

14. Лазарев Н. В. Общие основы промышленной токсикологии. М.-Л.: Медгиз, 1938. 338 с.
15. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений: утв. постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 01.10.1996 № 21. М.: Минздрав России, 1997. 20 с.
16. Руководство Р 2.2.2006-05. Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда: утв. Гл. гос. сан. врачом РФ 29.07.2005 : введ. в действие с 01.11.2005 // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. М. 2005. № 3 (21). С. 3–144.
17. Владимирова В. Г. Расчёт количества лекарственных препаратов на поверхность тела как один из способов определения равноэффективных доз для животных и человека // Фармакология и токсикология. 1976. № 1. С. 123–128.
18. Lim R. K. S., Rink K. G. , Glass H. G. , Soaje-Echague E. A Method for the Evaluation of Cumulation and Tolerance by the Determination of Acute and Subchronic Median Effective Doses // Arch. Intern. Pharm. Ther. 1961. V. 130. P. 336–352.

УДК 576.8.097.3

**Биопрепарат для ремедиации почвы в пределах
зоны защитных мероприятий объекта уничтожения
химического оружия «Марадыковский»**

© 2013. К. К. Стяжкин¹, д.б.н., начальник, С. В. Петров¹, д.т.н., г.н.с., А. С. Туманов², к.м.н., начальник, Н. В. Завьялова¹, д.б.н., г.н.с., К. А. Воробьев², к.б.н., зам. начальника, В. В. Тетерин², к.б.н., начальник отдела, И. П. Погорельский², д.м.н., в.н.с., А. А. Лещенко², д.т.н., в.н.с., А. Г. Лазыкин², к.б.н., с.н.с., В. С. Менухова², инженер,

¹Научный центр 33 Центрального научно-исследовательского испытательного института Министерства обороны Российской Федерации,

²Научно-исследовательский центр 33 Центрального научно-исследовательского испытательного института Министерства обороны Российской Федерации,
e-mail: biologiavgu@yandex.ru

Представлены результаты исследований по созданию биопрепарата на основе бактерий штамма *Pseudomonas fluorescens EK-5-93*, перспективного для использования при ремедиации почв в районе размещения объекта уничтожения химического оружия «Марадыковский».

The paper presents the results of the study on creation of biopreparation based on *Pseudomonas fluorescens EK-5-93* strain promising to use for soil remediation at chemical weapons demmission plant «Maradikovsky».

Ключевые слова: штамм-биодеструктор, фосфорорганические отравляющие вещества, реакционные массы, биотехнология утилизации

Keywords: biodestructor, organo-phosphorus poisoning substance, reactionary complexes, recycling biotechnology of reactivity complexes

Введение

В соответствии с Федеральной целевой программой «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» для её реализации в стране создана необходимая промышленная база [1]. Одним из объектов, где продолжается уничтожение химического оружия (УХО), является объект «Марадыковский» в Кировской области, на котором на начало 2013 г. уже уничтожено 90,5% (более

6 тыс. т) отравляющих веществ (ОВ), хранившихся в химическом арсенале. В ноябре 2014 г. на объекте «Марадыковский» введена в эксплуатацию линия по уничтожению боеприпасов сложной конструкции. По заявлению начальника Федерального управления по безопасному хранению и УХО В. П. Капашина, при должном финансировании Программы реально завершить уничтожение запасов ХО в РФ к концу 2015 г., как это предусмотрено в её нынешней редакции [2].

Все объекты УХО относятся к опасным промышленным объектам, что предполагает предъявление повышенных требований к их экологической безопасности. Тщательный экологический мониторинг, проводимый независимыми экологическими структурами за все годы работы объекта «Марадыковский», не зафиксировал ни одного случая попадания в атмосферу, на почву или в сточные воды боевых ОВ или продуктов их детоксикации. Тем не менее, несмотря на то, что опасность возникновения чрезвычайных ситуаций на объектах УХО, рассчитанная на основе современной теории рисков, ничтожно мала, принимаются всесторонние меры безопасности на случай внештатных ситуаций [3]. Они включают в себя создание локальных систем оповещения, организацию обеспечения населения индивидуальной защитой органов дыхания, разработку межведомственного плана взаимодействия сил и средств различных министерств и ведомств. К числу рассматриваемых мер, несомненно, следует отнести биопрепараты, обладающие способностью с высокой степенью эффективности осуществлять деструкцию остаточных количеств реакционных масс, образующихся при детоксикации ОВ, при их нахождении на загрязнённых участках почвы.

Другой аспект рассматриваемого вопроса состоит в следующем. В 2015 г. Федеральным центром совместно с региональными властями будут решаться вопросы вывода объекта УХО из эксплуатации и перехода к выпуску востребованной продукции оборонного или гражданского назначения с использованием производственной, инженерной и социальной инфраструктуры ликвидируемого объекта [4]. В этой связи прогноз состояния компонентов природно-техногенной среды является актуальной, но весьма сложной проблемой. От её решения во многом будет зависеть восстановление экологического статуса объекта УХО, в том числе почвы, для которой характерны уникальные черты морфологического строения, почвообразовательных процессов и уровня продуктивности [5].

Для восстановления компонентов природно-техногенной среды объектов УХО предусмотрены следующие экологические мероприятия: ликвидация (санация) загрязнённых территорий; восстановление загрязнённого грунта; обезвреживание почв на загрязнённых участках; рекультивация земельных участков после возвращения обезвреженного грунта (засыпка плодородным слоем почвы, засевание травой, посадка кустарников) [6].

При этом основными требованиями к способам восстановления компонентов природно-техногенной среды являются высокая эффективность и отсутствие вредного влияния на состояние здоровья человека и окружающей среды. По нашему мнению, в полной мере предъявляемым требованиям может отвечать технология биоремедиации почв [7]. К тому же современное состояние разработанности данной проблемы обуславливает возможность рассмотрения её не в начальной – исследовательской стадии, а в практическом плане внедрения созданных технологий. Так, специалистами НИЦ ФГКУ «ЗЗЦНИИ» Минобороны России разработана технология производства экологически безопасного препарата – биодеструктора токсичных фосфорорганических соединений на основе бактерий штамма *Pseudomonas fluorescens EK-5-93*. Оценка экологической безопасности бактерий указанного штамма проведена в острых и хронических экспериментах на лабораторных животных (белых мышах, морских свинках и кроликах). Эксперименты по определению острого общетоксического действия включали определение патогенности, токсигенности и токсичности бактерий, раздражающего действия на слизистые оболочки глаз кроликов. При проведении хронических экспериментов на лабораторных животных исследовали возможность транзитного бактерионосительства, специфическое влияние на иммунную систему, нормальную кишечную микрофлору и инициацию дисбактериоза, развитие диссеминации во внутренние органы организма. По всем исследованным показателям бактерии штамма *P. fluorescens EK-5-93* в концентрациях, не превышающих предельно допустимых значений, являются безвредными для лабораторных животных.

С учётом результатов оценки экологической безопасности бактерий штамма *P. fluorescens EK-5-93*, а также данных о стабильности свойства биодеструкции экотоксикантов, технологичности, неприхотливости по питательным потребностям, невозможности длительно персистировать в объектах окружающей среды при отсутствии субстрата для деструкции бактерии штамма были использованы в качестве основы для конструирования биопрепарата. Согласно имеющимся экспериментальным данным, при уровне загрязнения почвы фосфорорганическими соединениями, равном 70–100 мг/кг, для очистки территории на 82–85% в течение 7–8 суток необходимо 0,7–1,4 мг биопрепарата при условии содержа-

ния в 1 г биопрепарата 150 млрд жизнеспособных бактерий [8].

Биопрепарат предназначен для ремедиации почв в районах размещения объекта УХО «Марадыковский». При этом одним из основных условий приготовления стандартизованного биопрепарата, позволяющих на главном этапе культивирования интенсивно расти и размножаться микробной популяции, является обеспечение при выполнении операции засева биореактора оптимальной посевной дозы микробных клеток.

На практике традиционные способы приготовления посевной микробной культуры, используемой для засева биореакторов, предусматривают серию накопительных пассажей бактериальных клеток на различных плотных и в жидких питательных средах [9, 10]. Данный этап работы характеризуется многостадийностью операций, продолжительностью по времени (от нескольких суток до нескольких недель) и требует высокой квалификации исполнителей. Учитывая тот факт, что микроорганизмы быстро адаптируются к изменениям условий культивирования, любое некачественное исполнение исследовательских операций обуславливает вероятность получения в процессе приготовления посевного материала микробной культуры, не обладающей деструктивными свойствами.

Очевидные преимущества в плане экспрессного получения биопрепарата могут иметь заранее прошедшие контроль стандартизованные и находящиеся на хранении лиофилизированные эталонные посевные микробные культуры. Они предназначены в начальной стадии выпуска биопрепарата для непосредственного засева биореакторов. Поэтому целью работы является разработка биопрепарата, предназначенного для санации территорий объекта УХО «Марадыковский», на основе стандартизованных лиофилизированных эталонных культур микроорганизмов-деструкторов штамма *P. fluorescens* EK-5-93, пригодных для использования в качестве посевного материала.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *P. fluorescens* EK-5-93, депонированный в коллекции технофильных микроорганизмов НИЦ ФГКУ «33 ЦНИИИ» Минобороны России. Штамм выделен методом накопительной культуры из мест естественной адаптации к токсичным фосфорорганическим соединениям (ФОС), проявляет к ним в присутствии органических

кислот С–Р-лиазную активность, характеризующуюся расщеплением углерод-фосфорной связи. Штамм способен к накоплению биомассы в процессе культивирования и обладает другими необходимыми свойствами для его использования при переработке остаточных количеств реакционных масс, образующихся при утилизации ФОС.

Выращивание штамма – биодеструктора осуществляли при температуре 27–29°C в течение 48 часов при уровне аэрации и частоте вращения вала перемешивающего устройства, обеспечивающих массообмен 0,9–1,1 мМ дм⁻³ мин.⁻¹ в жидкой минимальной синтетической среде с ФОС следующего состава (г×дм⁻³): трис (гидрокси метил) аминокетан – 12,1; хлорид натрия – 5,4; 0,2; сульфат натрия – 0,01; хлорид кальция – 0,01; глюкоза – 2,0; хлорид железа (III) – 0,00027; ФОС в виде глифосата в составе гербицида «Раундап» (производитель – ЗАО Фирма «Август», Россия по лицензионному соглашению с фирмой «Монсанто Европа С.А.», Бельгия), который содержит 360 г дм⁻³ глифосата в виде изопропиламинной соли – 1,0; вода дистиллированная до 1000 дм³, рН, – 7,2–7,5 ед. рН.

Определение специфической активности штамма в отношении ФОС проводили газохроматографическим методом по количеству образовавшегося метана в тестируемой среде. Токсичность почвы определяли методом биотестирования с помощью биотеста «Эколюм» [11].

Процесс лиофильного высушивания культуры *P. fluorescens* EK-5-93 осуществляли на установке TG-16 (Германия) по технологическому режиму: температура сублиматора – (- 40°C); длительность сублимационного периода – 6 часов; максимальная температура досушивания – (+ 25°C); разрежение в системе – от 200 до 100 мкм; продолжительность высушивания – 24 часа.

Концентрацию живых микробов в суспензиях оценивали методом высева серийных десятикратных разведений на агар Хоттингера в чашках Петри с последующим подсчетом выросших колоний. Общую концентрацию бактерий в культурах и суспензиях определяли по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-29-86П).

Биологические свойства колоний оценивали визуально по характеру роста культуры на агаре и в бульоне Хоттингера, агаре Эндо с лактозой и фуксинолом. Форму и размер клетки изучали при микроскопии окрашенных по Граму мазков.

Таблица 1

Компонентный состав сред высушивания эталонных посевных лиофилизированных культур на основе штамма *P. fluorescens EK-5-93*

Номер прописи среды высушивания	Компонентный состав среды высушивания	Концентрация компонента в растворе, %	Объём раствора в дм ³ среды высушивания, см ³
1	Сахароза	10,0	500
	Желатин	1,5	500
2	Сахароза	13,0	333
	Желатин	2,0	333
	Тиомочевина	2,0	333
3	Сахароза	10,0	400
	Желатин	2,0	200
	Тиомочевина	2,0	200
	Аскорбиновая кислота	1,5	100
	Глицерин	1,0	100

Таблица 2

Эвтектические характеристики культуры *P. fluorescens EK- 5-93* для различных сред высушивания

Номер прописи среды высушивания	Температура начала кристаллизации, °С	Минимальная температура начала плавления, °С	Максимальная температура полного затвердевания, °С
1	- 5,0±0,3	- 24,1±0,1	- 26,6±0,2
2	- 7±0,2	- 25,4±0,4	- 30±0,3
3	- 8±0,3	- 25,6±0,6	- 30±0,7

Наличие посторонней микрофлоры устанавливали способом визуального контроля окрашенных по Граму мазков, а также по характеру особенностей выросших на плотной питательной среде в чашках Петри изолированных колоний.

Ферментативную активность определяли по изменению цвета индикатора в процессе культивирования в тесте Хью-Лейфсона и методом идентификации микроорганизмов с использованием миниатюризированных идентификационных систем NEFERM test фирмы PLIVA-Lachema (США).

Электронную микроскопию бактерий проводили с использованием просвечивающего микроскопа JEOLJEM-1200EX (Япония) методом негативного контрастирования растворами солей тяжёлых металлов при следующих контролируемых параметрах: ускоряющее напряжение 15 кВ, рабочее расстояние – 18 мм, размер фокусного пятна – 30%, режим вакуума – глубокий вакуум.

Результаты

Одной из основных задач в процессе приготовления посевных микробных культур, в том числе культуры *P. fluorescens EK-5-93*, является способ поддержания их стабильных биологических свойств [12, 13].

Исходя из вышеизложенного, экспериментальные исследования со штаммом *P. fluorescens EK-5-93* были направлены на:

- подбор компонентного состава защитной среды, обеспечивающей при высушивании стабилизацию культуры и исключаяющей интенсивное отмирание бактериальных клеток в процессе лиофилизации и последующего хранения;
- разработку и оптимизацию режимов «замораживания – высушивания» культуры на лиофильной сушильной установке;
- проведение оценки основных биологических, биохимических, морфологических свойств, приготовленного лиофилизованного препарата.

Отработку условий получения сухих эталонных посевных микробных культур для экспериментальной оценки перспективы их использования осуществляли на коллекторной – ампульной сушильной установке. В дальнейшем отработку технологического процесса приготовления биопрепарата на основе штамма *P. fluorescens EK-5-93* осуществляли с использованием сублимационной камерной сушильной установки [14].

Выбор компонентного состава среды высушивания основывался на применении недорогих, недефицитных и доступных ингредиентов [15]. В ходе экспериментальных работ

по приготовлению эталонных посевных лиофилизированных культур на основе штамма *P. fluorescens EK-5-93* выбраны прописи сред высушивания, компонентный состав которых представлен в таблице 1.

Определение эвтектических температур бактериальной культуры *P. fluorescens EK-5-93* проводили путём изучения следующих характеристик: температуры начала кристаллизации, минимальной температуры начинающего плавления и максимальной температуры полного затвердевания высушиваемого препарата. В экспериментах использовались агаровые культуры *P. fluorescens EK-5-93*, приготовленные с использованием сред высушивания, полученных по прописям № 1, № 2 и № 3 (табл. 1). Эвтектические характеристики культуры *P. fluorescens EK-5-93* представлены в таблице 2.

Эвтектические температуры позволяют установить для каждой защитной среды и культуры *P. fluorescens EK-5-93* допустимые температуры предварительного замораживания. Последние совпадают с их минимальными температурами полного затвердевания (верхней границы эвтектической зоны). Обращает на себя внимание тот факт, что эвтектические зоны рабочих культур во всех случаях составляют температуры ниже минус 20°C, максимальная температура полного затвердевания составляет минус 30°C.

Таким образом, для штамма *P. fluorescens EK-5-93* и различных сред высушивания оптимальные значения температур замораживания составляют: для среды № 1 – (– 26,8°C), среды № 2 – (– 30,3°C) и для среды № 3 – (– 30,7°C). С учётом полученных данных в дальнейших исследованиях была использована среда № 1.

В последующем были выполнены исследования по изучению влияния условий лиофильного высушивания на выживаемость бактерий штамма *P. fluorescens EK-5-93* в составе лиофилизированных эталонных культур, а также на сохраняемость их основных биологических свойств, при хранении в течение 1 и 3 месяцев.

Начальным этапом лиофильного высушивания микробной взвеси является её замораживание. С этой целью замораживание микробной взвеси *P. fluorescens EK-5-93* проводили способом погружения ампул с микробной взвесью в охлаждающую смесь с температурой минус 40°C. Процесс лиофильного высушивания микробной взвеси *P. fluorescens EK-5-93* осуществляли на установке TG-16 в течение 24 часов. После окончания высуши-

вания определяли показатели биологической концентрации, остаточной влажности и наличие посторонней микрофлоры в свежеприготовленном биопрепарате.

Три серии приготовленной лиофилизированной эталонной культуры на основе штамма *P. fluorescens EK-5-93* хранили при следующих температурных режимах: + (20±2)°C, + (4±20)°C и – (20±2)°C. Через 1 и 3 месяца изучали морфологию клеток и оценивали их выживаемость в процессе хранения. Результаты экспериментальных работ представлены на рисунке и в таблице 3.

Как свидетельствуют данные электронно-микроскопического изучения микробных клеток, процесс сублимационного высушивания является физиологичным. Спустя 2 часа после регидратации микробные клетки имеют обычную форму, среднюю электронно-оптическую плотность с хорошо просматриваемыми структурами цитоплазмы. Клеточная стенка волнистая, у единичных клеток есть дефект клеточной стенки. Несколько меньшие размеры (в 1,25 раза) клеток можно объяснить незавершенностью процесса регидратации в течение 2 часов. Как показали последующие наблюдения, для полноценной регидратации и восстановления клеточных структур требуется 12 часов. Живые размножающиеся клетки *P. fluorescens EK-5-93* имеют ту же форму, что и регидратированные, но несколько крупнее. Их электронно-оптическая плотность меньше, хорошо видны структуры цитоплазмы, клеточная оболочка чёткая, ровная.

Данные, представленные в таблице 3, свидетельствуют о высоком уровне выживаемости микробных клеток в процессе лиофильного высушивания. Максимальные показатели выживаемости бактерий штамма *P. fluorescens EK-5-93* в процессе хранения лиофилизированной эталонной культуры были достигнуты при температурном режиме – 20,0°C.

В результате проведённых исследований по отработке параметров процесса лиофильного обезвоживания культур *P. fluorescens EK-5-93* была разработана аппаратурно-технологическая схема (АТС) процесса приготовления сухого биопрепарата. Основные её элементы включают следующие технологические операции:

- высеив эталонной культуры на чашки Петри с плотной синтетической минимальной средой, содержащей глифосат на уровне от 3,1 до 3,3·10⁹ кл./см³, и инкубирование чашек Петри с посевом микробов при температуре 28-30°C в течение 48 часов;

– отбор типичных колоний бактерий и их пассаж в жидкой синтетической минимальной среде с глифосатом в пробирках при температуре 28–30°C в течение 48 часов;
 – пересев культуры на плотную питательную среду с глифосатом, скошенную в пробирках, инкубирование в термостате при температуре 28–30°C в течение 48 часов;
 – смыв микробной культуры с питательной среды в пробирках и пересев на плотную питательную среду с глифосатом, скошенную в матрацах, выращивание при температуре 28–30°C в течение 72 часов;
 – смыв бактерий культуры, выращенной в матрацах жидкой средой № 1 (10%-ной сахарозы и 1,5%-ного желатина), получение полуфабриката биопрепарата;
 – замораживание жидкого полуфабриката биопрепарата до температуры – 30–40°C со скоростью 5–8°C мин.⁻¹ в течение 0,5 часа.

Замораживание проводили во флаконах непосредственно в сублиматоре сушильной установки. Лиофильное обезвоживание жидкого полуфабриката осуществляли по режиму: температура замораживания материала – 40°C; длительность сублимационного периода – 6 часов; максимальная температура досушивания + 25–28°C; разрежение в системе – 100–200 мкн; продолжительность цикла – 20–24 часа.

По данной АТС были приготовлены 3 серии биопрепарата – деструктора на основе штамма *P. fluorescens* EK-5-93. Всестороннее изучение регидратированных культур штамма-деструктора из приготовленных серий лиофильно высушенного биопрепарата показало, что микробные клетки по своим основным биологическим, культурально-морфологическим и биохимическим свойствам соответствуют эталонным микробным культурам и сохраняют эти свойства в течение всего периода хранения.

Таблица 3

Зависимость выживаемости бактерий *P. fluorescens* EK-5-93 от температурных условий хранения лиофилизированной эталонной культуры

Номер серии	Температура хранения, °C	Концентрация живых микробных клеток в препарате, КОЕ · 10 ⁹ в см ³		Остаточная влажность, %	Выживаемость микробных клеток в биопрепарате при хранении, %	
		до высушивания	после высушивания		1 месяц	3 месяца
1	20,0±2	79,6	68,5	3,5	55,0	45,0
	4,0±2				88,0	75,0
	– 20,0±2				100,0	98,0
2	20,0±2	92,5	65,0	3,0	68,0	55,0
	4,0±2				95,0	90,0
	– 20,0±2				100,0	100,0
3	20,0±2	85,2	58,5	3,2	65,0	50,0
	4,0±2				85,0	73,0
	– 20,0±2				100,0	100,0

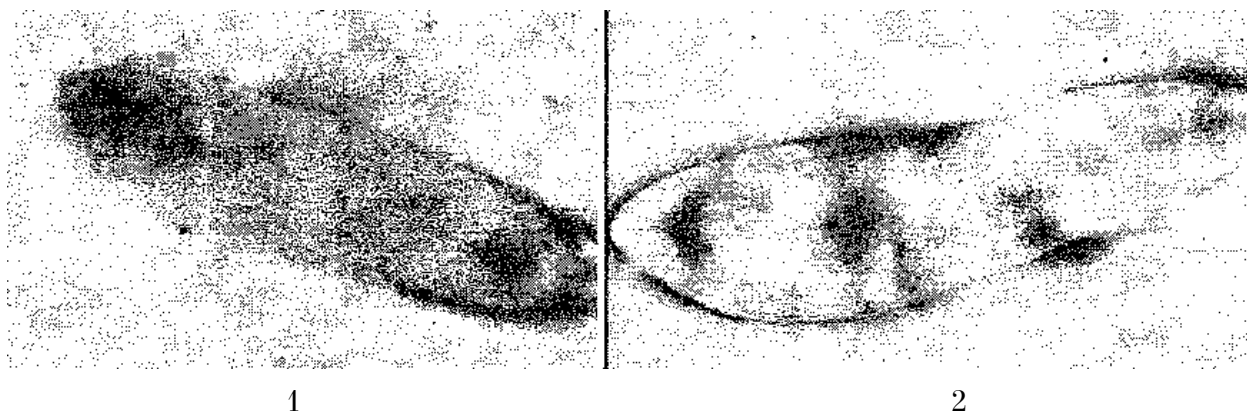


Рис. Электронно-микроскопическая картина бактерий *P. fluorescens* EK-5-93: 1 – после регидратации лиофилизата эталонной культуры, x25000; 2 – нативная бульонная культура, x20000

Таблица 4

Результаты оценки биологических, культурально-морфологических и биохимических свойств бактерий *P. fluorescens* EK-5-93 в составе биопрепарата

№ п/п	Контролируемый показатель	Паспортные характеристики эталонной микробной культуры	Характеристики культуры в составе биопрепарата
1	Морфология окрашенных по Граму бактерий	Крупные грамотрицательные палочки с закруглёнными концами	Крупные грамотрицательные палочки с закруглёнными концами
2	Характер роста в жидкой питательной среде в статических условиях при температуре 27-29°C	Аэроб. Образует равномерное, умеренное помутнение питательной среды. Поверхностная плёнка, осадок умеренный, слизистый	Аэроб. Образует равномерное, умеренное помутнение питательной среды. Поверхностная плёнка, осадок умеренный, слизистый
3	Характер роста колоний на плотной питательной среде при температуре 27-29°C	Колонии округлой формы, блестящие, бледно-жёлтого цвета с ровным краем, диаметр до 1,5 мм	Колонии округлой формы, блестящие, бледно-жёлтого цвета с ровным краем, диаметр до 1,5 мм
4	Биохимические свойства	Ферментирует D-глюкозу, L-арабинозу, D-маннозу, D-маннитол, N-ацетил-глюкозамин, глюконат, капрат, адипат, малат, цитрат, фенилацетат. Слабо ферментирует D-мальтозу. Тест на оксидазу – положительный, в течение 2-4 сек.	Ферментирует D-глюкозу, L-арабинозу, D-маннозу, D-маннитол, N-ацетил-глюкозамин, глюконат, капрат, адипат, малат, цитрат, фенилацетат. Слабо ферментирует D-мальтозу. Тест на оксидазу – положительный, в течение 2-4 сек.
5	Способность к росту на минимальных синтетических средах: – биологическая концентрация на минимальных средах в присутствии фосфат-ионов, 10^9 кл/см ⁻³ ; – биологическая концентрация на минимальных средах в присутствии глифосата, 10^9 кл/см ⁻³	Не менее 1,0 Не менее 1,0	4,0±0,2 3,5±0,4
6	Количество живых микробов, 10^9 кл/см ⁻³	Не менее 25,0	47,9±0,3
7	Наличие посторонней микрофлоры	Отсутствует	Отсутствует
8	Остаточная влажность, %	От 2 до 5	3,8±0,2

Прогноз выживаемости [16] лиофильно высушенных микробных клеток *P. fluorescens* EK-5-93 в составе биопрепарата выполнен в соответствии с Методическими рекомендациями по ускоренному методу прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур [17]. Результаты определений показали, что биопрепарат способен храниться без потери эксплуатационных характеристик не менее двух лет при температуре – 20°C.

В таблице 4 представлены данные по оценке основных свойств лиофилизированного биопрепарата на основе штамма *P. fluorescens* EK-5-93.

На основании выполненных исследований по оценке биологических характеристик биопрепарата получено санитарно-эпидемиологическое заключение № 66.МО.01.244.М.000005 01.12 от 26.01.2012 г. на выпуск препарата биодеструктора ФОС (сухая форма).

Работа выполнена при поддержке Государственного контракта № ЦР/07/2085/УЗ07К.

Литература

1. Федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», утверждённая постановлением Правительства Российской Федерации от 21 марта 1996 года № 305 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 5 июля 2001 года 510), с изменениями в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24 октября 2005 года № 639.
2. Капашин В.П., Назаров В.Д. Российские объекты по уничтожению химического оружия. Организация деятельности // Российский химический журнал. 2010. № 4. С. 10–12.
3. Холстов В.И. Выполнение Россией обязательств по Конвенции о запрещении химического оружия: состояние и ближайшие задачи // Теоретическая и прикладная экология. 2010. №1. С. 87–95.
4. Чупис В.Н., Растегаев О.Ю., Малишевская А.О. Перспективные подходы к перепрофилированию объектов по уничтожению химического оружия. Реагентные технологии извлечения мышьяка из мышьяксодержащих реакционных масс и отходов // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 2. С. 47–52.
5. Ашихмина Т.Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: «Вятка», 2002. 544 с.
6. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А., Лягин И.В., Сенько О.В., Гладченко М.А., Сироткина М.С., Холстов А.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Экологически безопасная биodeградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Российский химический журнал. 2010. № 4. С. 19–24.
7. Кочнов Ю.М., Барышева И.В., Мирошкина Л.А. Процессы и аппараты защиты окружающей среды: Оценка воздействия на окружающую среду выбросов загрязняющих веществ. М: МИСиС, 2002. 265 с.
8. Стяжкин К.К., Дармов И.В., Бредихин В.Н., Воробьёв К.А., Погорельский И.П., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г. Экспериментальная оценка иммуноотоксического действия штамма *Pseudomonas fluorescens EK-5-93* // Теоретическая и прикладная экология. 2012. № 2. С. 54–59.
9. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: «Мир», 1978. 330 с.
10. Стяжкин К.К., Кузнецов С.Л., Дармов И.В., Живов И.В., Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Погорельский И.П., Ваганов А.В. Оптимизация условий глубинного культивирования штамма *Pseudomonas fluorescens EK-5-93* – биодеструктора метилфосфонатов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова. 2010. Т. 6. № 4. С. 19–25.
11. Методические рекомендации 11-1/133-09. Методика экспрессного определения токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста «Эколюм». Утв. Минздравом РФ 08.06.2000, с изм. и доп. от 01.11.2007. – М.: Изд-во стандартов. 2008. 61 с.
12. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чикалёва И.И. Биотехнология. М.: «Академия», 2008. 256 с.
13. Говорунов И.Г., Пучков Е.О. Низкотемпературная консервация бактерий // Общие вопросы микробиологической промышленности. Вып.4. М: ВНИИСЭНТИ, НПО «Медбиоэкономика», 1982. 19 с.
14. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: «КолосС», 2004. 296 с.
15. Ураков Н.Н., Волков В.Я., Боровик Р.В. Функциональное состояние и механизмы повреждения микроорганизмов в процессе приготовления бактериальных препаратов // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 4. С. 420–432.
16. Кошелев А.В., Нестеров А.И. Ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур метанотрофных бактерий // Микробиология. 1987. Т. 56. Вып. 3. С. 492–496.
17. Методические рекомендации. Определение Отраслевых Стандартных Образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. ГНИИСиК МИБП им. Л.А. Тарасевича. М: 2003. Введ. 24.12.2002.