-ого раствора КОН). Полученную смесь кипятили с обратным холодильником на водяной бане в течение 30 минут. После остывания проб к каждой из них приливали по несколько капель уксусной кислоты, после чего объем пробы доводили этанолом до 10 мл. Растворы окрашивались в желтый цвет, интенсивность которого и определяли по оптической плотности.

2.8. Исследование почвенных образцов

Для определения способности бактерий осуществлять деструкцию ПГИ в почве использовали серую лесную почву (Московская обл., г. Серпухов). Воздушно-сухую почву просеивали через сито с диаметром отверстий – 2 мм. Необходимые навески воздушно-сухой почвы помещали в пластмассовые емкости объемом 1000 мл, увлажняли, обрабатывали раствором ПГИ, создавая концентрацию 1,0 г ХОС/кг а.с.почвы. Опытные образцы инокулировали суспензией бактерии-деструктора, в количестве – $10^8 - 10^9$ кл./г а.с.почвы.

Для определения содержания тиодигликоля и хлорорганических соединений в почве использовали почвенную вытяжку, которую готовили из 5 г почвы, ее помещали в 10 мл воды и встряхивали в течение 15 мин. Полученную суспензию отфильтровывали и в фильтрате определяли содержание ХОС и ТДГ по методикам, описанным в разделе 2.6.

Агрохимические показатели почв определяли по стандартным методикам [Аринушкина, 1970].

Определение фитотоксичности почв. Для определения острой токсичности исследуемых почвенных образцов был выбран метод фитотестирования [Звягинцев, 1987а; Андреюк, 1981]. Сущность метода заключается в определении влияния на нормальное развитие и рост растений химикатов различной концентрации, добавленных к испытываемой почве. Метод соответствует международному стандарту ИСО 11269-2 [Фомин и др., 2003].

В качестве тест-объекта использовали однодольное растение семейства злаков – овес яровой (*Hordeum vulgare* L.) Используемая методика рекомендует выращивание растений на образцах почв в чашках Петри в условиях, обеспечивающих нормальный рост выбранного в качестве тест – объекта вида растений: при комнатной температуре воздуха (18-22°C), влажности – $60 \pm 5\%$, уровень освещенности не менее 4000 ЛК в течение 10-16 часов за сутки. Весь тест-материал был предварительно откалиброван, т.е. отобраны семена определенной длины (не менее 13 мм) и массы (не менее 40 мг). Для

проведения фитотестирования почвенные образцы после инкубирования в течение 10, 14 и 30 недель переносили в чашки Петри, располагая ровным слоем, толщиной 0,5 см и раскладывали равноудаленно друг от друга по 20 семян овса в каждую чашку. В течение последующих 4-х суток поддерживали достаточное увлажнение почвенных образцов, смачивая их при необходимости водой. Для оценки уровня всхожести семян определяли количество семян с наличием проростка от общего количества семян. Для оценки уровня роста и развития растений измеряли длину их корня и coleoptilya. В качестве опытного варианта использовали образцы почв загрязненные 1 г ХОС/ кг а.с.п.(7,7 г ТДГ/кг а.с.п.) и инокульрованные клетками *Pseudomonas sp.* Y-13, в качестве контроля использовали не загрязненные и загрязненные 1 г ХОС/ кг а.с.п. (7,7 г ТДГ/кг а.с.п.) образцы почв.

Содержание влаги и сухого вещества в пробах почв определяли при высушивании пробы до постоянной массы при $105 \pm 5^\circ\text{C}$ и определении разницы в массе почвы до и после высушивания [Фомин и др., 2003].

2.9. Математическая обработка результатов

Математическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с методиками Ашмарина [Ашмарин и др., 1974] и Максимова [Максимов, 1980]. Данные, представленные в экспериментальной части, являются средними арифметическими значениями результатов, полученных в трех-четыре опытах с трех-пятикратными повторностями каждого варианта.

В качестве меры разброса значений от средней величины применяли среднее квадратичное отклонение среднего арифметического по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}, \quad \text{где}$$

$(\bar{x} - x_i)$ - отклонение каждого значения от среднеарифметического

$\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2$ - сумма всех квадратов отклонений

$(n - 1)$ - число степеней свободы.

Ошибку среднего арифметического $S_{\bar{x}}$ определяли по формуле:

$$S_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Оценку значимости различий между найденными в опытных и контрольных условиях величинами проводили с помощью критерия Стьюдента по формуле:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}}$$

Рассчитанный на основании экспериментальных данных t -критерий сравнивали с табличными значениями, учитывая число степеней свободы. Уровень достоверности полученных данных не ниже 95%, что является допустимым для исследования биологических систем.

Глава 3.

Влияние продуктов гидролиза иприта на рост и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов

Как показано ранее [Медведева и др., 2000], продукты гидролиза иприта оказывают токсическое действие на микробиоценоз в почвах.

Загрязнение почв ТДГ и смесью ПГИ приводит к формированию, практически новых микробных сообществ, характерной чертой которых является повышенный уровень показателя доминирования, понижение уровней сходства и видового разнообразия, что свидетельствует о снижении биоустойчивости системы в целом. На изменение видового разнообразия микробного состава в почвах влияет различный уровень чувствительности отдельных групп микроорганизмов к этим ксенобиотикам.

К настоящему времени решение проблемы очистки природных экосистем – почв, водоемов от этих загрязнителей затруднено из-за отсутствия соответствующих экологически безопасных технологий. В литературе практически отсутствует информация о характере и механизмах действия ПГИ, как на природные микробиоценозы в целом, так и на отдельные компоненты микробных сообществ.

В настоящей главе представлены результаты сравнительного исследования степени чувствительности различных микроорганизмов – бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов и дрожжей к смеси ПГИ и основному из них – ТДГ, а также влияния этих субстратов на морфологические и физиолого-биохимические свойства одной из основных групп почвенных микроорганизмов – мицелиальных грибов.

3.1. Рост актиномицетов, бактерий, микромицетов и дрожжей на средах, содержащих продукты гидролиза иприта

Список культур микроорганизмов, использованных в работе, представлен в таблице 1 (раздел 2.1.), среди них 18 культур мицелиальных грибов из родов: *Alternaria* (2), *Aspergillus* (5), *Botrytis* (1), *Fusarium* (1), *Helmintosporium* (2), *Mucor* (2), *Penicillium* (3), *Trichoderma* (1), *Scopulariopsis* (1) и 12 культур дрожжей, следующих родов: *Candida* (2), *Cryptococcus* (2), *Rhodotorula* (1), *Trichosporon* (1), *Lipomyces* (1), *Torula* (1), *Saccharomyces* (2), *Sporobolomyces* (2).

Из актиномицетов в качестве тест-культур выбраны 10, относящиеся к родам: *Micromonospora* (2), *Nocardia* (2), *Streptomyces* (4), *Streptosporangium* (2); из бактерий – 12 культур из родов: *Artrobacter* (1), *Bacillus* (3), *Brevibacterium* (1), *Escherichia* (1), *Micrococcus* (1), *Mycobacterium* (1), *Pseudomonas* (2), *Staphylococcus* (2).

Культуры микромицетов и актиномицетов культивировали на агаризованной среде Чапека с глюкозой, дрожжи на среде Сабуро, а бактерии на двух агаризованных средах: Чапека с глюкозой (рН 7) и МПА с глюкозой. В состав сред вносили ТДГ в концентрациях от 5 до 100 г/л, или смесь ПГИ – от 0,6 г/л ХОС; 0,5 г/л ТДГ до 6,6 г/л ХОС; 55 г/л ТДГ.

Продолжительность культивирования для микромицетов и актиномицетов составляла 14 суток, а для бактерий и дрожжей 4-7 суток, соответственно.

Уровень чувствительности микроорганизмов к ПГИ оценивали по наличию или отсутствию их роста на соответствующих средах.

Как показали результаты, на средах, содержащих ТДГ и смесь ПГИ, подавление роста наблюдается у всех исследованных микроорганизмов. Однако, как и следовало ожидать, степень чувствительности к этим веществам зависит от родовой, а в некоторых случаях и видовой их принадлежности, а также от концентрации ТДГ и смеси ПГИ (табл. 2; рис. 3,4).

Показатели среднесмертельной LD₅₀ и бицидной LD₁₀₀ концентрации ТДГ и смеси ПГИ для микроорганизмов.

№ п/п	Название культуры	ТДГ (г/л)		Смесь ПГИ (г/л)	
		LD ₅₀	LD ₁₀₀	LD ₅₀	LD ₁₀₀
Бактерии					
1	<i>Arthrobacter globiformis</i> (Cohn.) Connet Dimmick	50	130	1,8 ХОС 15 ТДГ	4,8 ХОС 40 ТДГ
2	<i>Bacillus megaterium</i> De Bary 1884	60	130	2,4 ХОС 20 ТДГ	5,4 ХОС 45 ТДГ
3	<i>Bacillus mycoides</i> - 412	70	170	2,4 ХОС 20 ТДГ	5,4 ХОС 45 ТДГ
4	<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn.	50	130	3,0 ХОС 25 ТДГ	4,8 ХОС 40 ТДГ
5	<i>Brevibacterium flavum</i>	60	170	3,0 ХОС 25 ТДГ	5,4 ХОС 45 ТДГ
6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50	150	2,4 ХОС 20 ТДГ	4,8 ХОС 40 ТДГ
7	<i>Micrococcus lysodukticus</i> Fleming - 109	60	150	3,0 ХОС 25 ТДГ	5,4 ХОС 45 ТДГ
8	<i>Mycobacterium lacticola</i> Lehmann et Neumann - 356	30	60	1,8 ХОС 15 ТДГ	4,2 ХОС 35 ТДГ
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula - 584	90	170	3,0 ХОС 25 ТДГ	6,0 ХОС 50 ТДГ
10	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Trevisan) Migula - 542	80	170	2,4 ХОС 20 ТДГ	6,0 ХОС 50 ТДГ
12	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	90	170	2,4 ХОС 20 ТДГ	6,0 ХОС 50 ТДГ
13	<i>Staphylococcus citereus</i>	70	170	3,0 ХОС 25 ТДГ	6,0 ХОС 50 ТДГ
Актиномиценты					
14	<i>Micromonospora echinospora</i>	2	10	0,3 ХОС 2,5 ТДГ	0,6 ХОС 5,0 ТДГ
15	<i>Micromonospora</i> sp.	2	10	0,3 ХОС 2,5 ТДГ	0,6 ХОС 5,0 ТДГ
16	<i>Nocardia dossonsiliei</i>	5	30	1,2 ХОС 10 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
17	<i>Nocardia baciliensis</i>	7	30	1,2 ХОС 10 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
18	<i>Streptomyces roseviolaceus</i> Sveshnicova - 1273	10	40	1,2 ХОС 10 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
19	<i>Streptomyces globisporus</i> Krassilnicov - 1151	15	50	1,8 ХОС 15 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ

20	<i>Streptomyces violancens</i> <i>Preobrazhenskaya - 1138</i>	10	40	1,2 ХОС 10 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
21	<i>Streptomyces flaveolus</i> <i>(Waksman) Krassilnicov - 1035</i>	7	30	1,2 ХОС 10 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
22	<i>Streptosporangium sp.</i>	5	20	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТДГ
23	<i>Streptosporangium sp.</i>	5	20	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТДГ
Дрожжи					
24	<i>Candida utilis П-61</i>	10	30	0,6 ХОС 5.0 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
25	<i>Candida humicola - 6</i>	10	30	0,6 ХОС 5.0 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
26	<i>Cryptococcus flavus BKM-Y-2232</i>	15	30	1,2 ХОС 10 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
27	<i>Cryptococcus humicola</i> <i>(Daszewska 1912) Golubev</i> <i>1981 Y 1613</i>	15	30	1,2 ХОС 10 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
28	<i>Rhodotorula VI</i>	30	60	1,8 ХОС 15 ТДГ	4,2 ХОС 35 ТДГ
29	<i>Torula roseum</i>	30	60	1,8 ХОС 15 ТДГ	4,2 ХОС 35 ТДГ
30	<i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Нем.2(70)</i>	20	40	0,6 ХОС 5.0 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
31	<i>Lipomyces lipotereus 1415</i>	5	20	0,3 ХОС 2,5 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТДГ
32	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Hansen - 379</i>	20	50	1,2 ХОС 10 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>BKM-4-511</i>	15	40	0,6 ХОС 5.0 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
34	<i>Sporobolomyces paraposeus</i> <i>BKM-1632</i>	30	60	1,8 ХОС 15 ТДГ	4,2 ХОС 35 ТДГ
35	<i>Sporobolomyces pararoseus T</i>	20	50	1,2 ХОС 10 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
Мицелиальные грибы					
36	<i>Alternaria consortiale 515</i>	15	30	0,6 ХОС 5.0 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
37	<i>Alternaria radicina 256</i>	15	30	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
38	<i>Aspergillus flavus Link 162</i>	20	40	1,8 ХОС 15 ТДГ	3,0 ХОС 25 ТДГ
39	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Fresenius F – 28</i>	30	50	1,8 ХОС 15 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ

40	<i>Aspergillus niger</i> F -1119	30	50	2,4 ХОС 20 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
41	<i>Aspergillus terreus</i> Thom - 2	40	60	3,0 ХОС 25 ТДГ	4,2 ХОС 35 ТДГ
42	<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi F - 837	20	40	1,2 ХОС 10 ТДГ	2,4 ХОС 20 ТДГ
43	<i>Botritis cinerea</i>	10	20	0,3 ХОС 2,5 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТД
44	<i>Fusarium oxysporum</i>	10	30	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
45	<i>Helminthosporium sativum</i> (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	10	30	0,3 ХОС 2,5 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТД
46	<i>Helminthosporium inaeguale</i> (<i>Curvularia inaequalis</i>)	15	30	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,2 ХОС 10 ТД
47	<i>Mucor hiemalis</i> Wehner F - 1341	30	50	3,0 ХОС 25 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
48	<i>Mucor murorum</i>	30	60	3,0 ХОС 25 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
49	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom F - 1115	30	50	1,8 ХОС 15 ТДГ	3,6 ХОС 30 ТДГ
50	<i>Penicillium ochrochloron</i> <i>Biourge</i> F - 1827	20	40	1,8 ХОС 15 ТДГ	3,0 ХОС 25 ТДГ
51	<i>Penicillium stoloniferum</i>	20	40	1,8 ХОС 15 ТДГ	3,0 ХОС 25 ТДГ
52	<i>Trichoderma viride</i> Persoon F - 426	15	30	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ
53	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (<i>Saccarda</i>) Bainier – 85с.	15	30	0,6 ХОС 5,0 ТДГ	1,8 ХОС 15 ТДГ

Микромицеты. На среде с 10 г/л ТДГ колонии образуют все использованные культуры, однако у представителей родов *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, размер колоний, определяемый методом Эббота [Методические указания, 1985], уменьшался на 25-30%.

При увеличении концентрации ТДГ до 20 г/л размер колоний на 30-40% уменьшается практически у всех культур, за исключением грибов родов *Botrytis*, *Helminthosporium*, *Mucor*, у которых признаки подавления роста отсутствуют.

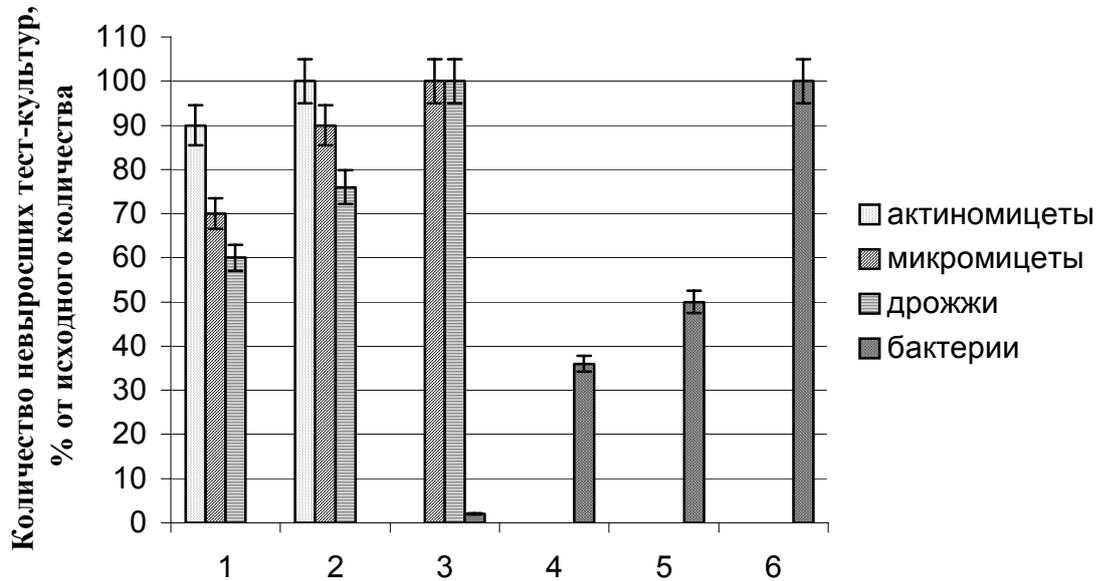


Рис. 3. Количество тест-культур микроорганизмов, рост которых отсутствует на среде с различным содержанием ТДГ. Контроль – исходное число тест-культур, 100%.

Концентрация ТДГ в среде: 1 – 40 г/л; 2 – 50 г/л; 3 – 60 г/л; 4 – 130 г/л; 5 – 150 г/л; 6 – 170 г/л.

Различные уровни чувствительности у микромицетов к ТДГ подтверждаются также данными, полученными при больших его концентрациях 40-60 г/л. Рост культур мицелиальных грибов, отмеченных выше как наиболее чувствительные, отсутствует уже при концентрации ТДГ в 40 г/л, в то время как у остальных культур полное подавление роста происходит только при 60 г/л ТДГ.

Значительно большую чувствительность микромицеты проявляют к смеси ПГИ. В силу повышенной токсичности ХОС шаг варьирования его концентраций в среде был меньше, чем ТДГ и составлял около 0,6 г/л по ХОС. Испытаны следующие концентрации ПГИ: 1,2 г/л ХОС и 10 г/л ТДГ; 1,8 г/л

ХОС и 15 г/л ТДГ; 2,4 г/л ХОС и 20 г/л ТДГ; 3,0 г/л ХОС и 25 г/л ТДГ; 3,6 г/л ХОС и 30 г/л ТДГ; 4,2 г/л ХОС и 35 г/л ТДГ.

Результаты этих наблюдений показали, что у основной части мицелиальных грибов рост отсутствует уже при концентрации смеси ПГИ 3,6 г/л ХОС; 30 г/л ТДГ, подавление роста у всех культур наблюдали при 4,2 г/л ХОС; 35 г/л ТДГ (рис.4.).

Интересно отметить, что грибы родов *Botrytis* и *Helminthosporium*, толерантных к ТДГ, не растут на среде, содержащей смесь ПГИ в самой низкой концентрации 1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ.

Дрожжи. По своей реакции на присутствие в среде ТДГ и смеси ПГИ, в целом, сходны с мицелиальными грибами (рис.3, 4), однако и в том и в другом вариантах дрожжи проявляют большую устойчивость.

Как следует из данных представленных на рисунках 3, 4 самыми чувствительными к ТДГ и смеси ПГИ являются актиномицеты. Рост всех исследованных актиномицетов отсутствовал на среде с 50 г/л ТДГ и при самой низкой из испытанных концентраций смеси ПГИ - 1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ.

Визуальные наблюдения показали, что на средах с ТДГ и смесью ПГИ появление колоний микромицетов, актиномицетов и дрожжей задерживалось на 2 - 3 суток. В этих условиях, в отличие от контрольных, вырастали более мелкие, сильно приподнятые, плотные колонии. У актиномицетов и микромицетов отмечено слабое развитие воздушного мицелия и в значительной степени подавление процесса спорообразования.

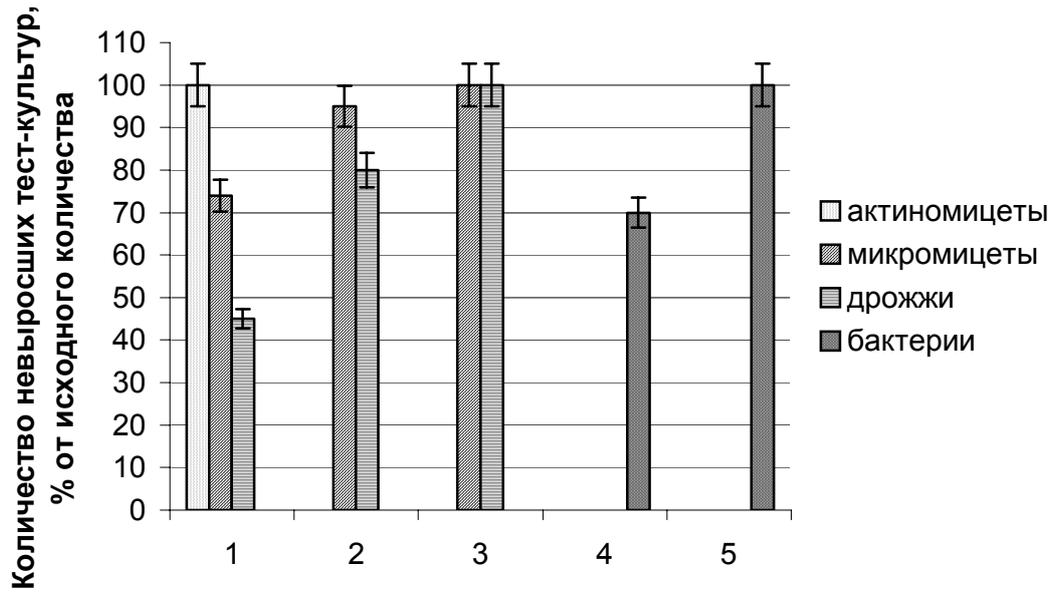


Рис. 4. Количество тест-культур микроорганизмов, рост которых отсутствует на среде с различным содержанием смеси ПГИ. Контроль – исходное число тест-культур, 100%.

Концентрации смеси ПГИ: 1 - 2,4 г/л ХОС; 20 г/л ТДГ; 2 - 3,6 г/л ХОС; 30 г/л ТДГ; 3 - 4,2 г/л ХОС; 35 г/л ТДГ; 4 – 5,4 г/л ХОС; 45 г/л ТДГ; 5 – 6,0 г/л ХОС; 50 г/л ТДГ.

Самыми устойчивыми микроорганизмами к ТДГ и смеси ПГИ являются бактерии и особенно представители родов *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*.

Полное подавление всех использованных в работе бактериальных культур (12 культур) на среде с ТДГ наблюдается при 170 г/л ТДГ, а смеси ПГИ – 6,0 г/л ХОС и 50 г/л ТДГ. Следует отметить, что на богатой питательной среде – МПА, наблюдается тенденция к некоторому увеличению бицидных концентраций и ТДГ и смеси ПГИ.

Таким образом, бицидные концентрации ТДГ и смеси ПГИ для бактерий в 2,6 – 1,4 раза, соответственно, выше, чем для других микроорганизмов.

3.2. Действие продуктов гидролиза иприта на некоторые морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов

Мицелиальные грибы являются важнейшим и неотъемлемым компонентом биоценоза в целом. Именно грибам, отведена ведущая роль в разложении растительного опада, минерализации органических веществ в природе, в том числе таких труднодоступных для других микроорганизмов, как клетчатка, лигнин, пектиновые вещества и многое другое [Мирчинк, 1976].

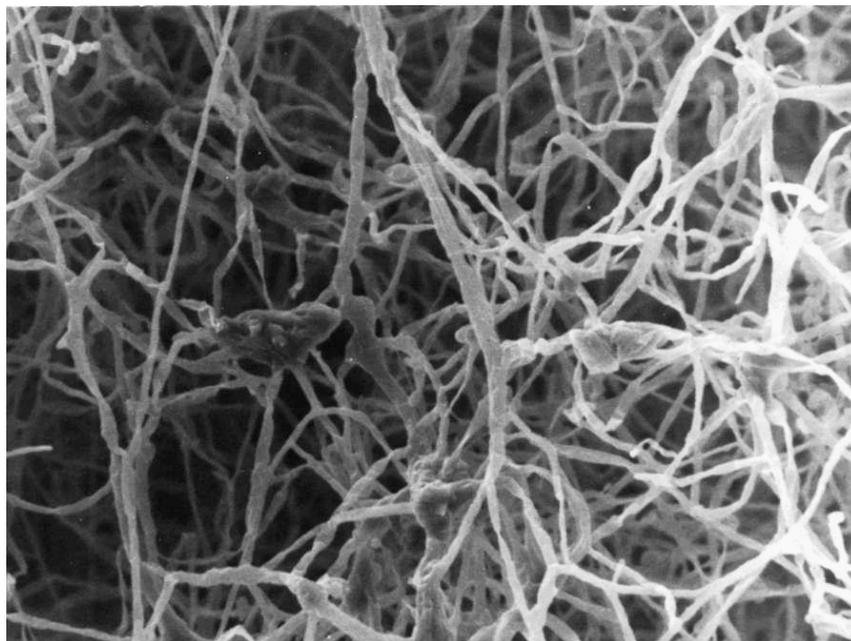
Сравнительно высокая чувствительность грибов к ПГИ позволяет предположить, что загрязнение ими почв приводит к нарушению жизнедеятельности, прежде всего этой группы микроорганизмов со всеми вытекающими из этого негативными последствиями.

Эти позиции и определили выбор мицелиальных грибов, как объекта для начала изучения всего многообразия воздействий, которые могут оказать ПГИ на микроорганизмы.

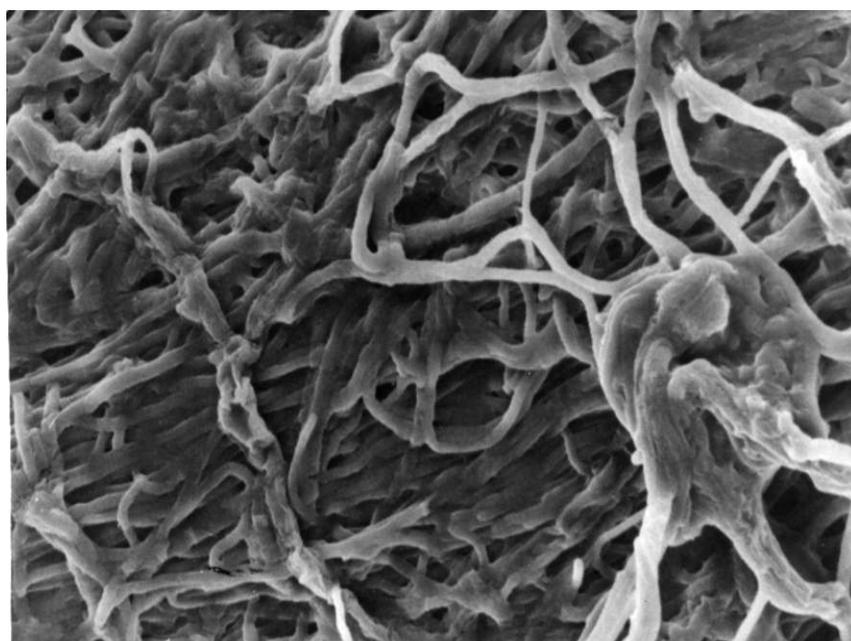
3.2.1. Влияние продуктов гидролиза иприта на морфологические признаки микромицетов

Изучение морфологии мицелиальных грибов, выращенных на среде с ПГИ проводили с использованием 2-х культур - *Aspergillus terreus* и *Penicillium ochrochloron*. С помощью электронной микроскопии у обеих культур выявлены существенные и очень сходные изменения в характере роста, взаимном расположении гиф, размеров и формы клеток. Показано, что на среде, содержащей смесь ПГИ в концентрации 1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ гифы грибов (5 суток культивирования) утолщаются, наблюдается плотное их прилегание друг к другу с образованием плотных тяжей (рис. 5, 6). Плотность прилегания настолько велика, что изменяется форма клеток – создается впечатление, что

наружные слои клеточных стенок сливаются. Кроме того, в опытных клетках увеличивается количество митохондрий (рис.8).



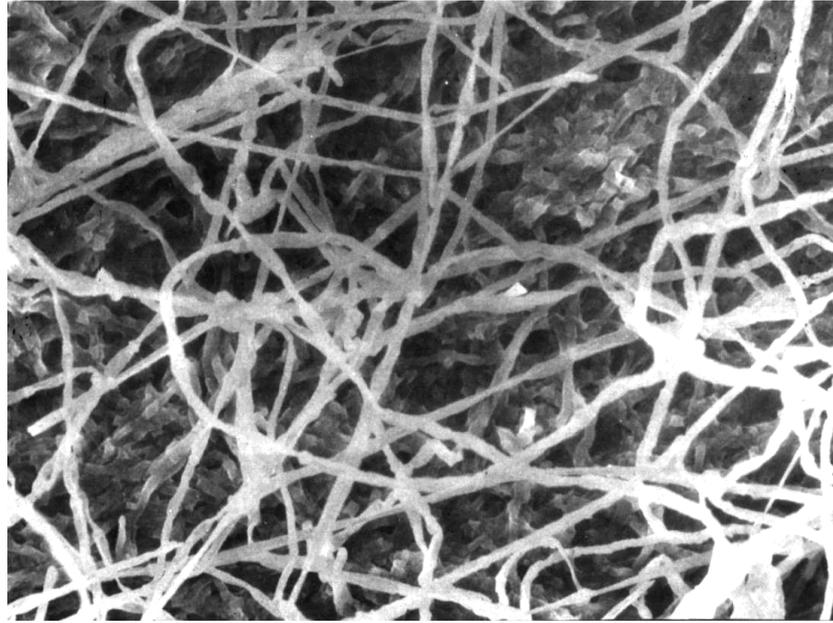
а



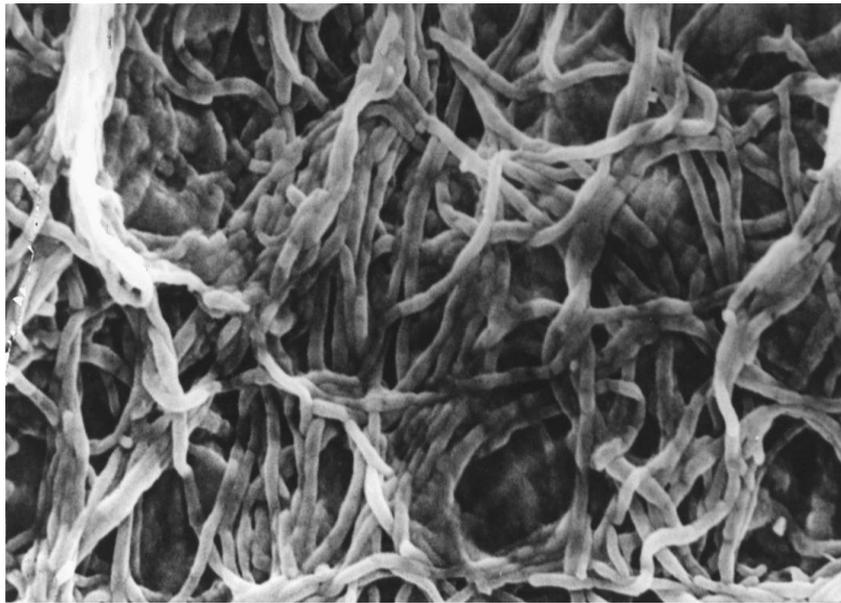
б

Рис. 5. Характер агрегации гиф *Penicillium ochrochloron*, при росте на агаризованной среде Чапека, содержащей смесь ПГИ (1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ) и без нее (контроль). Увеличение X 600.

а – контроль (среда без смеси ПГИ); б – опыт (среда со смесью ПГИ).



а



б

Рис. 6. Характер агрегации гиф *Aspergillus terreus*, при росте на агаризованной среде Чапека, содержащей смесь ПГИ (1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ) и без нее (контроль). Увеличение X 600.

а – контроль (среда без смеси ПГИ); б – опыт (среда со смесью ПГИ).



а

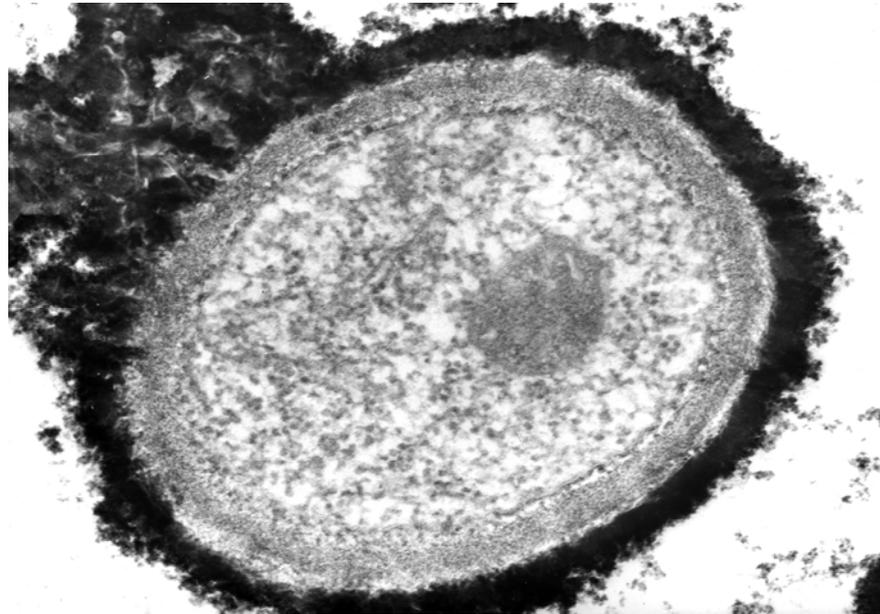


б

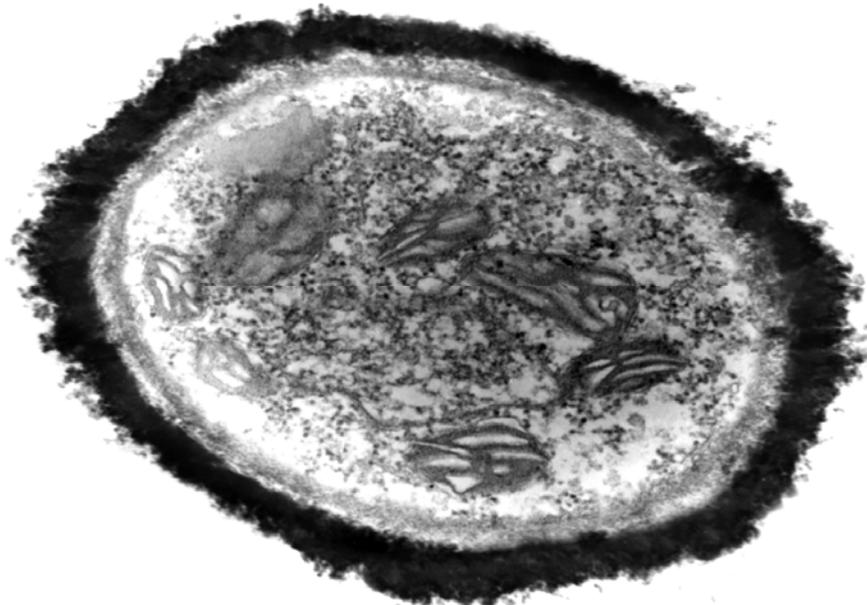
Рис. 7. Форма клеток *Penicillium ochrocloron*, при росте на агаризованной среде Чапека, содержащей смесь ПГИ (1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ) и без нее (контроль). Увеличение X 30 000.

а – контроль (среда без смеси ПГИ); б – опыт (среда со смесью ПГИ).

При изучении ультратонких срезов клеток *P. ochrochloron* (3 суточная культура) был выявлен интересный факт, а именно – в цитоплазме клеток, выросших на среде со смесью ПГИ содержится значительно больше митохондрий, чем в контрольных (рис.8).



а



б

Рис. 8. Ультратонкая структура клеток *Penicillium ochrochloron*, при росте на агаризованной среде Чапека, содержащей смесь ПГИ (1,2 г/л ХОС; 10 г/л ТДГ) и без нее (контроль). Увеличение X 45 000.

а – контроль (среда без смеси ПГИ); б – опыт (среда со смесью ПГИ).

Увеличение числа и размеров митохондрий под действием неблагоприятных факторов, по мнению многих авторов, может быть связано со многими жизненно важными функциями клеток, в том числе с их способностью контролировать процесс адаптации и множественной устойчивости к биоцидам [Мацкевич, 1981] за счет усиленного образования энергии, необходимой для репарации внутриклеточных повреждений [Рапопорт, Вентыня, 1987].

3.2.2. Изменение клеточной проницаемости и жирнокислотного состава липидов микромицетов под действием продуктов гидролиза иприта

Первичной мишенью негативного действия многих химических веществ является цитоплазматическая мембрана [Овчинников и др., 1974]. Изменение проницаемости клеточных мембран одно из следствий адаптации микроорганизмов к токсическому воздействию [Карасевич, 1982]. Возникающие при этом нарушения ее структуры или функций приводят к различным изменениям в процессах жизнедеятельности микроорганизмов или к их гибели.

Результаты исследования на клеточную проницаемость бактерий, дрожжей и микромицетов показали, что данные токсиканты способствуют увеличению проницаемости у всех культур (табл.3).

Сохраняется тенденция более выраженного действия смеси ПГИ на увеличение проницаемости клеточных оболочек по сравнению с действием чистого ТДГ. Очевидно, механизм нарушения проницаемости клеточных оболочек имеет одинаковую природу у культур разных видов.

Аналогичный характер воздействия ТДГ и смеси ПГИ на мембраны наблюдается у дрожжей (родов *Cryptococcus* и *Candida*) (табл.3).

Таблица 3

Влияние ТДГ и смеси ПГИ на клеточную проницаемость
микромицетов и дрожжей

Культуры	Концентрация ТДГ, г/л	Концентрация смеси ПГИ, г/л	Прирост биомассы, % к контролю	Проницаемость, % к контролю
<i>Aspergillus niger</i>	20,0	-	75±8	230±20
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	95±10	240±23
<i>Aspergillus terreus</i>	20,0	-	55±6	170±18
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	40±4	150±15
<i>Penicillium ochrochloron</i>	20,0	-	65±7	280±26
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	95±10	530±55
<i>Penicillium funiculosum</i>	20,0	-	45±6	135±14
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	70±7	130±12
<i>Cryptococcus humicolus</i>	20,0	-	69±7	137±12
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	57±6	140±14
<i>Candida chumicola-6</i>	20,0	-	65±5	148±16
	-	ХОС - 1,2; ТДГ - 10	43±3	159±15

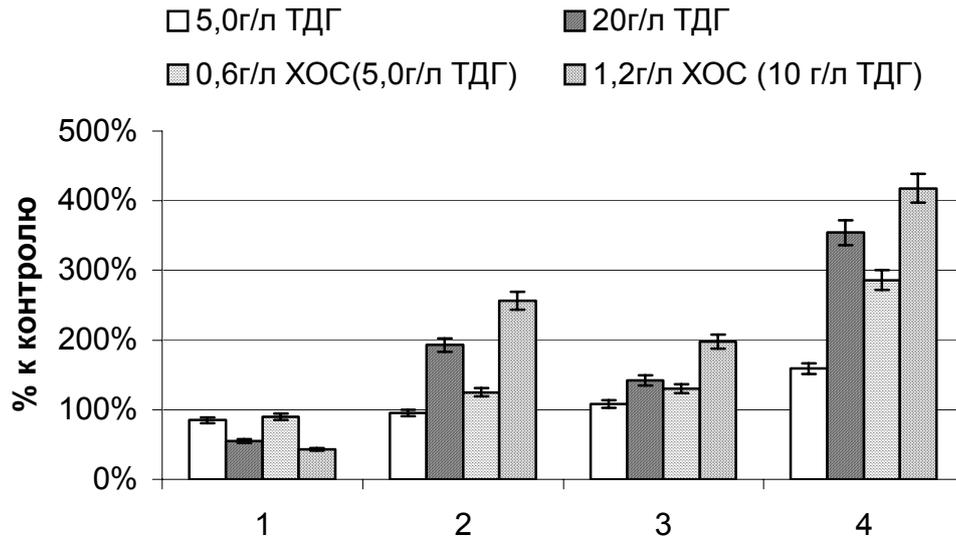
Мембранотропное действие ТДГ и смеси ПГИ подтверждается и данными, полученными и в других экспериментах с дрожжевыми культурами (рис.9).

Как следует из результатов, представленных на рисунке 9, под действием исследуемых субстратов из клеток усиливается «утечка» ионов калия, аминокислот и белков.

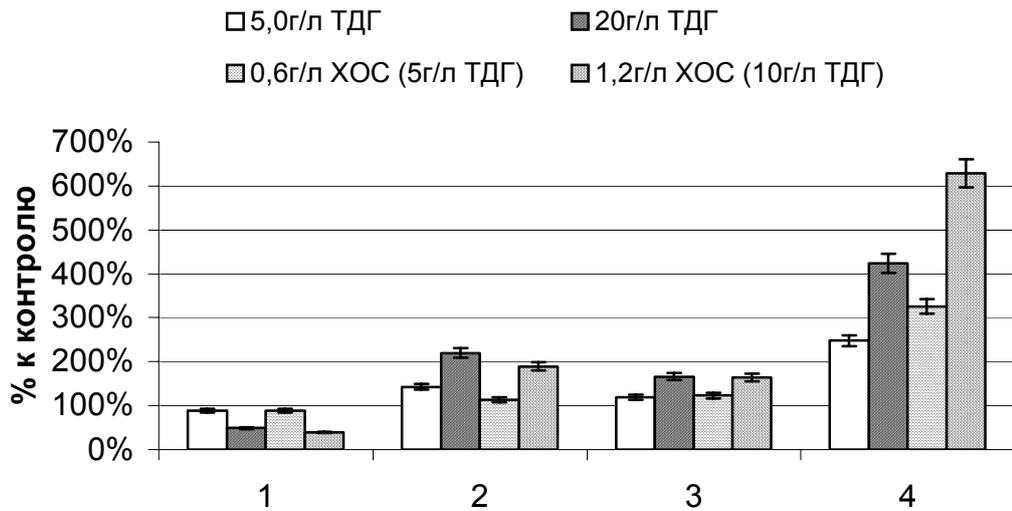
Известно, что одной из первых реакций организма на негативное воздействие факторов внешней среды, являются изменения в составе липидов мембран [Poff et al., 1984; Рубан, 1977]. Такие изменения заключаются в увеличении содержания ненасыщенных липидов или уменьшении средней длины ацильной цепи, что способствует уменьшению плотности упаковки липидов в мембране и поддержанию текучести мембран. Это позволяет клетке выжить в экстремальных условиях [Геннис, 1997; Чиркова, 1997; DeLong, Yayanos, 1985; Rock, Cronan, 1985, Cossins, 1986].

Наблюдаемые в клетках микроорганизмов взаимопревращения жирных кислот связывают с их регулирующей ролью в процессах транспорта веществ [Hsu, Fox, 1970; Mortimer, Niehaus, 1972], изменением клеточной проницаемости [Рубан, 1977; Богач, 1981; Cronan, Vagelos, 1972; Lauwers, Heinen, 1973; Cronan, Gelmann, 1973], функционирование мембраносвязанных ферментов [Богач, 1981; Болдырев, 2001] и др.

С использованием культуры *P. ochrochloron* нами проведены сравнительные исследования жирнокислотного состава липидов мицелия, полученного при культивировании микромицета в среде Чапека содержащей смесь ПГИ и без нее (контроль).



а



б

Рис. 9. Влияние ТДГ и смеси ПГИ на уровень «утечки» белка, аминокислот и ионов калия из клеток *Candida humicola-6* (а) и *Cryptococcus humicolus* ВКПГУ 675 (б). Контроль 100%.

1 – прирост биомассы; 2 – количество белка; 3 – количество аминокислот; 4 – количество ионов калия

Таблица 4

Влияние ТДГ и смеси ПГИ на содержание доминирующих жирных кислот в общих липидах гриба *P. ochrochloron*

Варианты	Жирные кислоты, % от суммы кислот						$\frac{\Sigma C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}}{\Sigma C_{16:0}, C_{18:0}}$
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
Контроль	28,5	2,4	3,9	10,8	53,3	0,5	2,0
ТДГ – 20 г/л	25,0	3,5	2,2	23,1	43,9	0,1	2,6
ПГИ -1,2 г/л ХОС	16,5	1,2	1,2	11,6	68,4	-	4,6

Из результатов, представленных в таблице 4, следует, что под действием ТДГ и смеси ПГИ у *P. ochrochloron* происходит изменение жирнокислотного состава липидов. Степень ненасыщенности жирных кислот в липидах (отношение суммы ненасыщенных к сумме насыщенных кислот [Фунтикова, 1992; Фунтикова, 1998] опытных вариантов выше, чем в липидах контрольной биомассы. По данным ряда авторов [Дедюхина и др., 1988, Фунтикова и др., 1998] наблюдаемое изменение в жирнокислотном составе липидов клеток гриба, возможно, является одним из проявлений их адаптации к неблагоприятным воздействиям исследуемых веществ.

3.2.3. Влияние продуктов гидролиза иприта на физиолого-биохимические признаки микромицетов

3.2.3.1. Влияние продуктов гидролиза иприта на активность ферментов

Так как между белковыми и липидными компонентами в мембране существует тесная взаимосвязь можно ожидать, что изменения в

жирнокислотном составе липидов будут влиять и на функциональные свойства мембранных белков, в частности ферментов.

В настоящем разделе работы представлены результаты изучения действия ТДГ и смеси ПГИ на активность у микромицетов таких ферментов как: дегидрогеназы, амилазы, целлюлазы, каталазы, пероксидазы.

Дегидрогеназы – ферменты, катализирующие отщепление водорода от органических веществ, имеются у всех организмов и играют большую роль в функционировании цикла Кребса, гликолиза и пентофосфатного цикла [Билай, 1982].

Эксперименты, проведенные с культурами *Penicillium ochrocloron* и *Aspergillus terreus*, показали, что суммарная активность дегидрогеназ, а также отдельных дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот значительно возрастает под действием ТДГ и смеси ПГИ.

Под действием ТДГ и смеси ПГИ активность всех дегидрогеназ *Penicillium ochrocloron* возрастает 2-10 и 3-3,5 раза соответственно, по сравнению с таковой в контрольных условиях (рис.10).

Аналогичные результаты получены в вариантах с использованием *Aspergillus terreus*.

Столь значительное повышение дегидрогеназной активности свидетельствует о существенных изменениях в метаболизме мицелиальных грибов и коррелирует с увеличением количества митохондрий в клетках (рис.8, стр. 58).

Каталаза и глюкозооксидаза. Значительный интерес представляет вопрос о влиянии ТДГ и ПГИ на активность таких оксидоредуктаз, как каталаза и глюкозооксидаза. Известно, что под действием многих токсических веществ в клетках происходит накопление активных форм кислорода, которые могут повреждать практически все их компоненты, включая белки, ферменты, ДНК, мембранные структуры [Shigenaga et al., 1994; Cutler, 1999].

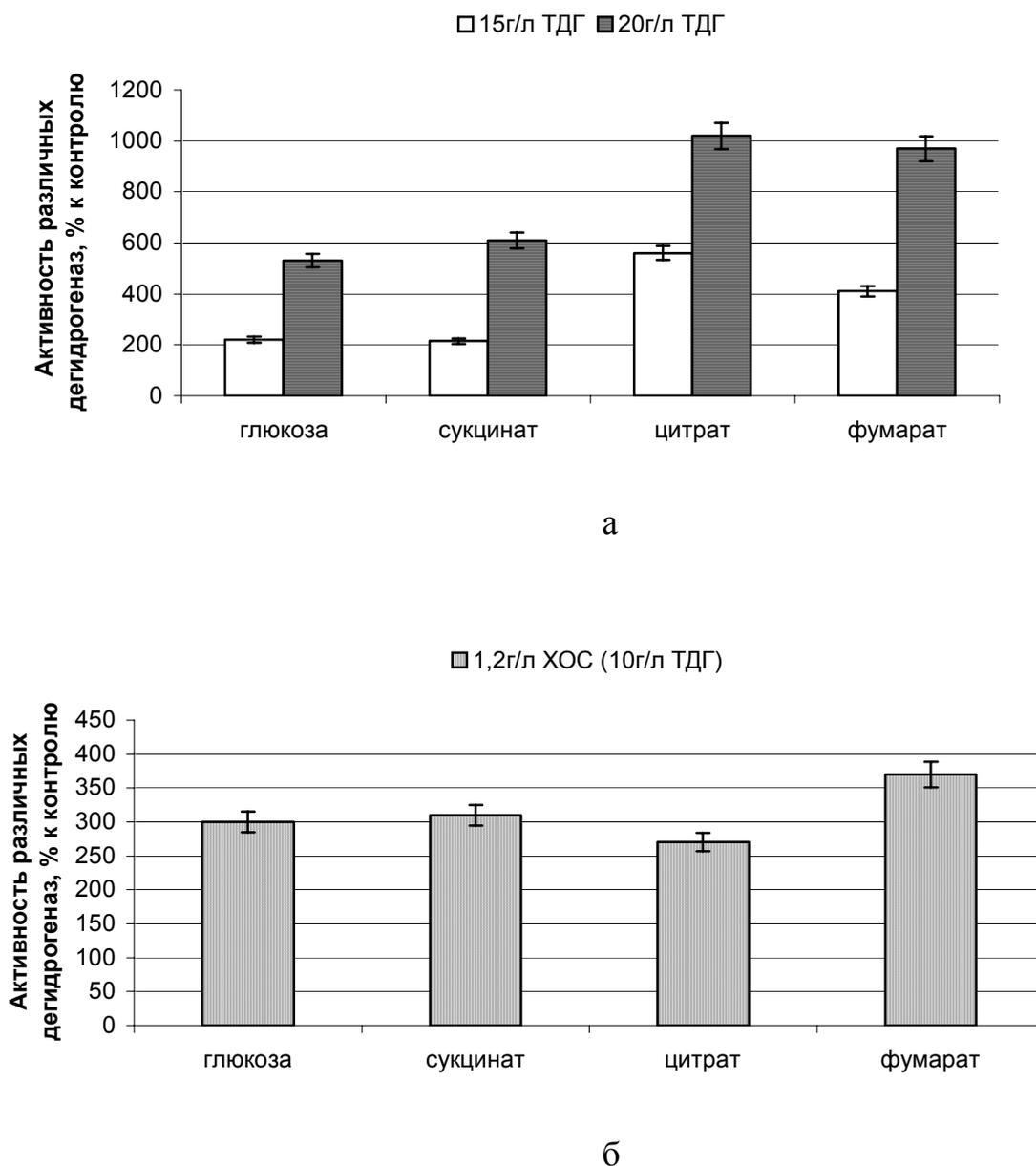


Рис.10. Влияние ТДГ (а) и смеси ПГИ (б) на дегидрогеназную активность *Penicillium ochrochloron*. Контроль 100%.

На образование активных форм кислорода указывает повышение активности компонентов антиоксидантной защиты микроорганизмов, нейтрализующих негативное действие свободных радикалов [Козлов, 1985].

Важнейшими антиоксидантами ферментной группы у микромицетов являются ферменты из класса оксидоредуктаз и, прежде всего, каталаза и глюкозооксидаза [Еремин и др., 2000; Семашко и др., 2003; Павловская и др., 2004].

Глюкозооксидаза катализирует окисление β -D-глюкозы с образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода, используя молекулярный кислород в качестве акцептора электронов [Кретович, 1986], который, как известно, является предшественником образования свободных радикалов.

Каталаза катализирует реакцию расщепления перекиси водорода и является важнейшим компонентом антиоксидантной системы клеток [Максименко, 1993].

Результаты действия ТДГ и смеси ПГИ на эти оксидоредуктазы у мицелиальных грибов представлены в таблице 5.

Как следует из данных таблицы 5, под действием продуктов гидролиза иприта, у двух культур *A. niger* и *P. funiculosum* наблюдается одновременная активация каталазы и глюкозооксидазы, у двух других - *A. terreus* и *P. ochrochloron* активность каталазы снижается при резком увеличении активности глюкозооксидазы, а у *A. versicolor* снижается активность у обоих ферментов.

Таким образом, характер действия изучаемых веществ – активация или подавление, определяется, прежде всего, свойством каждой культуры, независимо от их родовой принадлежности.

Неоднозначность результатов, полученных в данных исследованиях показана и другими авторами [Гесслер и др., 2002; Куплетская и др., 2003; Семашко и др., 2003; Lledias et al., 1998; Jamnik, Raspor, 2005], однако интерпретация их, в настоящее время, затруднена из-за недостаточной изученности механизма функционирования ферментативной системы антиоксидантной защиты в целом [Семашко и др., 2003; Scandalios, 2005].

Таблица 5

Действие ТДГ и смеси ПГИ на активность каталазы и глюкозооксидазы у микромицетов

Культуры	Концентрация ТДГ, г/л	Концентрация ПГИ, г/л ХОС	Прирост биомассы, % к контролю	каталаза		глюкозооксидаза	
				ед./мг а.с.б.	% к контролю	ед./мг а.с.б.	% к контролю
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	100	2,7±0,1	100	0,068±0,003	100
	20,0	-	68	4,1±0,2	152	0,126±0,004	186
	-	1,2	45	5,8±0,6	214	0,099±0,005	146
<i>Aspergillus terreus</i>	0	-	100	74,4±2,3	100	0,78±0,02	100
	20,0	-	75	46,2±1,7	62	1,32±0,05	169
	-	1,2	77	60,4±2,1	81	1,12±0,03	144
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	100	41,8±1,6	100	0,01±0,01	100
	10,0	-	45	15,8±0,6	38	0,0027±0,0003	27
	-	0,6	77	21,1±0,8	50	0,0026±0,0002	26
<i>Penicillium ochrochloron</i>	-	-	100	8,0±0,3	100	0,0014±0,0002	100
	20,0	-	60	2,4±0,2	30	0,003±0,001	214
	-	1,2	75	3,6±0,5	45	0,0045±0,0002	321
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	100	30,6±1,3	100	0,12±0,01	100
	20,0	-	65	44,4±1,7	145	0,22±0,02	183
	-	1,2	74	47,1±2,1	154	0,26±0,02	217

Гидролитические ферменты. Использовать природные полимеры могут лишь те микроорганизмы клетки, которых способны к синтезу соответствующих гидролитических ферментов.

Важную роль в жизнедеятельности микромицетов играет комплекс целлюлитических ферментов, с участием которых они могут использовать такой субстрат как целлюлоза (основной компонент древесины, древесного опада и растительных остатков). Это свойство мицелиальных грибов позволяет сохранять им жизнеспособность и накапливать биомассу в почвах, обедненных другими источниками углерода и энергии.

При исследовании влияния ТДГ и смеси ПГИ на комплекс целлюлолитических ферментов у грибов, было выявлено, что оба токсиканта подавляют их активность (табл. 6).

Так, под действием ТДГ в концентрации 15 г/л активность ферментов снижается в 1,7-3,5 раза, а под действием смеси ПГИ 1,8 г/л ХОС; 15 г/л ТДГ в 3-5 раз в зависимости от культуры.

Аналогичные результаты были получены и в вариантах с амилолитическими ферментами (рис.11). У всех исследованных микромицетов под действием ТДГ общая активность амилаз снижается в 1,4-4,5 раз, а под действием смеси ПГИ в 7-25 раз в зависимости от культуры.

Таблица 6

Влияние ТДГ и смеси ПГИ на комплекс целлюлаз у микромицетов.

Культуры	Концентрация ТДГ и смеси ПГИ		Прирост биомассы		Целлюлазная активность	
	ТДГ, г/л	ПГИ, г/л ХОС	Количество белка (мг/л)	% к контролю	Целлюлазная активность, ед.(ммоль/мл)	% к контролю
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	87±4	100	0,034±0,003	100
	5,0	-	85±3	98	0,023±0,001	67
	15	-	47±4	54	0,008±0,001	43
	-	0.60	82±5	94	0,015±0,002	47
	-	1.80	33±2	38	0,004±0,001	29
<i>Penicillium ochrochloron</i>	-	-	121±5	100	0,172±0,008	100
	5,0	-	117±13	96	0,163±0,006	98
	15	-	79±6	65	0,032±0,002	28
	-	0.60	105±11	87	0,065±0,003	44
	-	1.80	57±3	47	0,017±0,001	21
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	135±8	100	0,102±0,007	100
	5,0	-	102±4	76	0,053±0,004	69
	15	-	73±5	54	0,032±0,002	59
	-	0.60	95±7	70	0,044±0,002	61
	-	1.80	53±3	39	0,011±0,001	28

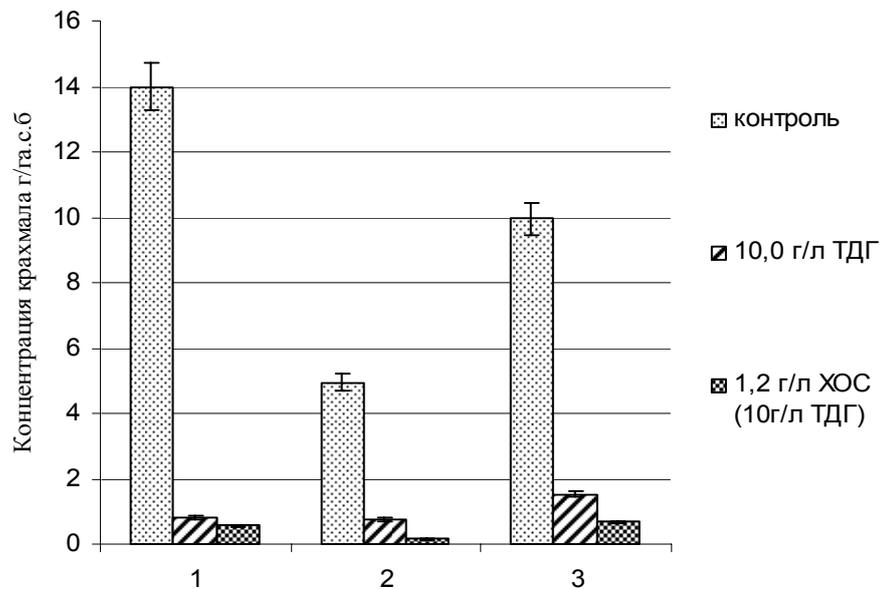


Рис. 11. Влияние ТДГ и смеси ПГИ на общую активность амилаз.

1- *Aspergillus flavus*; 2 - *Aspergillus niger*; 3 - *Penicillium funiculosum*.

3.2.3.2. Влияние продуктов гидролиза иприта на образование пигментов и полисахаридов

Способность микромицетов сохранять жизнеспособность при экстремальных воздействиях, в значительной степени связана с образованием ими пигментов, главным образом меланинов. Барьерная функция этих пигментов связана с особенностями их физико-химических свойств и локализацией в поверхностных структурах, на границе организма с внешней средой [Лях, 1981].

Другими полимерами, синтезируемыми микромицетами в значительных количествах, являются полисахариды, одной из многочисленных функций которых также является защитная, способствующая выживанию грибов в экстремальных условиях [Гречушкина, 1989; Медведева и др. 1996].

Учитывая повышенную чувствительность мицелиальных грибов к ПГИ, можно предположить, что ТДГ и смесь ПГИ будут оказывать стимулирующее действие на процессы образования пигментов и полисахаридов у этих микроорганизмов.

Результаты, представленные в таблицах 7 и 8 подтверждают это предположение. Под действием изучаемых ксенобиотиков продуктивность биомассы грибов, как по пигментам, так и по полисахаридам резко возрастает.

Полученные результаты свидетельствуют о негативном и неспецифическом действии ТДГ и смеси ПГИ на микромицеты и подтверждают положение о протекторной функции пигментов и полисахаридов.

Таким образом, действие ТДГ и смеси ПГИ на микромицеты многообразно и касается как морфолого-культуральных, так и физиолого-биохимических признаков. Характер их воздействия, в принципе, однотипный, однако наибольшую чувствительность они проявляют к смеси ПГИ, что, очевидно, связано с содержанием в ее составе хлорорганических соединений.

Таблица 7

Влияние ТДГ и смеси ПГИ на образование пигментов у микромицетов

Культуры	Концентрация		Прирост биомассы, % к контролю	Пигменты	
	ТДГ, г/л	смесь ПГИ, г/л		мг пигм. /г а.с.б.	% к контролю
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	100	183±11	100
	20,0	-	35	209±15	114
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	53	447±22	244
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	100	33±2	100
	10,0	-	69	78±7	237
	-	ХОС - 1,2, ТДГ - 10	77	85±8	256
<i>Penicillium ochrochloron</i>	-	-	100	94±10	100
	20,0	-	60	140±16	149
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	55	150±18	159
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	100	78±5	100
	20,0	-	56	232±14	297
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	80	184±17	236

На данный момент, определить основной или какой-либо конкретный механизм ингибирующего действия ТДГ и смеси ПГИ на рост мицелиальных грибов не представляется возможным в связи с недостаточной изученностью этого вопроса. Однако не исключено, что оно является итогом всех вышеуказанных воздействий.

Таблица 8

Действие ТДГ и смеси ПГИ на синтез экзополисахаридов у микромицетов

Культуры	Концентрация		Прирост биомассы, % к контролю	Экзополисахариды	
	ТДГ, г/л	смесь ПГИ, г/л		мг полисах. /г а.с.б.	% к контролю
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	100	29±3	100
	20,0	-	25	73±5	250
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	40	68±4	235
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	100	162±10	100
	10,0	-	56	422±13	261
	-	ХОС - 1,2, ТДГ - 10	70	285±9	176
<i>Penicillium ochrochloron</i>	-	-	100	16±2	100
	20,0	-	60	28±3	175
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	95	64±5	400
<i>Penicillium funiculosum</i>	-	-	100	171±12	100
	20,0	-	80	342±9	200
	-	ХОС - 1,8, ТДГ - 15	70	547±14	320

Учитывая, что наибольшую устойчивость к ТДГ и смеси продуктов гидролиза иприта, а также способность к их деструкции проявляют бактерии, нами проведена работа по поиску и выделению из почв высокоактивного деструктора этих загрязнителей именно из этой группы микроорганизмов.

Глава 4

Выделение и отбор бактериальных культур-деструкторов продуктов гидролиза иприта

4.1. Выделение и отбор высокоактивных деструкторов продуктов гидролиза иприта

Бактерии, способные использовать ПГИ в качестве единственного источника углерода и энергии выделяли из почв различных регионов России - Ленинградской, Московской, Самарской областей, в Сибири и Якутии.

В почвенные образцы вносили смесь ПГИ из расчета 0,30 г ХОС/кг почвы и инкубировали в течение 20 суток при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$, с периодическим поддержанием влажности на уровне 60% от полной влагоемкости почвы.

Через 20 суток из приготовленных таким образом почвенных компостов высевом на среду № 1 было выделено 210 бактериальных культур, способных к росту в присутствии ПГИ. Первичный отбор из их числа культур-деструкторов ПГИ проводили путем посева изолированных бактерий на агаризованную среду № 1а, содержащую в качестве источника углерода смесь ПГИ в концентрации $0,080 \pm 0,006$ г/л ХОС; $0,72 \pm 0,04$ г/л ТДГ. Как показали результаты, только 89 культур проявили способность к росту на этом субстрате.

На следующем этапе отбора, в условиях поверхностного роста на агаризованной среде, содержащей 2,0 г/л ТДГ, эти культуры были проверены на способность окислять ТДГ. Определение проводили визуально по просветлению среды в результате растворения карбоната кальция в зоне роста колоний. Процесс растворения кальция осуществлялся за счет кислот, образующихся при окислении ТДГ.

По этому критерию были отобраны 27 бактериальных культур, которые подвергли сравнительной оценке по активности и степени потребления ТДГ при глубинном культивировании в среде содержащей ПГИ в концентрации $0,78 \pm 0,04$ г/л; $7,0 \pm 0,2$ г/л ТДГ (таблица 9).

Таблица 9
Степень потребления ТДГ отобранными штаммами бактерий при глубинном культивировании в течение 7 суток

№	Культура Контроль (исходная среда)	Содержание ТДГ в культуральной жидкости	
		г/л	Степень потребления, %
		7,0	4,3
1	Bact.sp.Y – 2-1	1,3	81,4
2	Bact.sp.Y – 6-2	1,5	86,0
3	Bact.sp.Y – 8-2	1,7	75,7
4	Bact.sp.Y – 13-1	0,01	100,0
5	Bact.sp.Y – 14-2	2,19	67,1
6	Bact.sp.Y – 16-5	1,1	83,5
7	Bact.sp.Y – 17-2	1,05	84,2
8	Bact.sp.Y – 17-4	2,61	60,8
9	Bact.sp.Y – 18-2	1,05	15,8
10	Bact.sp.Y – K1,2	2,91	56,2
11	Bact.sp.Y – 19-2	0,5	92,5
12	Bact.sp.Y – 19-4	0,7	89,5
13	Bact.sp.Y – 19-8	0,6	91,0
14	Bact.sp.Y – 20-1	0,8	88,0
15	Bact.sp.Y – 20-3	0,7	89,5
16	Bact.sp.Y – 20-5	0,6	91,0
17	Bact.sp.Y – 21-1	1,3	70,4
18	Bact.sp.Y – 21-2	5,5	17,3
19	Bact.sp.Y – 21-6	0,4	94,0
20	Bact.sp.Y – 22-6	1,31	79,9
21	Bact.sp.Y – 22-8	1,22	85,8
22	Bact.sp.Y – 22-9	1,33	79,6
23	Bact.sp.Y – 22-10	1,09	83,3
24	Bact.sp.Y – 23-2	3,62	44,4
25	Bact.sp.Y – 28-1	1,32	79,7
26	Bact.sp.Y – 28-3	1,04	84,0
27	Bact.sp.Y – 28-10	1,15	82,3

Как показали данные ВЭЖХ, представленные в таблице 9, все 27 культур обладают свойством потреблять ТДГ в составе смеси ПГИ. Степень потребления достаточно высока и варьирует от 60 до 100%, в зависимости от

культуры. Исключение составляет *Bacterium* sp.Y-18, степень потребления ТДГ, у которой не превышает 16%.

Для последующих исследований выбрана культура *Bacterium* sp.Y – 13-1, полностью (100%) потребляющая ТДГ из питательной среды.

Культуру выращивали и хранили на агаризованной среде №1а, с добавлением (г/л): глюкозы – 5,0, дрожжевого экстракта – 2,0, агара – 20, смеси ПГИ - $0,015 \pm 0,001$ г/л ХОС; $0,14 \pm 0,01$ г/л ТДГ, рН – 7,0. Периодичность посева 1 месяц.

Для более длительного хранения культуру, выросшую в пробирках, заливали вазелиновым маслом и помещали в холодильник при +4°C. Периодичность посевов в этом варианте - 1 год.

Основным способом длительного хранения культуры выбран способ хранения в лиофильно высушенном состоянии.

Для осуществления процесса лиофильного высушивания культуры предварительно готовили защитную среду следующего состава (% масс.): желатина – 1,0, сахароза – 10,0, вода дистиллированная – до 100 мл., и стерилизовали при 0,5 атм. в течение 20 мин. Защитную среду разливали в стерильные пенициллиновые флаконы по 5 мл. В защитной среде готовили суспензии бактериальных клеток с титром – 10^9 – 10^{10} кл/мл. и лиофильно высушивали на сушилке камерного типа ТГ-50 фирмы «HVD HochVakuumTechnik» (Германия).

Условия лиофилизации: материал замораживается на полке установки до глубины -25°C - 29°C со скоростью 2-3°C/мин. Время замораживания – 120 мин. Материал высушивается при рабочем вакууме 120-130 мкм рт.ст., конечный вакуум – 50 мкм рт.ст. Общее время высушивания составляет 48 часов.

При таком способе хранения культура сохраняла свойство к деградации ПГИ за проверяемый период - 2 года.

4.2. Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки выделенной культуры

Морфологические признаки. Электронно-микроскопические исследования показали, что клетки отобранной культуры имеют форму палочек с заостренными концами и со жгутиками, расположенными латерально.

Длина клеток в среднем составляла 1,1 мкм, ширина 0,5 мкм, спор и капсулы не образует. Расположение клеток одиночное, редко парами.

Культуральные признаки. На мясо-пептонной агаризованной среде через 48 часов роста при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ культура образует круглые, выпуклые колонии с ровными краями диаметром 3-4 мм. Колонии бесцветные с гладкой поверхностью, блестящие. По Граму окрашиваются отрицательно.

Физиолого-биохимические признаки.

Культура является строгим аэробом, растет при температуре от $+10^\circ\text{C}$ до $+37^\circ\text{C}$, температурный оптимум $+24^\circ\text{C}$ - $+28^\circ\text{C}$. Интервал рН при котором наблюдался рост культуры - от 5,0 до 9,0, оптимум 7,0 – 9,0. Интенсивный рост наблюдается на богатых питательных средах - МПБ, ферментативном гидролизате рыбной муки (ФГРМ) и др. Из неорганических источников азота использует аммонийные соли.

В качестве источников углерода изучаемая культура использует глюкозу, галактозу, маннозу, сахарозу, лактозу, арабинозу, рамнозу, маннит, фруктозу, сорбит, инозит. При росте на среде с глюкозой, галактозой, маннозой, лактозой, фруктозой, сорбитом, инозитом образует кислоты. Индол и сероводород не образует, желатину, крахмал, казеин не гидролизует. Культура осуществляет процесс денитрификации, каталазоположительна.

По совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков культура, согласно определителю Берги [Holt et al., 1995], была отнесена к роду *Pseudomonas* и обозначена как *Pseudomonas* sp. Y-13.

4.3. Определение патогенности культуры

Pseudomonas sp. Y-13

Оценку безопасности культуры для теплокровных животных проводили на базе виварного комплекса НИЦ ТБП на лабораторных линиях беспородных белых мышей массой 16–18 г и белых крыс массой 160-180 г. по общепринятым методикам [Лабинская и др. 2004] .

Изучение патогенных свойств выделенного штамма проводили в соответствии с международными требованиями, по следующим показателям: среднесмертельная доза (LD_{50}) исследуемых штаммов, токсичность исследуемых штаммов, токсигенность исследуемых штаммов, диссеминация штаммов во внутренних органах экспериментальных животных.

Результаты данной оценки представлены в таблице 10.

Таблица 10

Изучение патогенности культуры *Pseudomonas* sp. Y-13

№ штамма	Вирулентность	Токсичность	Токсигенность	Диссеминация
<i>Pseudomonas</i> sp. Y-13	не вирулентен $LD_{50} > 10^8$ клеток	не токсичен	не токсигенен	нет диссеминации

Таким образом, в результате проведенных токсикологических исследований, установлено отсутствие патогенных свойств у культуры *Pseudomonas* sp. Y-13, по всем показателям. Эти свойства культуры свидетельствуют о перспективности и целесообразности изучения ее как возможного средства для биологической детоксикации ПГИ в природных экосистемах – почвах, водоемах.

Оценку фитотоксичности *Pseudomonas* sp. Y-13 осуществляли по методу Берестецкого [Берестецкий, 1971]. Для оценки степени токсичности использовали суспензии *Pseudomonas* sp. Y-13 с титром $0,9 \cdot 10^8$ - 10^9 КОЕ/мл.

Семена тест-культуры (редис) замачивали в исследуемых бактериальных суспензиях в течении 24 часов и проращивали в течении 4 суток на

фильтровальной бумаге, пропитанной равным количеством воды, при постоянной температуре. В качестве контроля использовали семена редиса, замоченные в жидкой среде ФГРМ.

Таблица 11

Оценка фитотоксичности *Pseudomonas* sp. Y-13 для семян редиса

Вариант	Титр, КОЕ/мл	Среднее количество проросших семян		Средняя длина проростков		Средняя масса проростков	
		штук	% к контролю	мм	% к контролю	г	% к контролю
<i>Pseudomonas</i> sp. Y-13	$0,9 \cdot 10^9$	47	100	51,0±1,1	131	1,79±0,07	92
	$0,9 \cdot 10^8$	49	104	55,1±1,3	142	2,00±0,08	103
Питательная среда (контроль)		47	100	38,9±1,0	100	1,95±0,05	100

Наличие в испытуемом образце фитотоксинов определяли по ростовым эффектам: процент проростания семян, длина и масса проростков.

Из результатов, представленных в таблице 11 видно, что микроорганизмы не оказывали отрицательного действия на проростки редиса. Всхожесть семян редиса, замоченных в суспензиях микроорганизмов, не отличается от всхожести контрольных семян.

Глава 5.

Изучение процесса деструкции и потребления продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas* sp. Y-13

5.1. Влияние условий культивирования на деструкцию и потребление продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas* sp. Y-13

При выборе культуры, способной окислять ПГИ, исследования проводили на «бедной» минеральной среде № 1, в которой единственным углеродосодержащим компонентом были ПГИ или ТДГ. Использование такой обедненной среды обусловлено тем, что в этом варианте можно с большей точностью определять промежуточные и конечные продукты биодеструкции.

С другой стороны, хорошо известно, что кроме состава питательной среды на эффективность микробиологических процессов оказывают влияние и другие условия культивирования – pH среды, температура, аэрация и др., а в данном случае и концентрация ПГИ.

В настоящей работе исследовалось влияние этих важнейших физико-химических условий на процесс детоксикации ПГИ под действием отобранной культуры *Pseudomonas* sp. Y-13.

Влияние температуры. Для решения этого вопроса культуру выращивали в жидкой питательной среде № 1, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии смесь ПГИ в количестве $0,78 \pm 0,04$ г/л ХОС; $7,0 \pm 0,2$ г/л ТДГ. Культивирование проводили в колбах емкостью 250 мл, в статических условиях, при температуре от $+4^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ до $+37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Прирост биомассы определяли по оптической плотности (OD) на КФК-3 при $\lambda=540\text{nm}$. Свойство потреблять ПГИ определяли по убыли из среды основного продукта – ТДГ. В качестве контроля использовали среду № 1 без микроорганизмов. Результаты исследования представлены в таблице 12.

Таблица 12

Влияние температуры на рост и потребление ТДГ культурой
Pseudomonas sp. Y-13 (7 суток культивирования)

Температура, °С	Прирост биомассы, ОD при $\lambda=540\text{нм}$	Содержание ТДГ в среде	
		г/л	% к исх.
+ 4	0,05±0,01	6,2±0,1	88
+ 10	0,17±0,02	5,5±0,5	78
+ 18-20	0,86±0,03	3,1±0,3	44
+ 24	1,38±0,04	0,014±0,003	0,02
+28	1,43±0,02	0,007±0,001	0,01
+32	1,08±0,02	0,007±0,001	0,01
+37	0,82±0,01	0,098±0,002	0,14

Как следует из данных таблицы 12, наиболее благоприятными, при указанных условиях культивирования, для роста и потребления субстрата является температурный интервал от +24°С до + 32°С, при этом наблюдается наибольший прирост биомассы и максимальное потребление ТДГ (на 99,9% от исходного). Снижение (от +20°С до +4°С) и повышение (до +37°С) температуры приводит к снижению прироста бактериальной биомассы и степени потребления ТДГ.

Влияние аэрации. Влияние аэрации на рост культуры *Pseudomonas* sp. Y-13 и потребление ТДГ изучали на той же среде, с той же концентрацией ПГИ, что и в варианте по влиянию температуры.

Различные уровни аэрации создавали, варьируя объем среды в колбах: 20мл, 50мл, 100мл, 120мл. Скорость растворения кислорода, оцениваемая по сульфитному числу, составляла 1,3; 1,2; 0,8; 0,7 гО₂/л.ч. соответственно. Результаты эксперимента представлены в таблице 13.

Влияние уровня аэрации на рост и потребление ТДГ культурой
Pseudomonas sp. Y-13 (7 суток культивирования)

Аэрация		Прирост биомассы, OD при $\lambda=540\text{nm}$	Содержание ТДГ в к/ж, % к контролю
Объем среды в колбах, мл	Сульфитное число, гO ₂ /л.ч.		
20	1,2	1,59±0,08	24%
50	0,71	2,52±0,12	0
100	0,56	2,08±0,11	15%
120	0,26	1,70±0,12	19%

Из представленных в таблице 13 данных следует, что аэрация оказывает влияние и на рост бактерий и на процесс деструкции ТДГ. Наиболее благоприятный уровень этого фактора для обоих процессов находится на уровне 0,71 гO₂/л.ч.

Влияние рН среды. Для изучения влияния уровня рН питательной среды на процессы роста и потребления ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13, в среде культивирования создавали различные уровни рН: от 5,0 до 10,0. Культивирование проводили в описанных выше условиях. В варианты с рН 7,0 – 10,0 дополнительно вносили CaCO₃ для нейтрализации образующихся в результате деструкции ТДГ кислых продуктов и поддержания заданного уровня рН. Контроль уровня рН проводили каждые 6-12 часов культивирования и в случае необходимости регулировали 1N раствором NaOH.

Кривые роста культуры и потребления ТДГ при разных уровнях рН представлены на рис. 12, 13.

Как следует из рис. 12 *Pseudomonas* sp. Y-13 способна к росту в широком интервале значений рН: 5,0 – 9,0. Однако наибольший прирост биомассы наблюдался при значениях рН в интервале 7,0 – 9,0. Снижение уровня рН до 5,0 – 6,0 или повышение до 10,0 приводят к ухудшению ростовых показателей процесса.

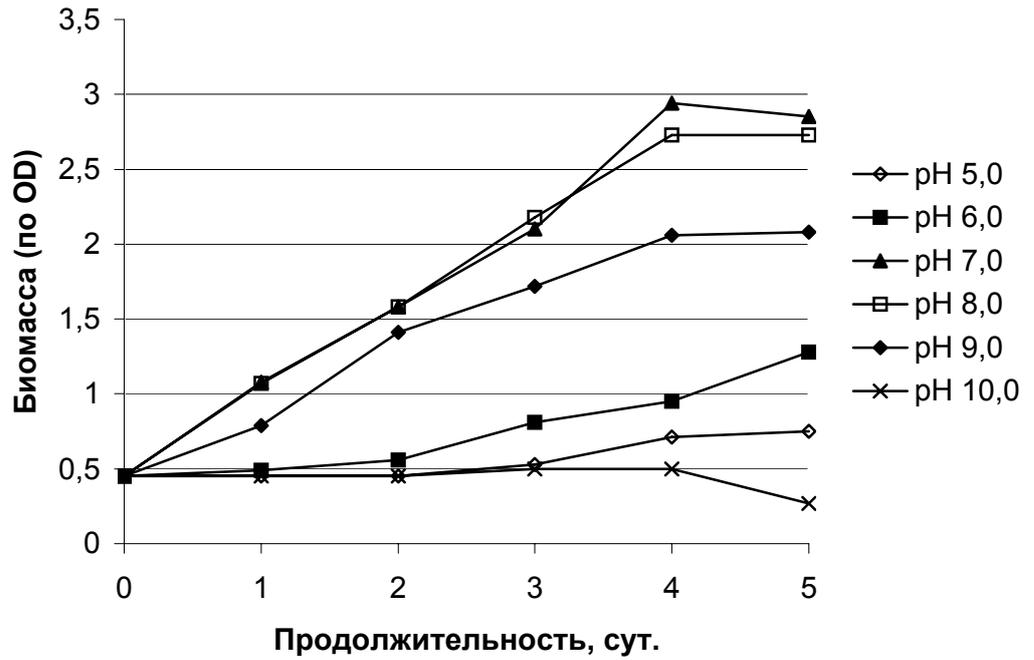


Рис. 12. Прирост биомассы *Pseudomonas* sp. Y-13, при разных уровнях pH среды.

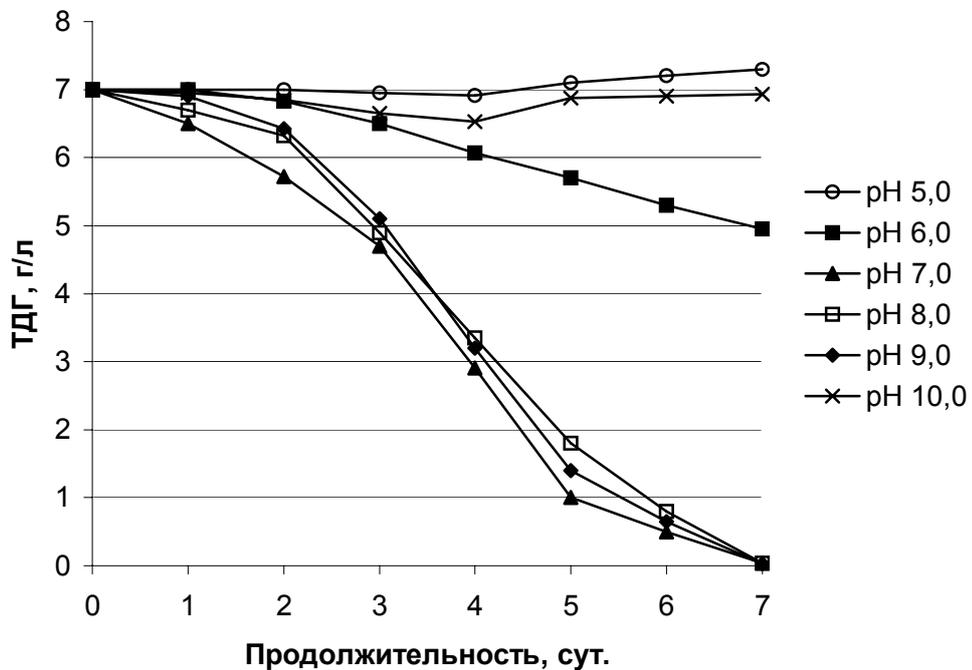


Рис. 13. Потребление ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13, при разных значениях pH среды.

Из данных, представленных на рис. 13, видно, что при рН 5,0 и 10,0 потребления ТДГ практически не происходит. Наиболее эффективно этот процесс осуществляется при уровне рН в интервале от 7,0 до 9,0.

Исходя из полученных данных, все последующие исследования были проведены в условиях глубинного культивирования на роторной качалке ($n=230$ об/мин), при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ в колбах емкостью 250 мл в жидкой питательной среде № 1 объемом 50 мл (рН среды $7,0\pm 0,02$), содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии смесь ПГИ. Концентрацию смеси ПГИ подбирали в зависимость от цели эксперимента.

Зависимость скорости биодеструкции от концентрации в среде смеси продуктов гидролиза иприта. Скорость микробиологических процессов в значительной степени определяется усвояемостью и концентрацией питательного субстрата. Эта зависимость в наибольшей степени проявляется на труднодоступных и, тем более, на токсичных субстратах, какими являются продукты гидролиза иприта.

Результаты, полученные при культивировании выделенной культуры на среде со смесью ПГИ, показали, что с увеличением концентрации этого субстрата продолжительность процесса, в котором ТДГ подвергается полной деструкции (таблица 14), возрастает с 3-х до 22 суток.

Рост микроорганизмов на средах, содержащих субстраты-яды, подчиняются, в целом, тем же закономерностям, что и рост на нетоксичных субстратах, однако имеет некоторые особенности.

Так, под действием субстратов-ядов ингибирующее действие в большинстве случаев начинает проявляться задолго до того, как будет достигнута максимальная скорость роста при возрастании концентрации субстрата. Если его концентрация ниже критической (критическая концентрация субстрата-яда считается та, при которой наблюдается максимальная скорость роста), рост культуры устойчивый, если выше – рост

становится нестабильным и сопровождается постепенным отмиранием клеток [Карасевич, 1975].

Таблица 14

Влияние концентрации ПГИ на степень потребления ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13

Содержание компонентов ПГИ в питательной среде, г/л	Продолжительность культивирования, сутки	Степень потребления ТДГ, % к исходному
ХОС - 0,15 ТДГ - 1,2	2	82
	3	100
ХОС - 0,38 ТДГ - 3,7	2	27
	4	79
	6	100
ХОС - 0,75 ТДГ - 6,9	3	44
	6	89
	7	90
	9	100
ХОС - 1,50 ТДГ - 13,4	4	40
	7	70
	11	91
	14	100
ХОС - 2,30 ТДГ - 20,0	7	30
	11	64
	17	68
	22	100
ХОС - 2,70 ТДГ - 24,4	14	7

На основании данных, полученных при определении динамики роста изучаемой культуры на средах, содержащих ПГИ в различных концентрациях (см. таблицу 14), был рассчитан уровень удельной скорости роста для каждого варианта, представленный на рисунке 14.

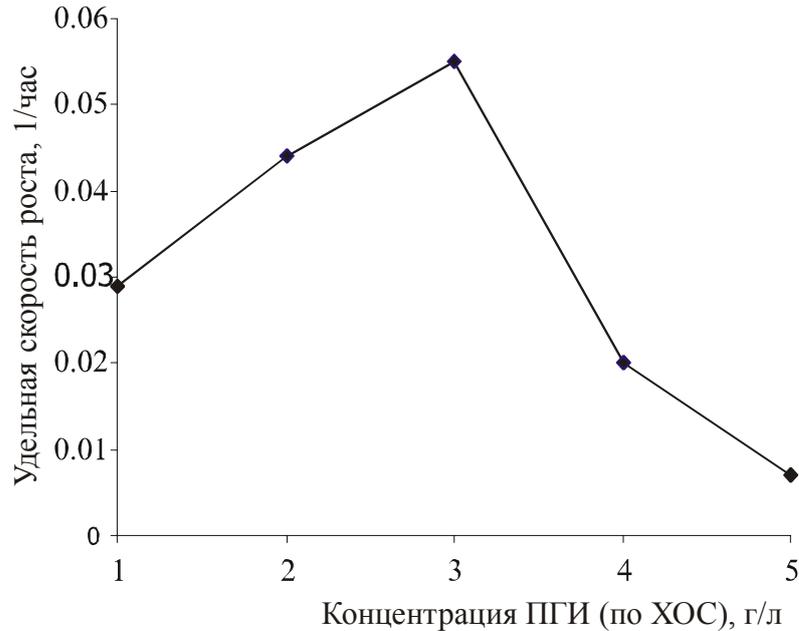


Рис. 14. Зависимость удельной скорости роста *Pseudomonas* sp. Y – 13 от концентрации ПГИ в среде: 1 – 0,15 г ХОС/л и 1,2 г ТДГ/л; 2 – 0,38 г ХОС/л и 3,7 г ТДГ/л; 3 – 0,75 г ХОС/л и 6,9 г ТДГ/л; 4 – 1,5 г ХОС/л и 13,4 г ТДГ/л; 5 – 2,3 г ХОС/л и 20 г ТДГ/л.

На кривой удельной скорости роста (отношение прироста биомассы к общей массе в единицу времени) отсутствует плато, когда скорость роста не зависит от концентрации субстрата.

Наблюдаемый пик максимальной скорости роста соответствует критической концентрации субстрата (0,075 г/л ХОС; 6,9 г/л ТДГ), что характерно для роста микроорганизмов на субстратах – ядах [Карасевич, 1975].

Динамика процессов роста бактерий и потребления ими ТДГ, а также процесса дехлорирования ПГИ в среде культивирования изучали с использованием среды, содержащей те максимальные количества этих субстратов, при которых происходит полное потребление ТДГ (2,3 г/л ХОС; 20 г/л ТДГ). Результаты этих наблюдений представлены на рисунке 15, из графиков которого следует, что рост культуры завершается через 13-14 суток, а

полное исчезновение из среды ХОС и ТДГ наблюдается через 22 дня от начала культивирования.

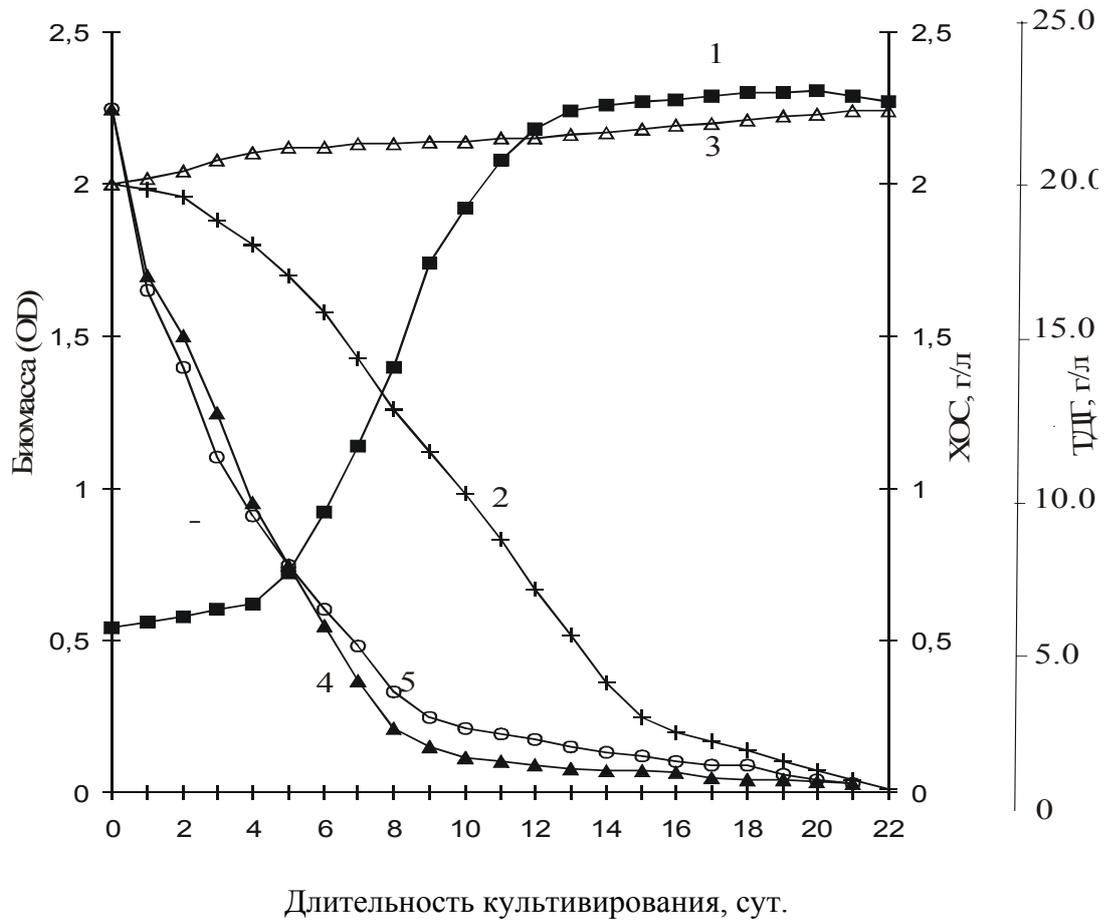


Рис. 15. Динамика роста и деструкции ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13, а также дехлорирование ХОС в среде, содержащей ПГИ 2,3 г ХОС/л и 20,0 г ТДГ/л: 1 - рост культуры; 2 – потребление ТДГ в опытном варианте (с культурой); 3 – содержание ТДГ в контроле; 4 – дехлорирование ХОС в опыте; 5 – дехлорирование ХОС в контроле. Контроль – среда без бактерий.

Что касается содержания ТДГ, то в контрольном варианте оно несколько возрастает за счет химического гидролиза ХОС, тогда как в опытном варианте, в присутствии микроорганизмов, количество ТДГ уменьшается и на 22 сутки культивирования ТДГ полностью потребляется культурой. Рост бактерий коррелирует с убылью ТДГ. Максимальное потребление ТДГ (75% от исходного количества) происходит в период активного роста *Pseudomonas* sp. Y-13 (в экспоненциальной фазе).

Длительность лаг-фазы – 4 суток, очевидно, вызвана неблагоприятным воздействием на культуру ПГИ и, прежде всего, ХОС. Это предположение подтверждается тем, что переход культуры в экспоненциальную фазу начинается только после того, как количество ХОС снижается в среднем на 40% (рис. 15).

Анализ динамики дехлорирования ХОС показал, что этот процесс сопровождается выделением стехиометрического количества хлора в среду.

В контрольном варианте (без бактерий) динамика химического гидролиза практически полностью совпадает с динамикой убыли ХОС в опытном варианте, что позволяет сделать вывод о неферментативной, небиологической природе дехлорирования ХОС.

5.2. Образование и потребление промежуточных продуктов деструкции тиодигликоля культурой *Pseudomonas* sp. Y-13

На первом этапе изучение путей окисления основного продукта гидролиза иприта – ТДГ выделенной культурой проводили посредством анализа промежуточных продуктов, образующихся в процессе роста на жидких средах, содержащих в качестве единственного источника углерода ПГИ.

Анализ культуральной жидкости проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. В течение всего периода культивирования (за исключением первых суток) в качестве промежуточного продукта деградации ТДГ была идентифицирована тиодигликолевая кислота (ТДГК) (рис. 16).

Максимальное количество ТДГК в культуральной жидкости практически коррелирует с полным потреблением ТДГ.

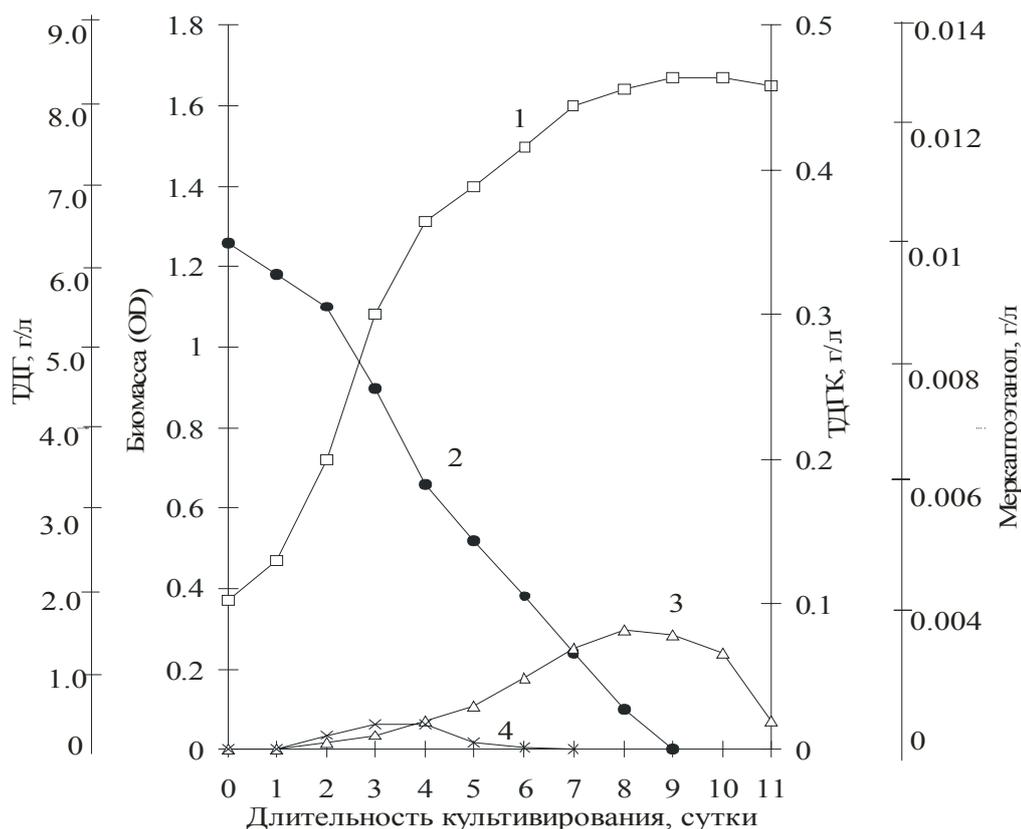


Рис. 16. Динамика роста (1), деструкции ТДГ (2), накопления ТДГК (3) и меркаптоэтанола (4) культурой *Pseudomonas* sp. Y – 13.

Образование ТДГК позволяет предположить, что биодеструкция ТДГ начинается с окисления его первичных спиртовых групп. Ранее сообщалось, что окисление молекулы ТДГ до ТДГК может осуществляться алкогольдегидрогеназой [Lee et. al., 2000].

Кроме ТДГК при росте бактерий в среде с ПГИ в культуральной жидкости впервые обнаружено невысокое, но возрастающее в течение экспоненциальной фазы роста, количество β -меркаптоэтанола (МЭ) (10^{-5} - 10^{-4} % масс.), которое затем постепенно снижается и полностью исчезает на 7-е сутки культивирования (рис. 16).

Далее были проведены эксперименты, с целью определить, используется ли ТДГК и МЭ бактериями в качестве источников углерода. Каждое соединение исследовали отдельно.

В ферментационную среду добавляли ТДГК в концентрации от 1,8 до 60,0 г/л, в качестве единственного источника углерода. Как показали результаты, прирост биомассы наблюдался при содержании ТДГК в концентрации от 1,8 до 50,0 г/л, последующее увеличение концентрации до 60,0 г/л вызывает ингибирование роста культуры. Динамика роста культуры *Pseudomonas* sp. Y – 13 и потребление ТДГК в концентрации 1,8 - 8,2 г/л представлена на рисунке 17.

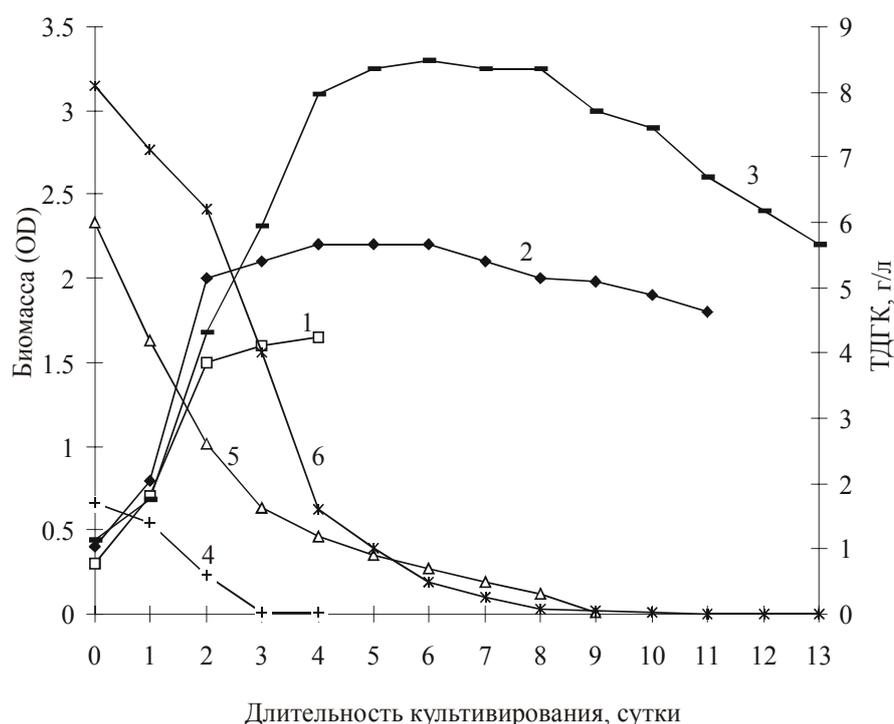


Рис. 17. Динамика роста и потребления ТДГК культурой *Pseudomonas* sp. Y-13, на среде с различным содержанием ТДГК.

Прирост биомассы на среде, содержащей ТДГК (г/л): 1 – 1,8; 2 – 6,0; 3 – 8,2;

Потребление ТДГК при концентрациях (г/л): 4 – 1,8; 5 – 6,0; 6 – 8,2.

Как следует из полученных данных, выделенная культура бактерий использует ТДГК в качестве источника углерода, при этом прирост биомассы тем больше, чем выше концентрация кислоты. Потребление субстрата идет с наибольшей активностью в период экспоненциальной фазы роста.

При исследовании продуктов, образующихся при росте бактерий на среде с ТДГК, в культуральной жидкости обнаружены тиогликолевая кислота (ТГК) и ацетат, что свидетельствует о разрыве достаточно прочной (энергия связи 64 ккал/моль) C-S связи в ТДГК, что и приводит к образованию этих продуктов.

Обнаруженная в качестве продукта деградации ТГК, также как и ТДГК, используется *Pseudomonas* sp. Y-13 в качестве источника углерода для роста (рис.18), при этом, в качестве промежуточного продукта ее деградации в культуральной жидкости определена уксусная кислота.

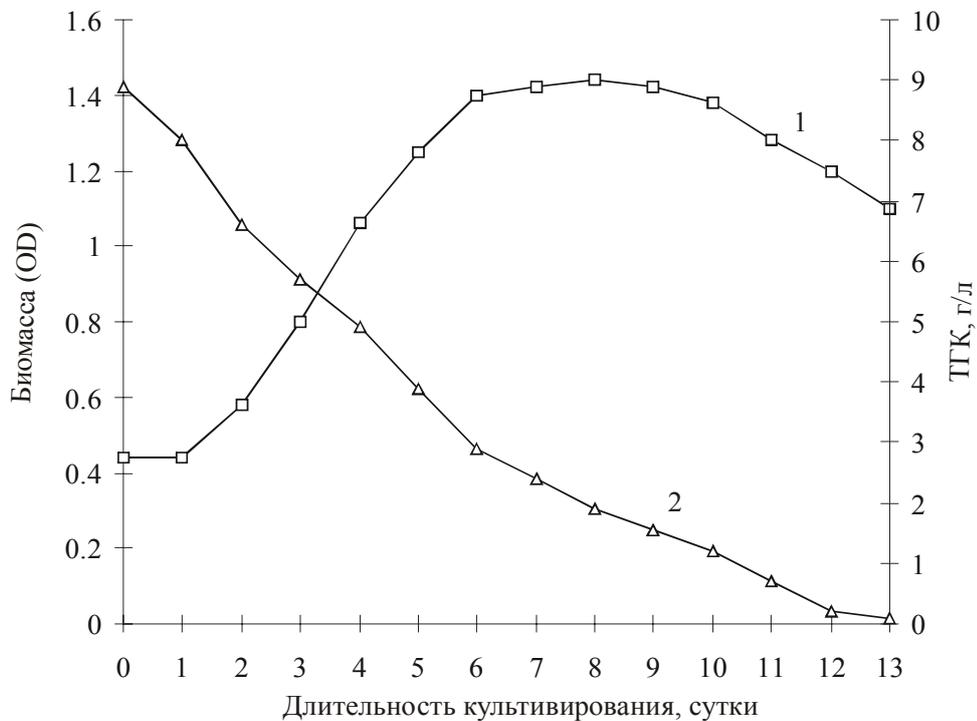


Рис. 18. Динамика роста и потребления ТГК культурой *Pseudomonas* sp. Y-13.

Однако, наибольшая удельная скорость роста *Pseudomonas* sp. Y-13 наблюдается на среде с ацетатом Na (табл.15).

Удельная скорость роста *Pseudomonas* sp. Y – 13 на средах, содержащих различные источники углерода.

Источник углерода	Концентрация субстрата, %	μ , 1/ч	Прирост биомассы, г а.с.б./г вл.б.
ТДГК	0,80	0,04	0,13
ТГК	0,81	0,05	0,14
Ацетат Na	0,75	0,17	0,26

Меркаптоэтанол (МЭ) в концентрации 1×10^{-2} % не используется в качестве источника углерода для роста бактерий, но при этом и не снижает титр жизнеспособных клеток. При более высокой концентрации МЭ культура интенсивно лизируется. Однако был выявлен интересный факт, свидетельствующий о способности интактных клеток *Pseudomonas* sp. Y – 13 осуществлять трансформацию МЭ в ТГК (рис. 19).

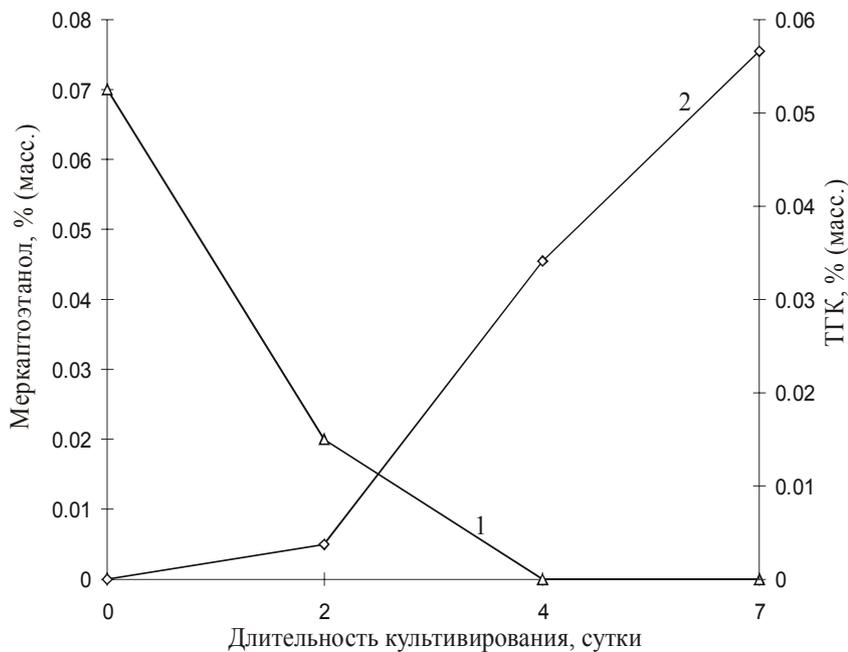
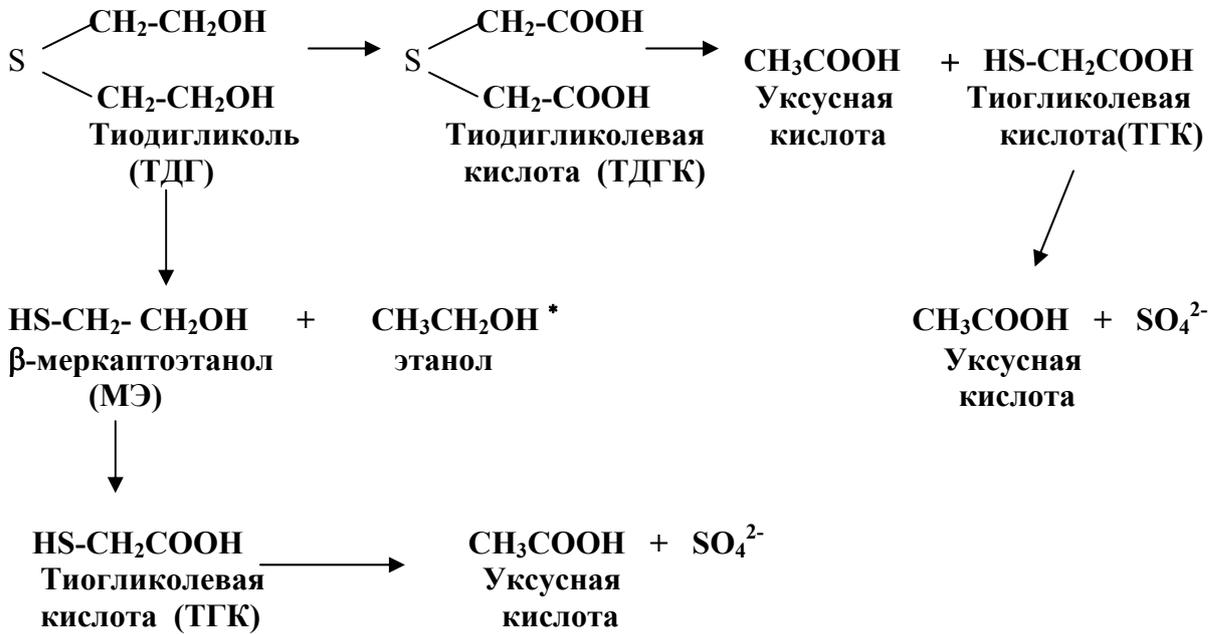


Рис. 19. Динамика трансформации МЭ (1) и образования ТГК (2) неразмножающимися (интактными) клетками *Pseudomonas* sp. Y-13.

На основании полученных результатов, схема метаболизма основного продукта гидролиза иприта – ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13 может быть представлена следующим образом:



* - не определяли

Таким образом, показано, что основным путем деструкции ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13 является окисление его первичных спиртовых групп с образованием ТДГК и ТГК, последующая трансформация которых сопровождается образованием ацетата. По этому свойству выделенная культура сходна с другим культурам – *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans* (SH 91) [Lee et. al., 2000], *Alcaligenes xylosoxydans* subs. *denitrificans* [Ермакова и др., 2002], *Pseudomonas* sp. Y-8-2 [Медведева и др., 2000], окисляющим ТДГ до соответствующих кислот. Однако впервые в продуктах трансформации ТДГ культурой *Pseudomonas* sp. Y-13 обнаружен β-меркаптоэтанол.

Полученные данные позволяют представить два пути, по которым может происходить биодеструкция ТДГ: с образованием ТДГК и ТГК и с образованием β-меркаптоэтанола, который также трансформируется в ТГК.

Глава 6.

**Деструкция смеси продуктов гидролиза иприта культурой
Pseudomonas sp. Y-13 в почвенных образцах**

Поскольку поиск и выделение культуры-деструктора проводили с целью ее возможного использования для очистки почв от ПГИ, особый интерес представлял вопрос о характере и активности воздействия *Pseudomonas sp. Y-13* на эти загрязнители в условиях почвы.

Эксперименты проводили с использованием образцов верхних горизонтов серой лесной почвы (Московская обл., г. Серпухов) Агрехимический состав исследованной почвы определяли по стандартным методикам [Аринушкина, 1970] Данные анализа показали следующие характеристики: рН почвы 7,0; количество гумуса 3,6%; общее количество углерода 2,09%; отношение С:N – 11; сумма обменных оснований составила 14,2 мг-экв/100 г почвы.

Для определения содержания хлорорганических соединений и тиодигликоля в почве 5 г почвенного образца помещали в колбы, приливали 10 мл дистиллированной воды и встряхивали в течение 30 мин. Полученную суспензию отфильтровывали, в фильтрате определяли содержание ХОС и ТДГ.

Культуру *Pseudomonas sp. Y-13* выращивали в жидкой среде следующего состава, г/л: ГРМ (гидролизат рыбной муки) – 10,0; NaCl – 1,0; раствор смеси ПГИ $0,080 \pm 0,001$ г ХОС/л, $0,72 \pm 0,04$ г ТДГ/л, рН – 7,5. В конце экспоненциальной фазы роста биомассу отделяли от нативного раствора центрифугированием и ресуспендировали в физиологическом растворе.

В образцы почв вносили смесь ПГИ в концентрации 1,0 г ХОС/ кг а.с.почвы; 7,7 г ТДГ/кг а.с.почвы. В опытные образцы, кроме смеси ПГИ вносили клеточную суспензию с таким расчетом, чтобы исходный титр клеток был $10^8 - 10^9$ клеток/г почвы. Почвенные образцы инкубировали при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности 50-60% от полной влагоемкости в течение 30 недель.

Результаты наблюдений за динамикой процесса дехлорирования в почвенных образцах показали, что скорость и степень дехлорирования ХОС в опытных и контрольных вариантах полностью совпадают. Эти результаты подтверждают наши данные (глава 5) о химической природе процесса дехлорирования, протекающего без участия бактерии-деструктора *Pseudomonas* sp. Y-13.

Деструкция ТДГ происходит медленнее (рис. 20). Так через 10 недель инкубирования в опытном варианте ТДГ обнаруживается в концентрации 1,7 г/кг а.с.почвы, что составляет 22 % от исходного количества, в то время как в контроле за этот период времени деструкция ТДГ прошла только на 41 %. Период 50%-й убыли ТДГ (T_{50}) в опытном варианте составлял 4 недели, а в контрольном 6 недель.

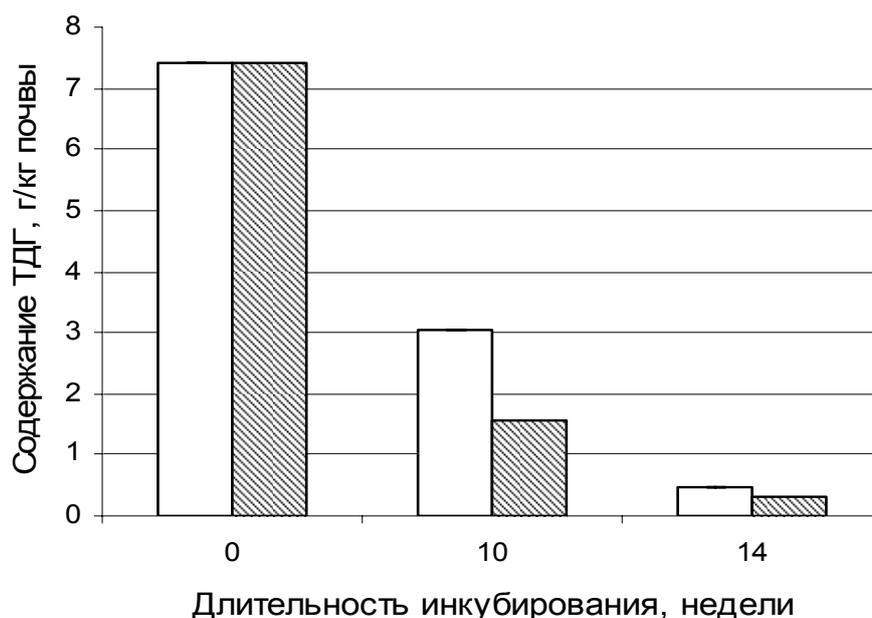


Рисунок 20. Динамика деструкции ТДГ в серой лесной почве, загрязненной ПГИ (7,7 г ТДГ/кг а.с.почвы; 1,0 г ХОС/ кг а.с.почвы).

□ загрязненная почва (контроль)

▨ загрязненная почва, обработанная культурой *Pseudomonas* sp. Y-13

После 14 недель инкубирования в опытном образце почвы, оставалось 0,33 г ТДГ/кг а.с.почвы, что составляет 4,4% от исходного количества. В варианте

почвы без культуры обнаружено – 0,47 г ТДГ/кг а.с.почвы, что составляет 6,3% от исходного.

Через 30 недель инкубирования ТДГ не обнаруживается как в опытных, так и в контрольных пробах.

Параллельно с изучением динамики деструкции ТДГ исследовали фитотоксичность почвы. В качестве тест-культуры использовали семена овса ярового (*Hordeum vulgare* L.). Наличие или отсутствие фитотоксичности оценивали по таким показателям, как всхожесть семян, длина coleoptиля и корня.

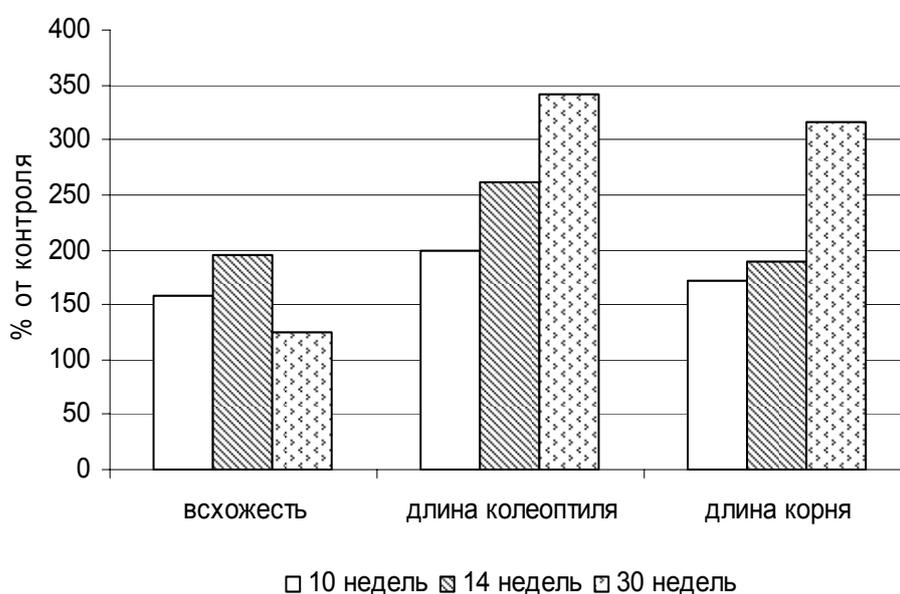


Рис. 21. Динамика изменения фитотоксичности серой лесной почвы, загрязненной смесью ПГИ (1,0 г ХОС/кг почвы; 7,7 г ТДГ/кг почвы) и инокулированной клетками *Pseudomonas* sp.Y-13, относительно контроля - загрязненной почвы без культуры-деструктора. Контроль-100%.

Результаты показали, что в контрольном образце проявляется большая фитотоксичность, чем в опытном (рис.21). Так через 10 недель инкубирования в опытном образце, при концентрации ТДГ – 1,7 г/кг почвы, всхожесть овса увеличивалась на 58%, длина coleoptиля и длина корня также превышали

контрольные показатели в 2 и 1,7 раза соответственно. При дальнейшем инкубировании (14, 30 недель) аналогичная тенденция сохраняется.

Следует обратить внимание, что изучаемые показатели фитотоксичности образцов почвы с ПГИ, как инокулированных бактериальными клетками, так и неинокулированных, значительно ниже, чем чистой почве (не загрязненной ПГИ).

Так, через 30 недель инкубирования почвы, загрязненной смесью ПГИ, всхожесть на ней семян овса составляет 80%, длина coleoptily 15%, корней 18% от соответствующих показателей, получаемых на чистой почве (не загрязненной ПГИ).

В почве, содержащей ПГИ и инокулированной бактериальными клетками, эти показатели значительно улучшились – всхожесть семян такая же, как на чистой почве, однако длина coleoptily и корня не превышает 55 и 40% соответственно от контрольных значений, полученных на чистой почве.

Таким образом, под действием выделенной культуры бактерий *Pseudomonas* sp.Y-13 в почве происходит полная деструкция основного продукта гидролиза иприта – ТДГ, что ускоряет снижение ее фитотоксичности.

По совокупности вышеизложенных результатов можно заключить, что наибольшей толерантностью к смеси ПГИ и ТДГ обладают культуры бактерий, как музейные, так и выделенные из почв.

Выделенный из почвы штамм *Pseudomonas* sp.Y-13 трансформирует исследуемые токсиканты (в сравнительно высоких концентрациях) до продуктов, которые затем полностью потребляют.

Эти результаты свидетельствуют о целесообразности для полной и ускоренной очистки почв от смеси ПГИ и ТДГ отбирать и использовать высокоактивные деструкторы из числа бактериальных культур, в том числе и *Pseudomonas* sp.Y-13.

Исследования по биоочистке почв от ПГИ только начаты, полученные результаты свидетельствуют о возможности и перспективности микробиологического способа их детоксикации.

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние смеси ПГИ и основного ее компонента – ТДГ на микроорганизмы различных таксономических групп. Показано, что наиболее чувствительны к этим продуктам микромицеты и актиномицеты, а наиболее устойчивы бактерии.
2. Показано, что наиболее значительным ингибиторным действием на изученные микроорганизмы обладает смесь ПГИ (по сравнению с ТДГ), что, по-видимому, связано с содержанием в ее составе хлорорганических веществ.
3. С использованием микромицетов, как наиболее чувствительных к ТДГ и смеси ПГИ микроорганизмов, показано, что эти продукты оказывают значительное влияние на морфологические и физиолого-биохимические признаки разных микромицетов; увеличивают проницаемость клеточных мембран, изменяют жирнокислотный состав липидов, активизируют дегидрогеназы и подавляют активность гидролитических ферментов, стимулируют образование пигментов и экзополисахаридов.
4. Проведен скрининг наиболее устойчивых к смеси ПГИ штаммов бактерий, выделенных из почвенных образцов. Среди изученных микроорганизмов выбран штамм *Pseudomonas* sp. Y-13 как высокоактивный деструктор ПГИ. Концентрация смеси ПГИ в среде, при которой культура растет и полностью их потребляет, составляет 2,3 г/л ХОС и 20 г/л ТДГ.
5. По результатам изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков выделенная культура отнесена к роду *Pseudomonas*.
6. Впервые в продуктах трансформации ТДГ выделенной культурой обнаружен β -меркаптоэтанол, что позволяет определить два пути, по которым может происходить деструкция основного продукта смеси ПГИ: с образованием тиодигликолевой (ТДГК) и тиогликолевой (ТГК) кислот и

с образованием β -меркаптоэтанола с последующей его трансформацией также в ТГК.

7. Показано, что продукты, образующиеся в процессе биодеструкции ТДГ – ТГК, ТДГК, уксусная кислота, а также β -меркаптоэтанол (после трансформации его в ТГК), используются культурой в качестве источника углерода.
8. На модельных опытах показано, что внесение клеток бактерий *Pseudomonas* sp. Y-13 в почвы, загрязненные смесью ПГИ, приводит к ускорению процесса очистки от этих загрязнителей и снижению фитотоксичности почв.

Список литературы

1. Авцин А.П., Шахламов В.А. Ультраструктурные основы патологии клеток.- М.: Медицина, 1979. - 316 с.
2. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества.- М.: Военное изд., 1990. - 271 с.
3. Александров В.Н., Жаворонков Г.Н., Боровский Ю.В., Титов В.А. Химическое оружие иностранных армий. Уч. пособие. - М., 1989. - 156 с.
4. Александров М.С., Иванов В.С., Совков В.Б. Метод спектральных моментов. Аппроксимация бесструктурных полос фотопоглащения // Оптика и спектроскопия. - 1993. - Т. 74, № 1. - С. 69-84.
5. Андреюк Е.И. Методологические аспекты изучения микробных сообществ почвы. Микробные сообщества и их функционирование в почве. – Киев.: Наукова думка, 1981. - С. 1-23.
6. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. - М.: МГУ, 1970. - 487 с.
7. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Абросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1974. - 76 с.
8. Бекер С., Дерре Р., Штельт Е. Безопасное уничтожение высокотоксичных веществ // Российский хим. журнал. - 1993. - Т. 37, № 3. - С. 29-33.
9. Берестецкий О.А. Методы определения токсичности почвы. - Киев: Урожай, 1971 - С. 28-31.
10. Богач П.Г., Курский МД., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. Структура и функция биологических мембран. Вища шк., Киев, 1981. - 336 с.
11. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. - Киев: Наукова думка, 1973 - 145 с.
12. Болдырев А. А. Матриксная функция биологических мембран // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - №7. - С. 2-8.
13. Борисова В.Н. Ферменты – активаторы кислорода (терминальные оксидазы) // Методы экспериментальной микологии / Под общей редакцией Билай В.И. Киев: Наукова думка, 1973 - С. 95-102
14. Боронин А.М., Сахаровский В.Г., Старовойтов И.И., Кашпаров К.И., Зякун А.М., Швецов В.Н., Морозова К.М., Нечаев И.А., Тугушов В.И., Кузьмин Н.П., Кочергин А.И. Научные основы комплексной экологически безопасной технологии уничтожения иприта // Прикл. биохим. и микробиол. - 1996. - Т. 32, № 1. - С. 61-68.
15. Боронин А.М., Сахаровский В.Г., Ермакова И.Т., Гречкина Г.М., Старовойтов И.И. Утилизация продуктов детоксикации ипритно-люизитной смеси // Прикладная биохимия и микробиология - 1999. - Т.35, № 6. - С. 671-678.
16. Боронин А.М., Сахаровский В.Г., Ермакова И.Т., Гречкина Г.М., Старовойтов И.И. Утилизация продуктов детоксикации ипритно-

- люизитной смеси // Прикл. Биохим. И микробиол. - 1999. - Т. 35, № 6. - С. 671-678.
17. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. - 624 с.
 18. Гесслер Н.Н., Соколов А.В., Быховский В.Я., Белозерская Т.А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса // Прикладная Биохимия и Микробиология. - 2002. - Т. 38, № 3. - С. 237-242.
 19. Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Учебное пособие для вузов, 1982. - 240 с.
 20. Гречушкина Н.Н. Полисахариды // Промышленная микробиология. М.: Высшая школа, 1989. - С. 389-413.
 21. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Краузова В.И., Ерошин В.К. Влияние недостатка цинка на эффективность роста, синтез липидов и белка у дрожжей // Микробиология. - 1988. - Т. 57, № 5. - С. 757-763.
 22. Евстафьев И.Б., Кротович И.Н., Воицкий В.Ф., Белолипецкий В.П. Проблемы утилизации химического оружия. Уничтожать или перерабатывать? // Журнал Всесоюзного хим. общества им. Менделеева. - 1991. - Т. 34, № 1. - С. 95-97.
 23. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ, 1983. - 221 с.
 24. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: МГУ, 1976. - 307 с.
 25. Еремин А.Н., Михайлова Р.В., Метелица Д.И. Сравнительная кинетическая характеристика каталаз и глюкозооксидаз грибов // Прикл. биохим. и микробиол. - 2000. - Т. 36, № 3. - С. 261-266.
 26. Ермакова И.Т., Старовойтов И.И., Тихонова Е.Б., Слепенькин А.В., Кашпаров К.И., Боронин А.М. Метоболизм тиодигликоля культурой *Alcaligenes xylosoxydans* SUBSP. *denitrificans* // Микробиология. - 2002. - Т. 71, № 5. - С. 604-610.
 27. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987а. - 256 с.
 28. Звягинцев Д.Г. Успехи и современные проблемы почвенной микробиологии // Почвоведение. - 1987б. - № 10. - С. 44-52.
 29. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. - М.: МГУ, 1991. - 303 с.
 30. Злочевская И.В., Абсалямов С.Я., Лалимова Л.М., Решетникова И.А. К изучению механизма фунгицидного действия четвертичных аммониевых соединений // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. - 1981. - №3 (207). - С. 80-84.
 31. Иванов В.С., Совков В.Б. Спектральные моменты контура полосы электронного перехода // Оптика и спектроскопия. - 1993. - Т. 74, №1. - С. 49-68.
 32. Карасевич Ю.М. Экспериментальная адаптация микроорганизмов. - М.: Наука, 1975. - 87 с.

33. Карасевич Ю.Н. Основы селекции микроорганизмов, утилизирующих синтетические органические соединения. - М.: Наука, 1982. - 140 с.
34. Кейтс М. Техника липидологии. - М.: Мир, 1975. - 322 с.
35. Козлов Ю.П. Свободнорадикальное окисление липидов в биомембранах в норме и патологии. Биоантиокислители. - М.: Наука, 1985. - 145 с.
36. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. - М.: Наука, 1986. - 336 с.
37. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. - М.: Агропромиздат, 1991. - 123 с.
38. Куплетская М.Б., Красильникова Е.Н., Нетрусов А.И. Ферменты углеводного метаболизма и условия синтеза глюкозооксидазы у *Penicillium funiculosum* КМ МГУ 433 // Биотехнология. - 2003. - №1. - С. 16-21.
39. Лабинская А.С., Блинкова Л., Ещина А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. - М.: Медицина, 2004. - 576 с.
40. Логинова Л.Г., Гужева Э.П. Дегидразная активность термотолерантных дрожжей // Микробиология. - 1961. - Т 30, №5. - С. 233-238.
41. Луганский И.Н., Шелученко В.В., Кротович И.Н., Чеботарев В.В., Холодова В.А., Панкова О.Л. Основные технологические и экологические аспекты проблемы уничтожения иприта // Рос. хим. ж. - 1994. - Т. 38, № 2. - С. 34-36.
42. Лысенко С.В., Лях С.П. Защитная роль пигментов у грибов, выделенных из лизосферы, при действии УФ лучей // Микробиология. - 1977. - Т. 46, № 5. - С. 867-877.
43. Лях С.П., Рубан Е.Л. Микробные меланины. - М.: Наука, 1981. - 184 с.
44. Максименко А.В. Модифицированные препараты супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сердечно-сосудистой системы и легких // Усп. современной биологии. - 1993. - Т. 113, №3. - С. 351-365.
45. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. - М.: МГУ, 1980. - 278 с.
46. Марфенина О.Е. Антропогенные изменения комплексов микроскопических грибов в почвах: Автореф. дис. ...д-ра биол. Наук. М., - 1999. - 49 с.
47. Марчева Р.Д. Целлюлазная активность темноокрашенных микромицетов, повреждающих документы на бумажной основе // Микология и фитопатология. - 1985. - Т. 19, № 2. - С. 135-138.
48. Мацкевич Н.В. Спонтанная изменчивость и кариология несовершенных грибов. - М.: Наука, 1981. - 184 с.
49. Медведева Н.Г., Зайцева Т.Б., Поляк Ю.М., Гриднева Ю.А. Использование тиодигликоля бактериальной культурой рода *Pseudomonas* // Биотехнология. - 1998. - № 2. - С. 89-92.
50. Медведева Н.Г., Гоголушко Н.Б., Сухаревич В.И. Влияние имбрицина на ультраструктуру клеточной поверхности микромицетов // МИФ. - 1996. - Т. 30, № 1. - С. 17-21.

51. Медведева Н.Г., Сухаревич В.И., Федорова Н.В., Гриднева Ю.А. Трансформация тиодигликоля уксуснокислыми бактериями // Биотехнология - 1996.- № 2. - С. 44-47.
52. Медведева Н.Г., Поляк Ю.М., Зиновьева С.В., Зайцева Т.Б., Сухаревич В.И.. Микробная деструкция иприта бактериальными культурами // Биотехнология. – 2000а. - № 2. - С. 60-65.
53. Медведева Н.Г., Поляк Ю.М., Зиновьева С.В, Зайцева Т.Б. Влияние иприта и продуктов его гидролиза на почвенную микробиоту // Почвоведение. – 2000б. - № 8.- С. 1023-1028.
54. Медведева Н.Г., Зайцева Т.Б., Зиновьева С.В., Сухаревич В.И., Орлова О.Г. Деструкция продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas sp. Y-13* // Биотехнология. - 2006.- № 2. - С. 50-56.
55. Методические указания по государственным испытаниям фунгицидов, антибиотиков и протравителей семян сельскохозяйственных культур. - М.: 1985. - 130 с.
56. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ, 1976. - 220 с.
57. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. - М.: Агропромиздат, 1987. - 368 с.
58. Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Перелыгин В.В. Микробные деструкторы некоторых хлорорганических соединений // Прикладная биохимия и микробиология. - 2000. - Т. 36, № 6. - С. 642-646.
59. Овчинников Ю.А., Иванов В.Г., Шкроб А.М. Мембраноактивные комплексоны. - М.: Наука, 1974. - 385 с.
60. Ольшанова К.М. Практикум по хроматографическому анализу. - М.: Высш. школа, 1970. - 312 с.
61. Основы экспериментального мутагенеза. - Киев: Вища школа, 1981. - 216 с.
62. Павловская Ж.И., Михайлова Р.В., Мороз И.В. Влияние условий культивирования *Penicillium rizeum* F-648 на образование каталазы и глюкозооксидазы // Микология и фитопатология. - 2004. - Т. 38., № 1. - С. 77-82.
63. Петров С.В., Корякин Ю.Н., Завьялова Н.В., Холстов В.И. Биотехнология в решении проблемы уничтожения химического оружия // Российский хим. журнал. - 1995. - Т. 39., № 4. - С. 18-20.
64. Полянская Л.М., Лукин С.М., Звягинцев Д.Г. Изменение состава микробной биомассы при культивации почв // Почвоведение. - 1977. - № 2. - С. 206-212.
65. Рапопорт А.И., Вентыня Э.Ю. Структурно – функциональные перестройки в клетках при обезвоживании – регидратации // Торможение жизнедеятельности клеток / Под ред. М.Е. Бекера. – Рига: Зинатне, 1987. - С. 85-99.
66. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. - М.: Наука, 1977. - 176 с.
67. Савин Ю.И., Вишенкова Е.М., Пасынкова Е.М. Исследование поведения иприта и люизита в воде и почве при условиях, имитирующих природные среды // Рос. хим. ж. - 1995. - Т. 39, № 4. - С. 121-125.

68. Семашко Т.В., Михайлова Р.В., Еремин А.Н. Глюкозооксидаза *Penicillium funiculosum* 46.1 // Прикл. биохим. и микробиол. - 2003. - Т. 39, № 4. - С. 419-426.
69. Сулей М. Жизнеспособность популяций: Природоохранные аспекты.- М.: Мир, 1989. - 267 с.
70. Тихонова Е.Б., Ермакова И.Т., Слепенькин А.В., Кашпаров К.И., Старовойтов И.И, Боронин А.М. Биоутилизация тиодигликоля – продукта детоксикации иприта: выделение штаммов-деструкторов, изучение условий процесса биодеградации // Микробиология. - 2002. - Т. 71, № 2. - С. 247-253.
71. Трофимов Б.А., Гусарова Н.К., Дорофеев И.А., и др. // Журн. прикл. химии. - 1994. - Т. 67, № 1. - С. 161-166.
72. Удальцова Г.Ю., Холстов В.И., Григорьев С.Г. Пути решения проблемы обеспечения безопасности уничтожения опасных веществ за рубежом // Российский хим. журнал. - 1993. - Т. 37, № 3. - С. 43-49.
73. Умяров И.А., Кузнецов Б.А., Кротович И.Н., Холстов В.И., Соловьев В.К. Методы уничтожения запасов люизита и иприта // Российский хим. журнал. - 1993. - Т. 37, № 3. - С. 25-29.
74. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. - М.: Наука, 1974. - 218 с.
75. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. - М.: изд-во «Протектор», 2003. - 304 с.
76. Франке З. Химия отравляющих веществ. - М.: Химия, 1973. - Т. 1. - 437 с.
77. Фунтикова Н.С., Катомина И.С., Мысякина И.С. Состав фосфолипидов и степень ненасыщенности липидов гриба *Mucor* при низких температурах // Микробиология. - 1992. - Т. 61, Вып. 5. - С. 793-796.
78. Фунтикова Н.С., Мысякина И.С., Подглазова М.Н. Состав жирных кислот и классов липидов в связи с деморфизмом гриба *Mucor lusitanicus* в экстремальных условиях // Микробиология.- 1998. - Т. 67, № 4. - С. 488-495.
79. Химический энциклопедический словарь. - М.: Советская энциклопедия, 1983. - 577 с.
80. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям. – Соросовский образовательный журнал № 9, 1997. - С. 12-17.
81. Amir A., Chapman S., Gozes Y., Sahar R., Allon N. Protection by extracellular glutathione against sulfur mustard induced toxicity in vitro // Hum. Exp. Toxicol. - 1998. - V. 17(12). - P. 652-60.
82. Amitai G., Adani R., Hershkovitz M., Bel P., Rabinovitz I., Meshulam H. Degradation of VX and sulfur mustard by enzymatic haloperoxidation // J. Appl. Toxicol. - 2003. - V. 23(4). - P. 225-33.
83. Anderson J.P.E., Domsch K.H. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils // Canad. J. Microbiol. - 1975. - V. 21. - P. 314-322.

84. Black R.M., Brewster K., Clarke R.J., Hambrook J.L., Harrison J.M., Howells D.J. Metabolism of thiodiglicol (2,2'-thiobis-ethanol) : isolation and identification of urinary metabolites following interaperitoneal administration to rat // *Xenobiotica*. - 1993. - V. 23, № 5. - P. 473-481.
85. Black R.M., Read R.W. Detection of trace levels of thiodiglicol in blood, plasma and urine using gas chromatography-electron-capture negative-ion chemical ionisation mass spectrometry // *J. Chromatogr.* - 1988. - V. 449, № 1. - P. 261-270.
86. Brimfield A.A. Possible protein phosphatase inhibition by bis(hydroxyethyl)sulfide, a hydrolysis product of mustard gas // *Toxicol. Lett.* - 1995. - V. 78, № 4. - P. 43-48.
87. Brimfield A.A., Zweig L.M., Novak M.J., Maxwell D.M. In vitro oxidation of the hydrolysis product of sulfur mustard, 2,2'-thiobis-ethanol, by mammalian alcohol dehydrogenase // *Biochem. Mol. Toxicol.* - 1998. - V.12, № 6. - P. 361-369.
88. Capacio B.R., Smith J.R., DeLion M.T., Anderson D.R., Graham J.S., Platoff G.E., Krote W.D. Monitoring sulfur mustard exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of thiodiglycol cleaved from blood proteins // *J. Anal. Toxicol.* - 2004. - V.28, № 5. - P. 306-310.
89. Chakrabarti A.K., Ray P., Broomfield C.A., Ray R. Purification and characterization of protease activated by sulfur mustard in normal human epidermal keratinocytes.// *Biochem. Pharmacol.* - 1998. - V.15, № 56(4). - P. 467-72.
90. Christensen M. A view of fungal ecology // *Mycologia*. - 1989. - V. 81, № 1. - P. 1-19.
91. Cowan F.M., Broomfield C.A., Smith W.J. Effect of sulfur exposure on protease activity in human peripheral blood lymphocytes. // *Cell Biol. Toxicol.* - 1991.- V. 7(3). - P.239-48.
92. Cowan F.M., Broomfield C.A., Smith W.J. Inhibition of sulfur mustard-increased protease activity by niacinamide, N-acetyl-L-cysteine or dexamethasone // *Cell Biol Toxicol.* - 1992. - V. 8(2). - P. 129-38.
93. Cossins A.R., Macdonald A.G. The fatty acid composition of liver mitochondrial phospholipids of Deep-sea fish // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1986. - V. 860. - P.325-335.
94. Cronan John E., JR and P. Roy Vagelos. Metabolism and function of the membrane phospholipids of *Escherichia Coli* // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1972. - № 265. - P.25-60.
95. Cronan John E., JR and Edvard P. Gelmann. An estimate of the minimum amount of unsaturated fatty acid required for growth of *Escherichia Coli* // *Biological Chemistry.* - 1973. - V. 248, № 4. - P. 188-195.
96. Culter R., *Ann. Acad Sci.* - 1999. - V. 621. - P. 1-9.
97. D'Agostino P.A., Hancock J.R., Chenier C.L. Packed capillary liquid chromatography-electrospray ionization (tandem) mass spectrometry of mustard hydrolysis products in soil // *J. Chromatogr. A.* - 2004. - V. 1058, № 1-2. - P. 97-105.

98. Dacre J.C., Goldman M. Toxicology and pharmacology of chemical warfare agent sulfur mustard // *Pharmacol. Rev.* - 1996. - V. 48, № 2. - P. 289-326.
99. Debouzy J.C., Aous S., Dabouis V., Neveux Y., Gentilhomme E. Phospholipid matrix as a target for sulfur mustard (HD): NMR study in model membrane systems // *Cell Biol. Toxicol.* - 2002. - V. 18, № 6. - P. 397-408.
100. DeFrank J.J., Cheng T., Kolakowski J.E., Harvey S.P. Advances in the biodegradation of chemical warfare agent and related materials / Keystone symposia on molecular and cellular biology, March 16-22, 1995. // *J. of Cellular Biochemistry.* - 1995. - Suppl. 21 a. - P. 41.
101. De Ley J., Kersters K. Oxidation of aliphatic glycols by acetic acid bacteria // *Bacteriological reviews.* - 1964. - V. 28, № 2. - P. 164-180.
102. DeLong E.F., Yayanos A.A. Adaptation of the membrane lipids of a Deep-Sea bacterium to changes in hydrostatic pressure//*Science.* - 1985. - V. 228. - P. 1101-1103.
103. Dudley B.F., Brimfield A.A., Wingston G.W. Oxidation of thiodiglycol (2,2'-thiobis-ethanol) by alcohol dehydrogenase: comparison of human isoenzymes // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* - 2000. - V. 14, № 5. - P. 244-251.
104. Ellman, J.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1959. - V. 82. - P. 72-77.
105. Elsayed Nabil M., Omaye Stanley T. Biochemical change in mouse lung after subcutaneous injection of the sulfur mustard 2-chloroethyl 4-chlorobutyl sulfide // *Toxicology.* - 2004. - V. 199, № 2-3. - P. 195-206.
106. Ermakova I.T., Starovoitov I.I., Slep'kin A.V., Kashparov K.I., Boronin A.M. Bioutilization of thiodiglycol, the product of mustard detoxification: isolation of degrading strains, study of biodegradation process and metabolic pathways // *Process Biochemistry.* - 2002. - V. 38, Issue 1. - P. 31-39.
107. Fenderson B.A., Eddy E.M., Hakomori S. Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. // *Bioessays.* - 1990. - V. 12(4). - P. 173-9
108. Franke M. Ergometric study series in social hygiene diagnostics // *Arch Hyg Bakteriol.* - 1967. - V. 151(8). - P. 687-95.
109. Garcia-Ruiz V., Martin-Otero L.E., Puyet A. Transformation of thiodiglicol by resting cells of *Alcaligenes xylosoxydans* PGH10 // *Biotechnol. Prog.* - 2002. - № 18. - P. 252-256.
110. Graham J.S., Reid F.M., Smith J.R., Stotts R.R., Tucker E.S., Shmaker S.M., Niemuth N.A., Janny S.J. A cutaneous full-thickness liquid sulfur mustard burn model in weanling swine: clinical pathology and urinary excretion of thiodiglicol // *J. Appl. Toxicol.* - 2000. - V. 20, Suppl 1:S. - P. 161-172.
111. Han Suhua, Espinoza Luis A., Liao Hongling, Boulares A. Hamid, Smulson M.E. Protection by antioxidant against toxicity and apoptosis induced by the sulphur mustard analog 2-chloroethylethyl sulphide (CEES) in Jurkat T cells and normal human lymphocytes // *Br. J. Pharmacol.* - 2004. - V. 141, № 5. - P. 795-802.
112. Harvey S.P., DeFrank J.J. Biodegradation of chemical warfare agents: demilitarization applications. Army science: The New Frontiers, Military and Civilian Application. - Woodlands TX: Borg Biomedical Services. 1993.

113. Hayat M.A. Principles and technics of electron microscopy // Biol. Appl. - 1974. - V. 1, № 1. - P. 43-51.
114. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H., Staley J.T. and Williams S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore. 1994.
115. Hsu Chuen Chin and C. Fred Fox. Induction of the lactose transport system in a lipid-synthesis-defective mutant of *Escherichia Coli* // Bacteriology. - 1970. - V. 103, № 2. - P. 410-416.
116. Hugh R., Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria // J. Bacteriol. - 1953. - V. 66, № 1. - P. 24-25.
117. Hur G.H., Kim Y.B., Choi D.S., Kim J.H., Shin S. Apoptosis as a mechanism of 2-chloroethylethyl sulfide-induced cytotoxicity. Chem Biol Interact. - 1998. - V. 12, № 110(1-2). - P. 57-70.
118. Husain K., Dube S.N., Sugendran K., Singh R., Das Gupta S., Somani S.M. Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats // J. Appl. Toxicol. - 1996. - V. 16(3). - P. 245-248.
119. Ichinotsubo D., Mower H.F., Setliff J. The use of rec- bacteria for testing of carcinogenic substances // Mutat. Res. - 1977. - V. 46. - P. 53-61.
120. Itoh N., Yoshida M., Miyamoto T., Ichinose H., Wariishi H., Tanaka H. Fungal cleavage of thioether bond found in Yperite // FEBS Letters. - 1997. - V. 412. - P. 281-284.
121. Issa F.M., Youself H.Z., Issa Y.M., Issa R.M. Spectrophotometric Determination Dichlorodiethyl Sulphide (Sulfur Mustard HD) and β , β' , β'' - Trichlorotriethylamine (Nitrogen Mustard HN) Using Thymolphthalein // Egypt. J. Chem. - 1975. - № 18. - P. 257-260.
122. Jamnik P., Raspor P. Methods for monitoring oxidative stress response in yeasts // J. Biochem. Mol. Toxicol. - 2005. - V. 19(4). - P.195-203.
123. Javadi M.A., Yazdani S., Sajjadi H., Jadidi K., Karimian F., Einollahi B., Ja'farinasab M.R., Zare M. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis : report of 48 patients and review of literature // Ophthalmology. - 2005. - V. 112, № 4. - P. 617-625.
124. Kan R.K., Pleva C.M., Hamilton T.A., Anderson D.R., Petrali J.P. Sulfur mustard-induced apoptosis in hairless guinea pig skin // Toxicol. Pathol. - 2003. - V. 31, № 2. - P.183-190.
125. Kersters K., De Ley J. The oxidation of glycols by acetic acid bacteria // Biochem. et Biophys. Acta. - 1963. - V. 71 (2). - P. 311-331.
126. Kilbane J.J., Jakowski K. Biocatalytic detoxification of 2-chloroethyl ethyl sulfide // J. Chem. Tech. Biotechnol. - 1996. - V. 65. - P. 370-374.
127. Kim J.-W., Rainina E.I., Efremenko E., Engler C.R., Wild J.R. Degradation of thiodiglycol, the hydrolysis product of sulfur mustard, with bacteria immobilized within poly(vinyl) alcohol cryogels // Biotechnology Letters. - 1997. - V. 19, № 11. - P. 1067-1071.

128. Kircher M., Brendel M. DNA alkylation by mustard gas in yeast strains of different repair capacity // *Chem. Biol. Interact.* - 1983. - V. 44(1-2). - P. 27-39.
129. Kircher M., Fleer R., Ruhland A. Biological and chemical effects of mustard gas in yeast // *Mutat. Res.* - 1979. - V. 63, № 2. - P. 273-289.
130. Kopff M., Zakrzewska I., Strzelczyk M., Klem J., Dubiecki W. Superoxide dismutase and catalase activity in psoriatic patients treated topically with ointment containing 2-chloroethyl-3-chloropropyl sulfide // *Pol. J. Pharmacol.* - 1994. - V. 46(5). - P. 439-44.
131. Kovacz N. Identification of *P. pyocianea* by the oxidase reaction // *Nature* - 1956. - V. 178. - P. 703.
132. Kumar O., Sugendran K., Vijayaraghavan R. Protective effect of various antioxidants on the toxicity of sulphur mustard administered to mice by inhalation or percutaneous routes // *Chem. Biol. Interact.* - 2001. - V. 14. - P. 1-12.
133. Lachance R., Paschkewitz J., DiNaro J., Tester J.W. Thiodiglycol hydrolysis and oxidation in sub- and supercritical water // *The Journal of Supercritical Fluids.* - 1999. - V. 16, Issue 2. - P. 133-147.
134. Lauwers A. M., Heinen W. Correlation between the fatty acid composition and the activity of extracellular enzymes from *Bacillus caldolyticus* // *Arch. Mikrobiol.* - 1973. - V. 91, № 3. - P. 241-254.
135. Lee T.-Sh., Chan Sh., Weigand W.A., Bentley W.E. Biocatalytic transformation of [(2-Hydroxyethyl)thio]acetic acid and thiodiglicolic acid from thiodiglycol by *Alcaligenes xylosoxydans* spp. *xylosoxydans* (SH91) // *Biotechnol. Prog.* - 2000. - № 16. - P. 363-367.
136. Lee T.-S., Weigand W.A., Bentley W.E. Observations of methabolite formation and variable yield in thiodiglycol biodegradation process. Impact on reactor design // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 1997. - V. 63-64. - P. 743-757.
137. Lledias F., Rangel P., Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. // *J Biol Chem.* - 1998. - V. 24. - P. 10630-10637.
138. Lodhi I.J., Sweeney J.F., Clift R.E., Hinshaw D.B. Nuclear dependence of sulfur mustard-mediated cell death // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2001. - V. 170(1). - P. 69-77.
139. Lois Ember. Options exist for destroying US chemical arms // *Chem. and eng. news.* - 1993. - V. 71, № 25. - P. 30.
140. Lowry O.H., Rosenrough N.F., Farr A.L., Randall K.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* - 1951. - V. 193, № 1. - P. 265-275.
141. Mahmoudi M., Hefazi M., Rastin M., Balali-Mood M. Long-term hematological and immunological complications of sulfur mustard poisoning in Iranian veterans // *Int. Immunopharmacol.* - 2005. - V. 5, № 9. - P. 1479-1485.
142. McClintock S.D., Hoesel L.M., Das S.K., Till G.O., Neff T., Kunkel R.G., Smith M.G., Ward P.A. Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats // *J. Appl. Toxicol.* - 2005. - V. 26. - P. 245-252.

143. Medvedeva N., Polyak Yu., Zaytceva T., Zinovieva S. Microbiological Destruction of Mustard in Soil // *Bioremediation of contaminated soils*. - 2000. - P. 151-176.
144. Mitchell P. Translocations through natural membranes, "Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology". - 1967. - 290 p.
145. Mortimer C. E., Niehaus W.G. Enzymatic isomerization of oleic acid to trans-10 -octadecenoic acid // *J. Biochem. et. Biophys.* - 1972. - № 6. - P. 1650-1656.
146. Munavalli S., Panella M. Thin-layer chromatography of mustard and its metabolites // *J. Chromatogr.* - 1988. - V. 437. - P. 423-428.
147. Mulbry W., Rainina E. Biodegradation of chemical warfare agents // *Asm. News.* - 1998. - V. 64, № 6. - P. 325-331.
148. Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // *Environ. Health Perspect.* - 1999. - V. 107(12). - P. 933-973.
149. Naghii M.R. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants // *Mil. Med.* - 2002. - V. 167, № 7. - P. 573-575.
150. National Toxicology Programm. Mustard gas. // *Rep. Carcinag.* - 2002. - V. 10. - P. 160-161.
151. Ogawa N., Miyashita K., Chakrabarty A.M. Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds // *Chem. Rec.* - 2003. - V. 3, № 3. - P. 158-171.
152. Ohtonen R. Accumulation of organic along a pollution gradient: Application of Odum's theory of ecosystem energies // *Microbial Ecol.* - 1994. - V. 27, № 1. - P. 43-45.
153. Pham M.-Q.K., Harvey S.P., Weigand W.A., Bentley W.E. Reactor comparisons for the biodegradation of thiodiglycol, a product of mustard gas hydrolysis // *Appl. Biochem. Biotech.* - 1996. - V. 57/58. - P. 779-789.
154. Poff K.L., Fontana R.K., Whitaker B.D. Membrane and sensory transduction / N.Y. - L. 1984. - 137 p.
155. Ray R., Legere R.H., Majerus B.J., Petrali J.P. Sulfur mustard-induced increase in intracellular free calcium level and arachidonic acid release from cell membrane. *Toxicol Appl Pharmacol.* - 1995. - V. 131(1). - P.44-52.
156. Rock C.O., Cronan J.E. Lipid metabolism in prokaryotes, biochemistry of lipids and membranes / Inc. Menlo Park, California. - 1985. - 73-115 p.
157. Roberts J.J., Warwick G.P. Studies of mode of action of alkylating agents – VI The metabolism of bis-2-chloroethylsulphide (mustard gas) and related compounds // *Biochemical Pharmacology.* - 1963. - V. 12, № 12. - P. 1329-1330.
158. Rozmiarek H., Capizzi R.L., Papirmeister B., Fuhrman W.H., Smith W.J. Mutagenic activity in somatic and germ cells following chronic inhalation of sulfur mustard // *Mutat. Res.* - 1973. - V. 21. - P. 13-14.
159. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* - 2005. - V. 38(7). - P. 995-1014.

160. Shigenaga M.K., Hagen T.M., Ames B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 1994. - P. 10771-10778.
161. Sklyar V.I., Mosolova T.P., Kucherennko I.A., Degtyrova N.N., Varfolomeyev S.D., Kalyuzhnyi S.V. Anaerobic toxicity and biodegradability of hydrolysis products of chemical warfare agents // Appl. Biochem. Biotechnol. - 1999. - V. 81, № 2. - P. 107-117.
162. Spurr A.R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy // J. Ultrastructure Res. - 1969. - V. 26, № 1. - P. 31-34.
163. Sneath P.H., Collins V.G., A study in test reproducibility between Laboratories: report of pseudomonas working party // J. Microbiology and Serol. - 1974. - V. 40, № 4. - P. 481-527.
164. Somani S.M., Babu S.R. Toxicodynamics of sulfur mustard.// Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol. - 1989. - V. 27(9). - P. 419-35.
165. Somogyi M.V. Determination of reducing sugars // J. Biol. Chem. - 1952. - V. 195, № 1. - P. 19-23.
166. Takeshima Y., Inai K., Bennett W.P., Metcalf R.A., Welsh J.A., Yonehara S., Hayashi Y., Fujihara M., Yamakido M., Akiyama M., Tokuoka S., Land C.E., Harris C.C. Mutations in Jung cancers from Japanese mustard gas workers // Carcinogenesis. - 1994. - V. 15. - P. 2075-2079.
167. Venitt S. Inter strand cross link in the DNA of *Escherichia coli* B-R and B-S-1 and their removal by the resistant strain mustard gas mutagen // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1968. - V. 31. - P. 355-360.
168. Vijayaraghavan R., Kulkarni A., Pant S.C., Kumar P., Rao P.V., Gupta N., Gautam A., Ganesan K. Differential toxicity of sulphur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2005. - V. 202, № 2. - P. 180-188.
169. Watson C., Pulford I.D., Riddell-Black D. Screening of willow species for resistant to heavy metals: comparison of performance in a hydroponics system and field trials.// Int. J. Phytoremediation. - 1992. - V. 5(4). - P. 351-65.
170. Wormser U., Brodsky B., Proscura E., Foley J.F., Jones T., Nyska A. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in sulfur mustard-induced skin lesion; effect of topical iodine // Arch. Toxicol. - 2005. - V. 79, № 11. - P. 660-670.
171. Yang Y., Szafraniec L.L., Baudry W.T., Ward J.R. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of 2-chloroethylsulphides // J. Org. Chem. - 1988. - V. 53. - P. 3293-3297.
172. Yang Y.-Ch., Baker J.A., Ward J.R. Decontamination of chemical warfare agents // Chem. Rev. - 1992. - V. 92. - P. 1729-1743.