

УДК 577.15+502.55

Биотехнологические методы и нейтрализующие средства для обеззараживания почв и очищения вод, загрязнённых экотоксикантами

© 2014. Н. В. Завьялова¹, д.б.н., г.н.с., И. В. Филимонов¹, к.т.н., с.н.с.,
Е. Н. Ефременко², д.б.н., зав. лабораторией, В. И. Холстов³, д.х.н., директор,
А. А. Янковская⁴, офицер отдела,

¹27 Научный центр Минобороны России,

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,

³Департамент реализации конвенциональных обязательств Министерства
промышленности и торговли Российской Федерации,

⁴Федеральное управление по безопасному хранению и уничтожению химического оружия,
e-mail: natzavjalova@rambler.ru

В статье представлен обзор данных литературы за последние тридцать лет по биотехнологическим методам и биокатализаторам, которые были использованы для обеззараживания и очищения почв и вод, загрязнённых токсичными экотоксикантами.

Статья содержит анализ данных по разработке технологий и комплексов нейтрализующих средств для обеззараживания и очищения почв и вод. Проведённый анализ показал, что для очистки почв и вод, загрязнённых токсичными экотоксикантами, могут быть использованы ферменты, отдельные штаммы микроорганизмов-деструкторов и различные их консорциумы, как в иммобилизованном виде, так и их суспензии.

Установлено, что механизмы и схемы проведения биологической деградации экотоксикантов и продуктов их деструкции в водных растворах и почвах могут быть различными для разных штаммов микроорганизмов-деструкторов, их консорциумов и ферментов. Предложено при разработке биотехнологий по очистке почв и вод от загрязнений экотоксикантами учитывать активность фермента, видовое происхождение используемого в технологии микроорганизма или состав консорциума, их биодеградирующие свойства, особенности поведения в сообществе с различными природными штаммами, способность к изменчивости в условиях неоднородности субстрата, а также характеристики почв и факторы, влияющие на механизм и скорость биодеградации.

The work presents an overview of the literature over the last thirty years by biotechnological methods and biocatalysts, which may be used for disinfection of soil and purification of water contaminated of ecotoxicants.

It was formed that mechanisms and schemas of realization of degradation toxicants and their degradation products in their destruction in water solutions and soils may be different from various strains of microorganism-destructors, their consortiums and ferments. It was proposed that during development biotechnologies for purification soils and water from toxic substances it's necessary to take into consideration the enzyme's activity, specific origin used in technology of microorganism or structure of consortium, their feature of biodegradation, their special properties at the community with different strains. Capacity to changeability in terms of heterogeneity of the substrate, and characteristics of soils and factors which influencing on the mechanism and velocity of biodegradation.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, биокатализатор, биоремедиация почв
и очистка вод, нейтрализующие средства, фермент, экотоксиканты.

Keywords: bacteria-destructors, biocatalysts, bioremediation of soils and water purification,
neutralizing agents, enzyme, ecotoxic substances.

Введение

По мере завершения процесса уничтожения запасов ОВ возникают задачи вывода из эксплуатации и ликвидации последствий деятельности ОУХО. Указанные задачи включают выявление загрязнений территорий продуктами детоксикации специфических веществ, разработку эффективных и малозатратных технологий обеззараживания и очищения

почв и вод, а также нейтрализующих средств, обеспечивающих экологическую безопасность.

Создание биопрепаратов (биокатализаторов) и разработка биотехнологий обеззараживания, очистки и восстановления загрязнённых почв и вод в местах бывшего производства, хранения и уничтожения ОВ, которые способны устранить экологическую нагрузку и обеспечить деструкцию отходов

промышленного уничтожения ХО и очистить загрязнённые почвы и воды [1, 2].

В отличие от других методов деструкции токсичных веществ, использование штаммов микроорганизмов-деструкторов и ферментов выгодно отличается отсутствием вторичных отходов, высокой степенью деградации, возможностью полной ассимиляции продуктов [3–5].

В качестве конечных продуктов при биотехнологической деструкции экотоксикантов образуются углекислый газ, метан, вода и неорганические соли [6–10].

Исследования, проведённые ранее отечественными и зарубежными учёными, показали, что используя методы биодegradации реакционных масс, биоремедиации загрязнённых почв и очистки вод, можно достичь полного разрушения продуктов детоксикации ОВ и повышения уровня восстановления почв и вод за счёт уничтожения попавших в них токсичных химикатов [11–15]. Детоксикация осуществляется за счёт полной минерализации с помощью микроорганизмов-деструкторов и ферментов, выделенных из клеток бактерий [16–31].

Биотехнологические методы очистки почв становятся всё более популярными в Европе и США. В Германии свыше 50 компаний, а в США ещё большее их количество предлагают свои услуги по очистке почв при помощи микроорганизмов и ферментов.

Использование биокатализаторов на основе штаммов микроорганизмов и ферментов, обладающих повышенной способностью к катализу разложения экотоксикантов в процессе очистки почв и вод

Использование природных микроорганизмов для восстановления нарушенных экосистем занимает приоритетное место в программах по охране окружающей среды многих стран, в том числе и США [32].

Известно, что разложение чужеродных веществ микроорганизмами протекает за счёт включения в реакции гидролиза, окисления, восстановления, дегалоидирования, изомеризации, полимеризации и др. Такую активность проявляют бактерии родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio* и др., обеспечивая при этом полную минерализацию разлагаемых промышленных загрязнителей, что, в свою очередь, снижает содержание вредных веществ в окружающей среде до концентраций, не превышающих предельно допустимых значений [33–38]. По оценкам компании Falmouth As-

sociates, биологическое обезвреживание отходов требует приблизительно в 10 раз меньше затрат, чем общепринятые методы, например, озоление.

Так, фирма Biota при использовании штаммов микроорганизмов-биодegradантов сократила расходы на очистку 15 тыс. м³ загрязнённой нефтью почвы в четыре раза по сравнению с расходами при традиционной технологии удаления и транспортировки загрязнённой почвы [32].

Широкое распространение получили микроорганизмы-деструкторы и ферменты при восстановлении загрязнённых территорий военных объектов. Комплексные программы по деконтаминации почв и подземных вод на этих полигонах применительно к углеводородам нефти, растворителям, токсинам, кислотам и тяжёлым металлам разрабатываются биотехнологической группой министерства обороны США. Большое внимание этой группой уделяется разработке биотехнологических подходов для дегазации ОВ [39].

Рядом специализированных компаний (Ecova, Envirogen, Biota, Biotrol, Celgene, Falmouth Associates, Biodetox, GmbH и др.) используются биологические способы, которые являются наиболее простыми и экономически выгодными для очистки окружающей среды. Соответствующие технологии находят применение более чем в 100 фирмах, и их дальнейшее распространение является одним из наиболее развивающихся секторов коммерческой деятельности [40–42]. Информация о конкретных разработках в этой области носит конфиденциальный характер, а важные технологические сведения патентуются. Проведённые различными фирмами крупномасштабные биовосстановительные работы включали в себя глубокую научную проработку каждого экотоксиканта и выполнение экспериментальных исследований в полевых условиях.

Биотехнологии, использующие биокатализаторы, основываются на применении биореакторов для обработки сточных вод, а также смесей почвы и воды, или на проведении обработки *in situ* за счёт стимуляции роста природных микроорганизмов-деструкторов путём проведения аэрации и введения питательных веществ и биопрепаратов (биокатализаторов) на основе иммобилизованных бактерий-деструкторов или ферментов [41–43].

Включение в производственный процесс специального биореактора способствовало снижению на 99,9% концентраций метилхлорида, аммиака, фенола, цианидов в промышленных выбросах [44]. В то время как применение

метода *Bioreg* при микробиологической очистке почвы от нефтяных загрязнений *in situ* привело к десятикратному уменьшению концентрации углеводов [45].

При внесении биопрепаратов на основе клеток микроорганизмов, в почву с аэрированными на специальной установке грунтовыми водами по методу *Biox-S* наблюдали снижение содержания бензола в грунте на три порядка [46].

Показано, что активизация естественных биодеградиационных процессов с помощью препарата *Unipol* позволила очистить за три недели более 50 миль побережья Аляски, залитой нефтью [47].

Препарат на основе анаэробных бактерий, помещённых в специальные кессоны, был использован для очистки донных отложений реки Гудзон, загрязнённых полихлорвиниловыми дифенилами. В ряде случаев были применены нитратсодержащие системы, в которых биодегградация осуществлялась за счёт переключения аэробного метаболизма бактерий на денитрификацию, для очистки грунтовых вод, загрязнённых топливом реактивных самолётов [48, 49].

Были открыты штаммы бактерий рода *Alkaligenes*, которые эффективно разрушали гидразины в почве и воде и штаммы микроорганизмов рода *Pseudomonas*, способные утилизировать алкилсульфонаты [50]. Такие штаммы в качестве единственного источника углерода и энергии используют расщепление связи C-S с последующим окислением алифатического спирта до соответствующих кислот. Указанные штаммы нашли своё применение для очистки сточных вод, загрязнённых анионами поверхностно активных веществ [51, 52].

Установлено, что штаммы *Ps. paucimobilis* разлагают ряд ароматических углеводов, считающихся ранее устойчивыми к биодегградации – антрахинона, флуорена, хризена, фенантрена, пирена и др. [53].

В глубоких меловых отложениях обнаружены грамположительные бактерии, использующие в качестве единственного источника углерода и энергии толуол, нафталин, дибензотиофен, салицилаты, бензол, п-крезол и все изомеры ксилола [54].

Во всём мире микробиологическое разложение рассматривается как наиболее перспективный путь освобождения окружающей среды от таких устойчивых соединений, как хлорированные углеводороды, образующиеся при уничтожении отходов методом сжигания [55]. Так, в работе [56] показано, что бактерии *Ps. ceracia AC1100* размножаются в среде, содер-

жащей 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоту, и эффективно очищают почвы при начальной концентрации этого гербицида 20 мг/г почвы.

Имеются данные об эффективном разложении бактериями смеси полихлорированных дифенилов до 90% в течение 1–20 суток.

Известны факты, когда внесение в почву суспензии бактерий *Ps. putida LB 400* привело к значительному снижению содержания в ней пиралена – полихлорированного дифенила, используемого в качестве изолятора в трансформаторах и образующего при сжигании более токсичные соединения по сравнению с диоксином, фураном и их производными [57].

В исследовательском центре ВВС США получен штамм бактерий, одновременно расщепляющий хлорбензол и толуол, что раньше считалось неосуществимым [58].

По завершении процесса деструкции экотоксикантов содержание внесённых в почву бактерий резко снижается.

Большие успехи в биотехнологии связывают с результатами внедрения генно-инженерных разработок в практику, несмотря на ограничения применения рекомбинантных микроорганизмов в полевых испытаниях во многих странах. Исследователи считают, что генетически изменённые бактерии могут быть эффективно использованы в биотехнологиях для деградации опасных веществ в биореакторах. Имеются публикации [59–61], в которых изучались процессы биоразложения фосфорорганических соединений иммобилизованными культурами клеток бактерий и ферментными препаратами применительно к очистке сточных вод в производстве пестицидов, при их фасовке, обезвреживании тары и др.

В работе [62] приведены примеры успешного использования суспензионных и лиофилизированных культур микроорганизмов для деконтаминации почвы и воды, загрязнённых фосфорорганическими соединениями. Внесение микроорганизмов проводили на глубину до 40 см. Период разрушения фосфорорганических соединений варьировал от нескольких дней (для тиофоса) до нескольких недель (для фентиона, фитазола и этилгузатиона). Авторами показано, что биохимические процессы разрушения пестицидов в почве включают деалкиляцию, дегалогенизацию, гидролиз амидов или эфиров, окисление, разрыв кольца и т. д. Установлено, что пестициды, начальной стадией разрушения которых является гидролиз эфирной связи, относительно недолго сохраняются в почве. Гидролиз фосфорорганических соединений (ФОС), протекающий

в живых клетках микроорганизмов, осуществляется под влиянием ферментов гидролаз. Фосфаты легче подвергаются ферментативному гидролизу, чем тиофосфаты. Превращение ФОС с помощью трансфераз мало изучено.

Установлено, что биологическое разрушение пестицидов в природной среде идёт более интенсивно в районах, почвы которых обработаны пестицидами ранее. Это говорит о приспособляемости естественных популяций микробов, находящихся в почве, к потреблению ксенобиотиков [63].

Примером процесса адаптации микроорганизмов к токсичным веществам могут служить результаты исследований возможности биодеструкции агрессивного химического соединения 1,4 дибензоксазепин. Это вещество было добавлено в культуру микроорганизмов, выделенных из осадка пресноводного водоёма. После инкубации в течение 90 дней путём постепенного повышения концентрации токсиканта была достигнута устойчивость к концентрации до 200 мг/л. Через 22 дня данный экотоксикант был разрушен полностью. Этот эксперимент показал возможность биоразрушения ксенобиотика в несколько этапов. Процесс был осуществлён ассоциацией микроорганизмов, в которой ведущая роль организма-деструктора принадлежала виду *Alcaligenes denitrificans*. Указанный вид граммотрицательных бактерий широко распространён в природной среде, культивируется в широком диапазоне условий, обладает многосторонним действием в трансформации ксенобиотиков [64].

Аналогичные методы адаптации микроорганизмов могут быть использованы и для проведения процесса разложения других экотоксикантов представителями иных родов и видов микроорганизмов [65]. В ходе проведения исследований по очистке почв было сделано заключение, что микробиологическое обеззараживание окружающей среды целесообразно проводить суспензией клеток бактерий при малых и средних уровнях загрязнения. В случаях присутствия больших концентраций загрязнителя необходимы специально созданные препараты иммобилизованных – защищённых носителем – клеток бактерий и ферментов. Проведение иммобилизации (закрепления) ферментов и бактериальных клеток позволяет стабилизировать их деятельность и использовать их многократно, расширяя температурный оптимум действия.

В литературе описано использование симбиоза микроорганизмов с водорослями и про-

стейшими беспозвоночными, представляющего собой активный ил. Из экологических соображений особый интерес представляет биомасса, являющаяся отходом промышленной ферментации или встречающаяся в море. Некоторые из этих типов биомасс, обладающих высокой сорбционной ёмкостью, служат основой для новых конкурентно способных процессов биосорбции для детоксикации промышленных отходов, содержащих металлы. Так, ионы свинца и кадмия хорошо связываются биомассой водорослей. Биомассу морских или речных водорослей можно также использовать для удаления из промышленных стоков остаточных количеств токсичных металлов. Мицелии грибов *Rhizopus* и *Absidia* являются лучшими сорбентами меди, свинца, цинка, кадмия, урана и некоторых других тяжёлых металлов [66, 67]. При очистке вод от загрязнений тяжёлыми металлами используют, как правило, два типа биопроцесса: биоадсорбция клеточной массой и биовыщелачивание в результате окислительно-восстановительной реакции [10].

В тех случаях, когда природные микроорганизмы не способны разрушать очень устойчивые химические соединения, или же штаммы-деструкторы не образуют достаточную по численности популяцию, могут быть использованы микроорганизмы, выделенные в лабораторных условиях.

Известно, что микробные инокуляты широкого спектра метаболической активности сейчас производятся зарубежными фирмами и продаются. Наиболее известными фирмами по производству микробных продуктов (лиофилизированные культуры бактерий, жидкая суспензия – *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrisomonas*, *Cellulomonas*, *Acrobacter*, *Rhodopseudomonas*, смесь мутантных бактерий с азотными, фосфорными удобрениями и эмульгатором, мутантные бактерии в смеси с питательными веществами и стимуляторами роста), являются *Flow Laboratories* (Ingelwood, CA), *General Enviromental Sciense* (Beachwood, OH), *Sybron Biocemical* (Dirmingham, NJ, Salem, VA). Способ применения таких препаратов и эффективность их действия зависит от степени соответствия почвенных и климатических условий потребностям микроорганизмов.

Многие специалисты считают, что реинтродукция микроорганизмов будет успешной только в том случае, если эти микроорганизмы будут выделены из конкретной экосистемы. Поэтому процесс получения штаммов деструкторов, адаптированных к местным условиям, является составной частью технологии обработки почв.

До настоящего времени ещё никем не доказано, что внесённые в загрязнённую почву микроорганизмы могут оказывать отрицательное воздействие на природную микрофлору. Имеются лишь сведения, что после внесения микроорганизмов *in situ* наблюдается временное изменение баланса и состава микрофлоры, сложившейся в местах, загрязнённых экотоксикантами к моменту осуществления биохимической деградации.

При изучении генетической структуры популяции бактерий после ликвидации последствий разлива нефти на побережье Аляски была установлена чёткая закономерность – частота встречаемости генов деструкции субстрата зависит от количественного его содержания в окружающей среде [68].

Использование генетически изменённых микроорганизмов (ГИМ), полученных в лабораториях, в окружающей среде поднимает проблему экологической безопасности. Последствия использования в окружающей среде ГИМ были оценены в ходе комбинированных полевых и лабораторных испытаний, которые показали, что лабораторные штаммы и полученные на их основе ГИМ могут выживать длительное время в природных условиях и, следовательно, могут оказывать воздействие на экосистемы [69]. Предсказать воздействие ГИМ невозможно. Необходимо проведение предварительных прогностических оценок возможных последствий биовосстановления с использованием ГИМ по специальным показателям.

Установлено, что потенциальными микробными биокатализаторами разложения фосфорорганических соединений (ФОС) могут быть бактерии родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, широко распространённые в различных почвах. Бактерии рода *Pseudomonas* известны своей деструктирующей способностью по отношению к различным ксенобиотикам, в том числе пестицидам, а бактерии рода *Rhodococcus* известны как деструкторы углеводородов нефти и продуктов разложения ФОС. Большинство клеток, осуществляющих разложение ФОС, используются в высоких концентрациях (106 кл/г почвы). Это позволяет не только увеличить начальную скорость деградации ФОС, но и стабилизировать микроорганизмы в неблагоприятных условиях за счёт их перехода в устойчивое состояние «кворума» (Quorum sensing). Состояние «кворума» связано с генетическим ответом клеток бактерий на увеличение их концентрации и, как правило, выражается в изменении биохимического со-

става клеток и формировании повышенной устойчивости микроорганизмов к различным внешним неблагоприятным факторам. Суть этого явления для грамотрицательных бактерий состоит в том, что в процессе роста и накопления биомассы они синтезируют N-ацилгомосеринлактоны, которые являются автоиндукторами экспрессии «молчащих» генов, отвечающих за формирование резистентности у данных бактерий [70]. Использование иммобилизованных клеток бактерий в состоянии «кворума» может обеспечить наиболее эффективную очистку почв, загрязнённых ФОС. В литературе имеются также данные о технологиях получения иммобилизованных микробных консорциумов (ИМК) [71]. Процедура приготовления ИМК состоит в смешивании осадка влажной биомассы выращенных клеток с 10%-ным водным раствором поливинилового спирта (ПВС, ~84 кДа) и последующем суспендировании до получения однородной гомогенной 10–30% (по массе) суспензии клеток.

Для определения деградирующей способности консорциумов ИМК вводились в среду, содержащую параоксон. Общая концентрация иммобилизованных клеток в отдельном эксперименте составляла 20 г клеток/л [72]. Авторами показано, что клетки способны разрушать различные фосфорорганические пестициды, причём варьирование состава консорциума приводило к изменению степени деградации параоксона. Очевидно, клетки бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, находясь в единой ассоциации, оказывают взаимовыгодное влияние друг на друга, в результате чего степень деградации параоксона увеличивалась при их совместном использовании в составе консорциума.

При иммобилизации этих клеток бактерий в одну гранулу криогеля ПВС можно получить увеличение скорости деградации параоксона на 30%. Установлено, что изменение соотношения клеток внутри носителя влияло на скорость деградации (наблюдалось увеличение на 67% по сравнению с начальной величиной) той же концентрации параоксона. При увеличении биомассы иммобилизованных клеток с 10% до 30% (масс.) скорость деградации параоксона не изменялась, но увеличивалась стабильность ИМК, которые могли быть использованы многократно. Такие катализаторы осуществляли высокоэффективную деградацию различных фосфорорганических пестицидов. Через сутки степень деградации большинства пестицидов достигала более 90%.

ИМК могут быть также использованы для решения комплексной задачи – одновременной деградации нескольких загрязнителей в водной системе, например, параоксона, гексадекана и ПНФ.

При использовании клеток-деструкторов или их консорциумов для очистки почв от загрязнителей необходимо учитывать как степень их загрязнения, так и состав загрязнителей. Кроме того, необходимо определить тип почв, которые будут подвергнуты биотехнологической обработке в процессе биоремедиации. В почвах должна быть определена влажность и процент содержания гумуса, а также рН. Эти характеристики могут существенно повлиять на выбор клеток-деструкторов и состав консорциумов.

Во многих микробиологических лабораториях мира наряду с поиском новых микроорганизмов, адаптированных к развитию в присутствии чужеродных токсичных веществ проводятся активные исследования по выделению из бактериальных клеток ферментов, способных катализировать процессы разрушения химических связей в токсичных соединениях – загрязнителях окружающей среды.

Российскими учёными разработан способ ферментативного гидролиза фосфорорганических соединений в почве [73, 74]. На основе модифицированного фермента органофосфатгидролазы, нанесённого на разные носители (пшеничная солома, рисовая солома, дубовые опилки, берёзовые опилки, сосновые опилки, еловые опилки, активный уголь, песок, диатомовая земля), были созданы препараты биокатализаторов, которые успешно были апробированы для очистки разных видов почв, загрязнённых пестицидами (параоксон, диазинон, паратион).

Заключение

Проведённый анализ литературных данных показал, что для очистки почв и вод, загрязнённых экотоксикантами, могут быть использованы ферменты, отдельные штаммы микроорганизмов-деструкторов и различные их консорциумы, как в иммобилизованном виде, так и их суспензии.

Механизмы и схемы проведения биологической деградации экотоксикантов и продуктов их деструкции в водных растворах и почвах различны для разных штаммов микроорганизмов-деструкторов, их консорциумов и ферментов. Поэтому при разработке биотехнологий по очистке почв и вод от загрязне-

ний экотоксикантами необходимо учитывать активность фермента, видовое происхождение используемого в технологии микроорганизма или состав консорциума, их биodeградирующие свойства, особенности поведения в сообществе с различными природными штаммами, способность к изменчивости в условиях неоднородности субстрата, а также характеристики почв и факторы, влияющие на механизм и скорость биodeградации.

Литература

1. Конвенция о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении. Париж. 1993.
2. Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности. М.: 1996. (в ред. Федерального закона Российской Федерации от 4 октября 2010. № 262-ФЗ).
3. Холстов В.И., Тарасевич Ю.В., Григорьев С.Г. Пути решения проблемы безопасности, уничтожения опасных веществ за рубежом // РХЖ. 1995. Т. 39. № 4. С. 65–73.
4. Удальцова Г.Ю., Холстов В.И., Григорьев С.Г. Пути решения проблемы обеспечения безопасности уничтожения опасных веществ за рубежом // РХЖ. 1993. Т. 37. № 3. С. 43–49.
5. Петров С.В., Корякин Ю.Н., Холстов В.И., Завьялова Н.В. Биотехнология в решении проблемы уничтожения химического оружия // РХЖ. 1995. Т. 39. № 4. С. 18–20.
6. Варфоломеев С.Д., Курочкин И.Н., Райнина Е.И. и др. Новый технологический подход к уничтожению химического оружия. Полная биологическая деградация химических боеприпасов // РХЖ. 1995. Т. 39. № 4. С. 20–24.
7. Харечко А.Т., Мягких В.И., Остроумов Ю.И. и др. Применение микроорганизмов для деструкции опасных веществ, загрязняющих окружающую среду // РХЖ. 1993. Т. 37. № 3. С. 40–43.
8. Боронин А.М., Сахаровский В.Т., Старовойтов И.И. и др. Научные основы комплексной экологически безопасной технологии уничтожения иприта // Прикладная биохимическая микробиология. 1996. Т. 32. № 1. С. 61–68.
9. Биodeградация органических веществ // Информационный сборник № 35 (1551)–16. М.: В/ч 64518, 1992.
10. Разработка биологических способов деструкции ксенобиотоксов и удаления тяжелых металлов // Информационный сборник № 69 (1811)–16. М.: В/ч 64518, 1995.
11. Varfolomeev S.D., Kurochkin I.N., Skliar V.I. et al. // Biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. Edgewood, USA, 1995. P. 16.

12. Rainina E., Varfolomeev S.D., and Wild J.R. // Biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. Edgewood, USA, 1995. P. 9.
13. Разработка биологических способов деструкции ксенобиотиков // Информационный сборник № 29 (1842)–16. М.: НИИ «Медстатистика», 1996. Инв. № 940-96. В/ч 64518.
14. Харечко А.Т., Мягих В.И., Корякин Ю.Н. и др. Оценка влияния микроорганизмов на динамику разложения зомана в почве // РХЖ. 1995. Т. 39. № 4. С. 104–107.
15. Кошелев В.М., Жданов В.А., Шувалов А.А. и др. Американские разработки методов уничтожения химического оружия // РХЖ. 1995. Т. 39. № 4. С. 31–36.
16. Funk S.B., Roberts D.J., Crawford D.J. et al. Initial phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils // Appl. Env. Microb. 1992. V. 59. № 7. P. 2171–2177.
17. Kaake R.H., Roberts D.J., Stevens T.O. et al. Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4, 6-dinitrophenol // Appl. Env. Microb. 1990. V. 56. № 6. P. 1666–1671.
18. Howard J., Fox S. Review of current research projects and innovations in remediation // Gen. Eng. News. 1994. V. 14. № 17. P. 8–9.
19. Tursman J.F., Cork D.J. Subsurface contaminant bioremediation engineering // Crit. Rev. Env. Contr. 1992. V. 22. № 5. P. 1–26.
20. Biodegradation of chemical warfare agents: demilitarization applications. Edgewood, USA, 1993.
21. Biocatalytic degradation of chemical warfare related materials. Edgewood, USA, 1995.
22. De Frank J.J., Cheng Tu-Chen, Rolakowsky G.E., Harvey S. Advances in the biodegradation of chemical warfare agents and related materials // Abstr. Keystone symp. Environ. Biotechnol., Lake Tahoe, Calif., March 16–22, 1995.
23. Tu-Chen Cheng, Harvey S.P., Chen G.L. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorous nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme // Appl. Env. Mikrob. 1996. V. 62. № 5. P. 1636–1641.
24. Dumas D.P. et al. Inactivation of organophosphorous nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // Arch. Biochem. Biophys. 1990. V. 277. № 1. P. 155–159.
25. Dumas D.P. et al. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 19655–19659.
26. Landis W.G. et al. Identification and comparison of the organophosphate acid anhydrase activities of the clam // *Rangia cuneata*. Comp. Biochim. Physiol. 1989. V. 94C. № 2. P. 365–371.
27. Harvey S., De Frank J.J., Kamely D. et al. Microbiol degradation of agent orange and mustard related compounds // Biotechnology: bridging research and applications // Eds. Kamely D., Chakrabatry A.M., Komguti S.E. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, 1991. P. 221–230.
28. Патент на изобретение № 2408724 зарегистрирован 10 января 2011 г. Бюл. № 1. Способ биоразложения фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа Vx.
29. Патент на изобретение № 2360967 зарегистрирован 10 июля 2009 г. Бюл. № 19. Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток бактерий для разложения метилфосфоновой кислоты и её эфиров.
30. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Иммобилизованные биокатализаторы на основе органофосфатгидролазы в процессах разложения фосфорорганических отравляющих веществ // Теоретическая и прикладная экология. 2011. № 4. С. 26–31.
31. Ефременко Е.Н., Сироткина М.С., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Иммобилизованные гетерогенные биокатализаторы для разложения фосфорорганических отравляющих веществ // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2011. № 1. С. 61–66.
32. Dechets dangereux: programme de traitement par biodegradation // Bio la letter des biotechnologies. 1989. V. 196. P. 67.
33. Бекер С., Дерре Р., Штельд Е. Безопасное уничтожение высокоокисных веществ // РХЖ. 1993. Том 37. № 3. С. 29–33.
34. Mudrack K., Sahn H., Sitting W. Environmental biotechnology // Fundamentals of biotechnology. Ed. P. Prave et al. Weinheim, V.C. Verlag GmbH., 1987. P. 633–660.
35. Sterritt R.M., Lester J.N. Microbiology for environmental and public health engineer // London, New York E. & F.N. Spon., 1988.
36. Esposito M.P., McArdle J.L., Crone A.H., et al. Decontamination techniques for buildings, structure and equipment // Park Ridge etc. Noyes Data Corporation U.S.A, 1987.
37. Уткин И.Б., Якимов М.М., Козляк Е.И., Рогожин И.С. Деструкция токсичных соединений микроорганизмами // Итоги науки и техники. Серия: Биологическая химия. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 43.
38. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза. Л.: Химия, 1987.
39. Hilaire D., Morineaus V., Garrigue H., Block J.C. Biological Decontamination of Nerve Agent VX // Proceedings from the 6th CBN Protection Symposium. Stockholm, Sweden, May 10–15, 1998.
40. Завьялова Н.В., Кротович И.Н., Мягих В.И., Холстов В.И., Ялышев М.Р. Биотехнологические методы уничтожения химического оружия и устранения загрязнения окружающей среды // Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия. Выпуск 2. М.: ВИНТИ, 2000. С. 41–47.

41. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А., Лягин И.В., Сенько О.В. и др. Экологически безопасная биodeградация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // *РХЖ*. 2010. № 4. С. 19–24.
42. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Завьялов В.В., Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В., Холстов В.И. Ферменты и технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // *РХЖ*. 2007. № 2. С. 24–29.
43. Karna J.S., Kilbane J.J., Chatterjee D.K. et al. // *Basic Life Sci.* 1984. V. 28. № 1. P. 3–21.
44. Success in pollution protection // *Biol. Technol.* 1991. V. 9. № 12. P. 1316–1318.
45. Martinetz G. // *Chem. – Techn.* 1989. B. 41. № 8. S P. 342–344.
46. Martinetz G. // *Chem. – Techn. (BRD)*. 1989. B. 18. № 7. S P. 12.
47. Pritchard P.H., Costa C.F. EPAS Alaska oil-spill bioremediation project // *Environ. Sci. Technol.* 1991. V. 25. № 3. P. 372–379.
49. Hutchins S.R. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous-oxide as the thermal electron-acceptor // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 8. P. 2403–2407.
50. Hutchins S.R., Sewell G.W., Kovacs D.A., Smith G.A. Biodegradation of aromatic-hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions // *Environ. Sci. Technol.* 1991. V. 25. № 1. P. 68–76.
51. Ou L.T., Street J.J. Microbial enhancement of hydrazine degradation in soil and water // *J. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1987. V. 39. № 3. P. 544–548.
52. Oltmanns R.H., Muller R., Otto M.K., Lingens F. Evidence for a new pathway in the bacterial-degradation of 4-fluorobenzoate // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. № 10. P. 2499–2504.
53. Ставская С.С., Таранова Л.А., Григорьева Т.Ю. Разрушение алкилсульфоната *Pseudomonas rathonis* // *Микробиология*. 1984. Т. 53. № 2. С. 218–222.
54. Mueller J.G., Chapman P.J., Blattmann B.O., Pritchard P.H. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas-raucimobilis* // *Appl. And Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 4. P. 1079–1086.
55. Fredrickson J.K., Brockman F.J., Workman D.J., Li S.W., Stevens T.O. Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds // *Appl Environ Microbiol.* 1991. V. 57(3). P. 796–803.
56. O'Reilly K.T., Crawford R.L. Kinetics of p-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas sp* // *Appl Environ Microbiol.* 1989. V. 55. № 4. P. 866–870.
57. Kilpi S., Himberg K., Yrjala K., Backstrom V. The degradation of biphenyl and chlorobiphenyls by mixed bacterial cultures // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1988. V. 53. № 1. P. 19–26.
58. Denis Lempereur // *J. Sci. et vie.* 1987. № 842. P. 94–95.
59. Pettigrew C.A., Haigler B.E., Spain J.C. Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a *Pseudomonas* strain // *Appl Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 1. P. 157–162.
61. Munnecke D.M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method // *Appl. Environ. Microbiol.* 1976. V. 32. № 1. P. 7–13.
62. Munnecke D.M. Detoxification of pesticides using soluble or immobilized enzymes // *Process Biochem.* 1978. V. 13. № 1. P. 16–19.
63. Munnecke D.M. Properties of an immobilized pesticide-hydrolyzing enzyme // *Appl. and Environ. Microbiol.* 1977. V. 33. № 3. P. 503–507.
64. Baumgarten J., Blass W., Frommer W. et al. // *Abschluss – bericht, BMFT – FB.* 1982. V. 82. P. 191.
65. Fischer H.F., Munnecke D.M. Bundesforschungsanstalt fuer Landwirtschaft, Brunswick: Institut fuer Bodenbiologie, BMFT-FB–T. 70-046.
66. Mac Rae J.C. Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1989. V. 109. P. 1–87.
67. Kerster K., Delay J. Genus *Alcaligenes* Castellali and Chalmers 1919, 936 // *J.N: Bergey s Manual of Systemati Bacteriology*, Kreig, N.E., Holt. J.G., Eds., Publ.: Williams, Wilkins, Baltimore, 1984. Md. V. 1. P. 361–373.
68. Fedorak P.M., Westlake D.W.S. Selective degradation of biphenyl and methylbiphenyls in crude-oil by 2 strains of marine-bacteria // *Can. J. Microbiol.* 1983. V. 29. № 5. P. 497–503.
69. Krumme M.L., Smith R.L., Egestorff J. et al. Behavior of pollutant – degrading microorganisms in aquifers: predictions for genetically engineered organisms // *Env. Sci. Technol.* 1994. V. 28. № 6. P. 1134–1138.
70. Lauscy A., Holan Z.R., Volesky B. Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically – reinforced biomass of marine algae // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1995. V. 62. № 3. P. 279–282.
71. Sotsky J.B., Green C.W., Atlas R.M. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbons biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments // *Can. J. Microb.* 1994. V. 40. № 11. P. 981–985.
72. Krumme M.L., Smith R.L., Egestorff J. et al. Behavior of pollutant – degrading microorganisms in aquifers: predictions for genetically engineered organisms // *Env. Sci. Technol.* 1994. V. 28. № 6. P. 1134–1138.
73. Sirotkina M., Lyagin I., Efremenko E. Hydrolysis of organophosphorus pesticides in soil: New Opportunities with ecomhatible immobilized His6–OPH // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. № 68. P. 18–23.
74. Патент РФ на изобретение № 2451077 от 20 мая 2012. Бюл. № 14. Способ ферментативного гидролиза фосфорорганических соединений в почвогрунте.