

УДК 577.15+623.459

Биокатализаторы на основе штаммов микроорганизмов и ферментов, обладающих повышенной способностью к разложению отравляющих веществ и продуктов их деструкции, в процессе очистки почв и вод

© 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 возможно использовать для обеззараживания почв и очищения вод, загрязнённых ОВ и продуктами их деструкции.

В ходе проведения анализа были найдены данные, свидетельствующие о возможности осуществления детоксикации малых концентраций ОВ и продуктов их деградации в реакционных массах, в почве и сточных водах. Определено, что детоксикация осуществляется путём минерализации с помощью биокатализаторов на основе микроорганизмов-деструкторов и ферментов.

Анализ позволяет в дальнейшем: обосновать выбор штаммов и ферментов, отличающихся высокой разрушающей способностью и достаточной толерантностью к ОВ; разработать направления и технологические схемы получения экиобиопрепаратов (биокатализаторов) на основе бактерий-деструкторов и ферментов; разработать технологические схемы проведения биоремедиации загрязнённых почв и очистки вод, при помощи биокатализаторов – иммобилизованных клеток бактерий и ферментов, в местах бывшего производства, хранения, уничтожения и исследования ОВ.

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

During analyzing the data was found, indicating about facilities of low concentrations of detoxication agents and their degradation products in the reactionary missing the soil and waste water. It was established, that the destruction of these substances can be performed using biocatalysts, based on microorganisms-destructors and enzymes.

On a base of analyzing further possible to justify the choice of enzymes and strains, differ from high destructive capability, and sufficient tolerance to agents, develop direction and flow diagrams for eco-bio preparation (biocatalysts) based on bacteria-destructors and enzymes. The technological scheme of the bioremediation of contaminated soils and water purification, using biocatalysts immobilized cells of bacteria and enzymes in the former site of the production, keeping, destruction and research of agents.

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

В качестве приоритетных направлений в области обеспечения химической и биологической безопасности «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу», предусматривают осуществле-

ние комплекса мероприятий по нейтрализации химических угроз, предупреждению и минимизации рисков негативного воздействия химических факторов, повышению защищённости населения и окружающей среды. Такая нейтрализация возможна в случае разработки и применения биологических технологий, снижающих риск негативного воздействия опасных химических факторов на население

и окружающую среду при ликвидации (обезвреживании) выведенных из эксплуатации химически опасных объектов и при проведении очистки территорий, загрязнённых в результате их деятельности.

Разнообразие природных условий, в которых расположены объекты по хранению и уничтожению химического оружия, характер и степень загрязнения окружающей среды вокруг этих объектов исключают возможность использования абсолютно идентичных схем, технологий и препаратов детоксикации высокотоксичных химикатов.

Поэтому для удаления и детоксикации токсичных веществ, загрязняющих окружающую среду на объектах по хранению и уничтожению химического оружия, могут быть использованы биокатализаторы, как на основе ферментов, микроорганизмов-деструкторов, так и природные микроорганизмы почвы. Использование штаммов микроорганизмов-деструкторов и ферментов выгодно отличается отсутствием вторичных отходов, высокой степенью деградации, возможностью полной ассимиляции продуктов, экономичностью и эффективностью, избирательностью по отношению к субстратам и не требует сложного оборудования.

Использование биокатализаторов на основе штаммов микроорганизмов и ферментов, обладающих повышенной способностью к разложению отравляющих веществ и продуктов их деструкции, в процессе очистки почв и вод

В начале 1990-х годов в научной литературе появились сообщения, касающиеся разложения ОВ в почве и водных растворах с участием микроорганизмов и ферментов [1–4].

Группой исследователей получен фермент, способный разрушать химические связи в ОВ нервнопаралитического действия (зарин, зоман, табун). Фермент – ангидралаза фосфорорганической кислоты продуцируется микроорганизмом *Tetrahymena thermophile* и может быть использован для обеззараживания почвы и других природных сред [5].

Установлено, что многие природные штаммы микроорганизмов содержат ферменты, способные вызывать гидролиз ингибиторов ацетилхолинэстеразы, включая диизопропилфторфосфонат (ДФФ), зоман и другие фосфорорганические соединения.

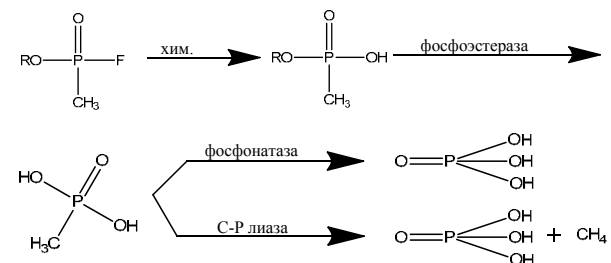
Фосфотриэстеразы, выделенные из штамма *Pseudomonas diminuta*, позволяют с высокой эффективностью проводить расщепление С-Р связи в молекулах зарина и зомана [5], а фермент пропилфторфосфатаза, полученный из клеток *Ps. diminuta* MG, осуществлял расщепление ДФФ [6, 7].

В работе [8] показано, что несколько видов морских бактерий, способных продуцировать нетоксичные ферменты, разрушают ФОВ в условиях химического заражения местности.

Поскольку ферменты – это биологические катализаторы, поэтому для нейтрализации загрязнённых территорий (почв и вод) потребуется небольшое их количество. Подтверждено, что важнейшим преимуществом ферментативных процессов детоксикации является их совместимость с любыми биологическими системами. Эта совместимость обуславливает экологическую безопасность процесса ферментативной деструкции малых концентраций ОВ и продуктов их детоксикации для территорий ОХУХО, сточных вод и отходов.

Процесс биотрансформации фосфорорганических отравляющих веществ может проходить под действием не только ферментов, выделенных из клеток бактерий, но и анаэробных и аэробных штаммов микроорганизмов или их ассоциаций, а также под действием дрожжей и грибов [9–12]. Анаэробное разложение под действием метаногенных микроорганизмов протекает при pH = 4–10, температуре от 5 до 60°C, в течение от нескольких суток до нескольких месяцев. Бионейтрализация ОВ и продуктов детоксикации делает процесс их уничтожения полностью необратимым.

По мнению учёных [13], микробиологическое разложение фосфорорганических отравляющих веществ может протекать по следующей схеме:



Деградация соединений, содержащих С-Р связь, в том числе О-изопропиловый и О-пинаколиновый эфиры метилфосфоновой кислоты (МФК), являющиеся продуктами гидролиза зарина и зомана, осуществляется практически полностью путём непосредственного расщепления С-Р связи с выделением

метана почвенными псевдомонадами, в частности, штаммом *Ps. testosterone* [14].

Аналогичные данные были получены при изучении разложения хлорметил-, пропил-, бутил-, фенил- и других замещённых фосфонатов достаточно большим количеством микроорганизмов, находящихся в условиях фосфорного голодания [15, 16].

Поиск путей микробиологического разрушения соединений, содержащих С-Р связь, чаще всего проводили с помощью имитатора – метилфосфоновой кислоты (МФК). Так, в работе [17] показано, что МФК может разрушаться клетками *Ps. aeruginosa*, *Agrobacterium radiobacter*, а также *Escherichia coli*. Авторами установлено, что более выгодно для разложения МФК использовать плотные суспензии адаптированных клеток, так как при этом не требуется строгого соблюдения стерильности. Обнаружено, что важным фактором, регулирующим разложение МФК, является аэрация. Наиболее интенсивно процесс разложения протекает в анаэробных условиях. Кислород удлинит латентный период. При этом его влияние на рост культуры и разложение МФК зависит от концентрации субстрата в среде.

Из почвенных бактерий выделен фермент органофосфатгидролаза, разлагающий зоман и зарин [18].

Гидролизующей активностью по отношению к зоману также обладают ферменты моллюска *Rangia cuniota*. Установлено, что активность фермента моллюска может усиливаться в присутствии иона марганца [19].

Экспериментально показано, что фермент фосфотриэстераза, выделенный из *Ps. diminuta*, также активен при инактивации ФОВ [20]. Позднее были идентифицированы гены, кодирующие синтез данных ферментов, имеющих специфическую активность по отношению к зарину.

Известно, что продукт детоксикации ФОВ – метилфосфоновая кислота стабильна в окружающей среде, так как она стойка к гидролизу и термическому разложению. Это соединение было обнаружено спустя 10 лет после заражения сухой почвы на полигоне Дагуэй (США). Скорость разложения МФК в окружающей среде определяется процессами биодеструкции и прочностью связи С-Р, испарение кислоты из воды невозможно, так как МФК в воде может диссоциировать [21–23].

Установлено, что чем сильнее молекулярное строение того или иного загрязнителя отклоняется от строения близких природных

веществ, тем сложнее идёт процесс его биологического разложения [24].

Способность микроорганизмов использовать фосфорорганические соединения с С–Р связью в качестве единственного источника фосфора известна сравнительно давно. Впервые доказательство биологического расщепления С–Р связи было получено на примере *Escherichia coli*, которая в качестве единственного источника фосфора использовала метилфосфоновою или этилфосфоновою кислоты [25].

Анализ работ по микробиологическому разрушению фосфонатов показал, что в природе существует большое количество микроорганизмов-деструкторов фосфонатов, относящихся к разным систематическим группам. Такие микроорганизмы были выделены как из загрязнённых, так и, из незагрязнённых фосфонатами источников окружающей среды. Однако разлагать фосфонаты способны, скорее, только особые штаммы или определённые их ассоциации [26]. Это свидетельствует о более широком распространении фосфонат-разлагающих микроорганизмов, чем предполагалось ранее [10]. Было подтверждено отсутствие способности к деградации фосфонатов эукариотическими организмами. В то же время отмечена способность к деградации у фотосинтетического организма *Rhodobacter capsulatus*, галофильных бактерий *Chromohalobacter marismortui* и термофильных бактерий *Geobacillus caldoxylosilyticus*.

Большинство бактерий, способных разрушать фосфонаты по С–Р лиазному механизму, относятся к грамтрицательным бактериям, однако известны и представители грамположительных бактерий – *Arthrobacter sp. GLP-1* и *Bacillus megaterium*, обладающие подобной способностью. У других грамположительных бактерий С–Р лиазная активность не обнаруживалась. С–Р лиазную активность проявляют в основном отдельные представители семейств *Arthrobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*) и *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Agrobacterium*).

Наименее изученными являются процессы микробиологического разложения иприта – бис (2-хлорэтил) сульфида. С одной стороны, это вещество гидролизует в присутствии воды с последовательным образованием иприт-хлоргидрина и тиодигликоля, а с другой – имеются примеры поражения людей остатками иприта через 50 лет после

его попадания в почву [27]. Результатов непосредственного экспериментального изучения динамики изменения концентрации иприта в почвах в литературе нет. Возможно, что при недостатке воды в почвах иприт разлагается с образованием 1,2-бис (2-хлорэтилтио) этана и более высокомолекулярных аддуктов, а также 1,2-дихлорэтана и 1,4-дителиана. Предполагают, что иприт достаточно долго сохраняется в почве в капсулированном виде в высокомолекулярных продуктах, что замедляет его растворение и разложение [28].

В литературе имеются данные, свидетельствующие, что в водных системах происходит полное разложение иприта под действием бактерий *Ps. testosterone* и *Ps. putida*, выделенных из донного ила Мексиканского залива и утилизирующих тиодигликоль [29].

Рассматривая возможность биодеструкции иприта в водных средах, стоит отметить тот факт, что иприт сам по себе плохо растворяется в воде. Кроме того, при контакте с водой он принимает шарообразную форму и его частицы образуют нерастворимую оболочку. Эти глобулы чрезвычайно устойчивы к воздействию факторов окружающей среды. Поэтому для деструкции иприта в водной среде используют системы органических растворителей в смеси с водой. В работе [30] показана возможность использования ферментов для разложения иприта с применением 17 различных органических растворителей и воды. Было отмечено, что присутствие воды необходимо для успешного процесса деструкции данного ОВ.

Известно, что иприт и органоарсеныты необратимо воздействуют на молекулы биообъектов. Так, технический иприт и рецептура иприта реагируют с нуклеиновыми кислотами в организме с образованием мутаций. Это, в свою очередь, может ограничивать применение микроорганизмов для уничтожения иприта и органоарсенита. Применение же бактерий для разложения продуктов их нейтрализации является весьма эффективным.

Чрезвычайно сложной представляется очистка окружающей среды от мышьяка. Для снижения концентрации арсенитов в грунтовых водах до предельно допустимого уровня (50 мкг/мл) предлагается адсорбция их из водоносных пластов на мелкодисперсном алюминии [31]. Одновременно как наиболее перспективный способ удаления мышьяка из почв рассматривается адсорбция его с предварительной обработкой

почвы биоокисляющими микроорганизмами. Технология сходна с технологиями, используемыми в процессе добычи металлов. При этом происходит концентрирование содержащегося в почве мышьяка [32]. Исследования, проведенные с использованием лабораторного реактора непрерывного действия, показали, что бактерии *Sulfolobus*, окисляющие арсениопириты, обеспечивают полный переход содержащегося в почве мышьяка в раствор [33]. Выделенные из загрязнённой мышьяком окружающей среды бактерии *Ps. putida* оказались резистентны к его высоким концентрациям (10 г/л). Эти микроорганизмы разлагают метилированные производные мышьяка, что может быть использовано при биотехнологическом восстановлении почв.

Известно, что растения способны абсорбировать мышьяк и другие тяжёлые металлы из почв и грунтов и тем самым очищать их. В патенте [34] предложен способ очистки почв, загрязнённых продуктами природного и техногенного разложения токсичных веществ.

Для очистки почв от тяжёлых металлов используют сельскохозяйственные растения: сорго, суданскую траву, подсолнечник. При этом отмечается, что доступность тяжёлых металлов растениям не постоянна. Она варьируется от одного вида растений к другому, зависит от почвенных и климатических условий. К почвенным факторам, значительно влияющим на доступность поглощения тяжёлых металлов, относятся: механический состав, реакция (рН) почвы, содержание органического вещества, катионообменная способность и дренаж [35].

Для обеспечения экологической безопасности водных объектов, в которые сбрасываются сточные воды с объектов по хранению и уничтожению химического оружия, содержащие «осколки» различной химической природы, необходима система доочистки стоков от загрязнителей до регламентируемых уровней.

Так, для очистки стоков, содержащих избыточное количество фосфора, необходимо предварительное проведение трансформации в легкодоступные для бактерий формы. Например, микроорганизмы *Bacillus megaterium phosphaticum* превращают труднодоступные формы фосфора в легкоусвояемые [36].

Биологическое окисление и восстановление фосфора имеет ряд особенностей. Фосфор, подобно азоту и сере, имеет ряд валентностей от P^{3-} в фосфористом водороде до P^{5+} в ортофосфорной кислоте. Но, в противо-

положность азоту и сере, почти не обращалось внимания на способность микробов перевести фосфор из одной степени окисления в другую. Микроорганизмы в присутствии органического вещества способны в анаэробных условиях восстанавливать соли фосфорной кислоты вплоть до фосфористого водорода. Процесс, по-видимому, в биохимическом отношении аналогичен денитрификации [37].

Создание в очистных сооружениях чередования аэробных и анаэробных условий, может привести к активации механизма клеточного накопления и стимулирования процессов денитрификации и адсорбции фосфатов.

Наблюдения за работой производственных очистных сооружений показывают, что активный ил, выдержанный в анаэробных условиях, содержит двухвалентное железо в форме сульфида железа и фосфата закиси железа. При использовании такого ила в качестве биогенных добавок и источника Fe^{2+} в аэротенках развиваются бактерии *Leptothrix*, в метаболизм которых включается фосфат закиси железа. Он накапливается в пустых отмерших клетках бактерий в виде фосфата железа, который удаляется с избытком активного ила. В очищенной таким методом воде полностью отсутствует фосфор [38].

Аэробная биологическая очистка сточных вод ведёт к минерализации значительной части окисляемых бактериями органических веществ, но обычно не способна устранить более 50% фосфорных соединений. Возникающие трудности связаны с нарушением оптимальных соотношений углерода, азота и фосфора в активном иле, при которых оптимизирован процесс микробной утилизации этих соединений. В связи с этим при очистке сточных вод от азота и фосфора используют широко распространённый способ применения культур микроводорослей.

Имеются сообщения об успешном использовании смешанных культур бактерий и водорослей родов *Chlorella* и *Scenedesmus* для очистки сильно загрязнённых стоков. При этом достигается очистка на 90% по азоту и фосфору [39, 40].

Одним из распространённых методов очистки сточных вод является очистка с помощью альгологических культур в биопрудах. Этот метод не только экономичен, но и достаточно эффективен. Стоимость очистки в биологических прудах на единицу эффективности составляет 0,01 стоимости всей биологической очистки. Реализация водорослей,

выращенных на сточных водах, полностью возмещает стоимость обработки сточных вод.

Активный ил, включающий водоросли, при 10-часовом пребывании бытовых сточных вод в специальном пруду может обеспечивать их очистку на 97%, снижение азота на 92%, фосфора – на 74% [40].

В работе [41] установлено, что зелёные водоросли извлекают от 50 до 96% фосфора при концентрации 10-20 мг/л в течение 2-3 суток.

Анализ литературных данных по очистке сточных вод от соединений фосфора показал, что наиболее перспективным методом является комбинированный метод, сочетающий химическое осаждение с микробиологической очисткой [42–48]. Осаждение фосфатов в этом методе осуществляется путём добавления водорастворимой соли алюминия, кальция, железа или солями редкоземельных элементов (хлорид или сульфат лантана). Отделение осаждённых фосфатов можно облегчить применением флокулянта, водорастворимого органического полиэлектролита, например, частично гидролизованного полиалкиламина [49, 50].

Известны комбинированные физико-биологические методы удаления фосфора из сточных вод, примером такого метода является использование мембранного разделителя, через который пропускаются сточные воды после обработки их бактериями, потребляющими фосфор [51].

Необходимо отметить, что после применения таких комбинированных методов очистки, даже при минимальном содержании в них контролируемых загрязнителей, необходимо проведение токсикологического анализа очищенных сточных вод в связи с тем, что сложные органические вещества при разложении способны соединяться с различными продуктами метаболизма микроорганизмов с образованием весьма токсичных продуктов биосинтеза.

Токсикологическую оценку качества обезвреживаемых стоков рекомендуется проводить биотестированием с использованием живых водных организмов [52–55].

Биотестирование даёт гарантированную оценку безопасности очищенных сточных вод и позволяет выбрать такие способы очистки, которые обеспечивают не только достаточное разложение загрязнений, но и полную детоксикацию сточных вод. Это особо важно при глубокой биологической очистке воды, содержащей продукты деструкции отравляющих веществ.

Достоинства и недостатки биотехнологий и комплексов нейтрализующих средств для обеззараживания и очищения почв, грунтовых и сточных вод бывших объектов по хранению и уничтожению химического оружия

Накопленные современные знания в области фундаментальной и прикладной микробиологии, генетической инженерии и инженерной энзимологии позволяют разработать научно-техническую базу для проведения биотехнологических процессов, обеспечивающих экологически безопасную очистку почв и вод, загрязнённых малыми концентрациями ОВ и продуктами их деградации.

В настоящее время биотехнологический метод очистки почв, грунтовых и сточных вод рассматривается как дешёвый, высокоэффективный метод, не требующий сложного оборудования, поэтому применение природных микроорганизмов для восстановления нарушенных экосистем по праву занимает приоритетное место в программах Агентства по охране окружающей среды США и многих стран Европы. Особую задачу в этих программах составляет разработка плана общенациональных мероприятий по ликвидации последствий на основе ускорения её естественной деградации с помощью биопрепаратов [56]. Аналогично, в связи с законодательно закреплённой необходимостью проведения восстановительных работ на загрязнённых территориях военных объектов, биотехнологической группой Министерства обороны США создаются комплексные программы деконтаминации почв и подземных вод.

Характерно, что подробной информации о конкретных биотехнологиях в этой области нет. В опубликованных статьях указывается только о стратегии работ в полевых условиях, в которую включаются следующие этапы:

- анализ ситуации в рамках регламента подобных работ властями различного уровня;
- изучение характера и степени загрязнения, а также оценка факторов внешней среды, влияющих на процессы биodeградации;
- лабораторные исследования и научно-технические разработки;
- полевые работы;
- мониторинг и заключение об эффективности проведённых работ в соответствии с существующими стандартами.

Во многие проекты микробиологического восстановления загрязнённых экосистем

включены этапы пилотных испытаний или завершение разработок лабораторных установок [58, 59].

Биовосстановление *in situ* представляет всё больший интерес, так как решает сразу несколько проблем: не требует больших финансовых вложений, может использоваться для окончательного восстановления экосистем и является по-настоящему природоохранной технологией.

Благодаря тому, что почва содержит огромное многообразие микроорганизмов при оптимизации основных параметров их жизнедеятельности достигается быстрая и эффективная трансформация многих веществ органического происхождения, загрязняющих окружающую среду.

В случаях, когда загрязняющие соединения, попавшие в почву или водоёмы, не являются сильно токсичными, возможно использование обычных агротехнических приёмов с внесением необходимых минеральных удобрений и извести, которые способствуют быстрому самоочищению пахотного слоя почвы. Когда же загрязнения являются высокотоксичными и глубина проникновения ксенобиотиков значительна, то процессы самоочищения не работают. В таких случаях необходимо внесение специально созданных биопрепаратов на основе ферментов, иммобилизованных клеток бактерий – деструкторов, а также необходима разработка технологии биоремедиации (очистка и восстановление) почв и вод.

К достоинствам биотехнологических методов и биотехнологий, широко применяемым в различных сферах, относят наличие у них:

- достаточно большой скорости процесса биохимического разложения;
- высокой степени деградации загрязнителей;
- избирательности по отношению к субстратам;
- возможности проведения деградации до желаемых конечных продуктов;
- экологической чистоты процесса;
- экономичности.

Широкому использованию препаратов на основе иммобилизованных ферментов, для очистки почв и вод способствуют следующие их качества:

- гидролитический процесс может быть осуществлён в нейтральных, слабощелочных и слабощелочных средах;
- скорости ферментативных реакций весьма широки, в силу чего могут быть достигнуты

высокие степени конверсии в ограниченные промежутки времени;

ферменты совместимы с любыми биологическими системами, что обуславливает экологическую безопасность самого процесса ферментативного разложения малых концентраций ОВ и продуктов их детоксикации.

К недостаткам биотехнологической очистки почв и вод можно отнести тот факт, что чаще всего за рубежом в качестве катализатора на основе клеток бактерий-деструкторов используют рекомбинантные микроорганизмы, полученные в ходе генно-инженерных исследований. В настоящее время такие штаммы ограничиваются законодательством во многих странах к применению в полевых экспериментах.

Заключение

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

Для обеспечения безопасности и экологической чистоты территорий, очистки и восстановления загрязнённых почв, сточных и грунтовых вод в местах бывшего производства, хранения и уничтожения ОВ необходимы современные и эффективные технологии и методы обеззараживания, которые обеспечили бы восстановление и защиту окружающей среды.

Анализ исследований, проведённых отечественными и зарубежными учёными, показал, что используя методы биodeградации реакционных масс, биоремедиации загрязнённых почв и очистки вод, можно достичь полного разрушения продуктов детоксикации ОВ и повышения уровня восстановления почв, грунтовых вод за счёт уничтожения попавших в них токсичных химикатов.

В ходе проведения анализа были найдены данные, свидетельствующие о возможности осуществления детоксикации малых концентраций ОВ и продуктов их деградации в реакционных массах, в почве и сточных водах. Определено, что детоксикация осуществляется путём минерализации с помощью биокатализаторов на основе микроорганизмов-деструкторов и ферментов.

В разрабатываемых в последнее время за рубежом комплексных программах по

деконтаминации почв и подземных вод большое внимание уделяется биотехнологическим подходам дегазации отравляющих веществ. Информация о конкретных разработках в этой области носит конфиденциальный характер, а важные технологические сведения патентуются.

Представляется целесообразным будущие биотехнологии для очистки почв и вод, загрязнённых ОВ и продуктами их деструкции, разрабатывать на основе следующих технологических принципов:

- 1) использование биореакторов для очистки сильнозагрязнённых вод, а также смесей почв и вод;
- 2) обработку *in situ* осуществлять за счёт стимуляции роста природных микроорганизмов-деструкторов путём аэрации и введения питательных веществ;
- 3) обязательно вносить в загрязнённую почву и грунтовые воды биокатализаторы (биопрепараты) на основе иммобилизованных бактерий-деструкторов и ферментов.

Литература

1. 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.
2. Бакулин Ю.С., Завьялова Н.В., Харечко А.Т., Холстов В.И. и др. Экспериментальная проверка биодеструкции реакционных масс химической детоксикации ФОВ фосфонат-разлагающими бактериями // Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия. Выпуск № 2. М.: ВИНТИ, 2000. С. 47–52.
3. Петров С.В., Холстов В.И., Завьялова Н.В., Мягих В.И. Биodeградация фосфорорганических отравляющих веществ // Федеральные и региональные проблемы уничтожения химического оружия. М.: ВИНТИ, сборник выпуск № 1. 1999. С. 51–60.
4. Kiernan V., Bacteria with a healthy appetite for mustard gas // New Sci. 1994. V. 141. № 1914. P. 10–11.
5. Landis W.G. et al. Alternative substrates and an inhibitor of the organophosphate acid anhydrase activities of the protozoan *Tetrahymena Thermophilia* // Comp. Biochim. Physiol. 1989. № 2. P. 211–216.
6. Trapp R. // SIPRI Chemical and Biological Warfare Studies. London, Philadelphia: Taylor and Francis Ltd., 1985. № 3.
7. Attaway H., Nelson J.O., Baya A.M. et al. // Appl. And Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 7. P. 1685–1689.
8. De Frank J.J., Cheng T.-C. Purification and properties of organophosphorous acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate // J. Bacteriol. 1991. № 173. P. 1938–1943.

9. Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 895–903.
10. Smith J.D. Metabolism of Phosphonates // *The role of phosphonates in living systems.* Hilderbrand, R.L., CRC Press, Boca Raton. 1983. P. 31–54.
11. Selvapandiyam A. and Bhatnagar Raj K. Isolation of glyphosate-metabolising *Pseudomonas*: detection, partial purification and localization of carbon-phosphorus lyase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V 40. P. 876–882.
12. Shinabarger D.L. and Braymer H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982 // *J. Bacteriol.* 1986. V. 168. P. 702–703.
13. Daughton C.G., Cook A.M., Alexander M.J. // *Agric. Food. Chem.* 1979. V. 27. № 6. P. 1375–1382.
14. Kaaijk J., Frijlink C. Degradation of S-2-DI-isopropylaminoethyl O-ethyl methylphosphonothioate in soil – sulfur-containing products // *Pesticide Science.* 1977. V. 8. № 5. P. 510–514.
15. Cook A.M., Daughton C.G., Alexander M. Benzene from bacterial cleavage of the carbon-phosphorus and of phenylphosphonates // *Biochem. J.* 1979. V. 184. № 2. P. 453–455.
16. Daughton C.G., Cook A.M., Alexander M. Biodegradation of phosphonate toxicants yields methane or ethane on cleavage of C-P bond // *FEMS Microbiol. Lett.* 1979. V. 5. № 2. P. 91–93.
17. Матыс С.В., Лауринавичюс Л.С., Несмеянова М.А. Влияние условий культивирования на разложение метилфосфоновой кислоты клетками *E.coli*. // *Биотехнология защиты окружающей среды: Тез. докл. Пушино.* 1994. С. 13.
18. Wild J.R., Ruashel. F.M. The genetic and biochemical manipulation of a broad spectrum organophosphate degrading system. Report No: 24002-Ls u.s. Department of the Army Research office Funding 1990. No: DAAZ 03-87-0017.
19. Robinson, J.P.P. Jn: *Chemical Weapons: Destruction and Conversion* // (SPJRJ) New York: Taylor Francis. 1980. P. 9–56.
20. Penski E.C. TR – ARCSL – TR – 83021. AD B07518L Aberdeen Proving Ground, MD: US Army, Res. Devel. Command, 1983.
21. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества. М.: Воениздат, 1990. 271 с.
22. Ашихмина Т.Я. Научно-методологические основы системы комплексного экологического мониторинга объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2001. 473 с.
23. Савельева Е.И., Радилов А.С., Кузнецова Т.А. и др. Определение метилфосфоновой кислоты и её эфиров как химических маркеров фосфорорганических отравляющих веществ // *Журнал прикладной химии.* 2001. Т. 74. № 10. С. 1677.
24. Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Кузнецова Т.А. и др. Исследование продуктов превращений фосфорорганических отравляющих веществ методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии // *ПХЖ.* 2002. Т. 46. № 6. С. 89–92.
25. Small M.J. Compounds formed from the chemical decontamination of HD, GB, and VX and their environmental fate. Tech Rpt8304; AD A149515. Fort Detrick, MD: U.S. Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, 1984.
26. Shames S.L. Fragmentative and stereochemical isomerisation probes for homolytic carbon to phosphorus bond scission catalysed by bacterial carbon-phosphorus lyase / Shames S.L., Wackett L.P., LaBarge M.S., Kuczowski R.L. and Walsh C.T. // *Bioorg. Chem.* 1987. V. 15. P. 366–373.
27. Penski E.C. TR – ARCSL – TR – 83021. AD B07518L Aberdeen Proving Ground, MD: US Army, Res. Devel. Command, 1983.
28. Small V.J. TR – 8202 (AD – B077 091) Fort Detrick, MD: US Army Med. Res. Devel. Command, 1983.
29. Биологическая дегазация отравляющих веществ. Материалы конференции научно-исследовательских институтов НАТО М.: 1991.
30. Milstein O., Nicklas B., Huttermann A. (1989). Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with leacase from *Trametes versicolor* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* № 31. P. 70–74.
31. Clifford D., Lin C.C. // *Government Rep.* 1991. V. 91. № 15. P. 50.
32. Kanel A. // *Rev. Polytechn.* 1990. № 5. P. 557–559.
33. Hackl R.P., Wright F.R. Bruynesteyn A. // *Appl. Organometall. Chem.* 1990. V. 4. № 4. P. 245–250.
34. Патент № RU 2185904, Рос. Федерация, С2, опубл. 27.07.2002 г.
35. Рэуце К. Борьба с загрязнением почвы. М.: Химия, 1986. 97 с.
36. Авторское свидетельство № 513939 СССР. Способ биохимической очистки сточных вод от органических соединений.
37. Кузнецов С.И. Микрофлора озёр и её геохимическая деятельность Л.: Наука, 1970. 440 с.
38. Головлева Л.А. Деградация пестицидов микроорганизмами: биотехнологические аспекты проблемы // *Микробиология очистки воды: Тез. докл. 1 Всесоюз. конф. Киев: Наук. Думка, 1982. 244 с.*
39. Леонова Л.И., Ступина В.В. Водоросли водоочистки сточных вод. Киев: Наук. Думка, 1990. 207 с.
40. Тарасенко Н.Ф., Захарчук Р.В. Очистка сточных вод биоценозами микроводорослей и бактерий активного ила // *Микробиология очистки воды. Киев: Наук. Думка, 1982. 193 с.*
41. Simonds M.A. Experience with algal bloom and the removal of phosphorum from sewage // *Water Res.* 1973. V. 7. № 1. P. 255–264.

42. Способ химической и биологической обработки сточных вод. Франция. Заявка. Заявл. 12.03.1969. № 2004566. Оpubл. Официальный бюллетень промышленной собственности, № 1-5. МКИ: С02 С1/00.
43. Способ удаления больших количеств фосфатов из сточных вод. США. Патент. Заявл. 10.04.1972. № 3716484. Оpubл. Изобретения за рубежом, 1973. № 3. МКИ: С02 С1/40 кл. США 210-52.
44. Обработка сточных вод. ФРГ. Заявка. Заявл. 3.06.1970. № 2016798. Оpubл. Патентные заявки ФРГ, 1970. № 47. МКИ: С02 С1/00, кл. ФРГ 85с-1.
45. Обработка сточных вод. Франция. Патент. Заявл. 10.04.1970. № 2043202. Оpubл. Официальный бюллетень промышленной собственности, 1971. № 9-12. МКИ: С02 С1/00.
46. Способ удаления фосфатов из сточных вод путём обработки окислом железа. США. Патент. Заявл. 20.11.1967. № 3499837. Оpubл. Официальный бюллетень по материалам патентного ведомства США, 1970. март. МКИ: С02 С5/02. Кл. США: 210-59.
47. Способ очистки от загрязнений фосфорорганическими пестицидами. США. Патент. Заявл. 24.11.1972. № 3725269. Оpubл. Изобретения за рубежом, 1973. № 6. МКИ: С02 С5/02. Кл. США: 210-59.
48. Способ химической и биологической обработки сточных вод. Франция. Патент. Заявл. 12.03.1969. № 2004566. Оpubл. Официальный бюллетень промышленной собственности, № 1-5. МКИ: С02 С1/00.
49. Удаление фосфатов из обработанной воды. США. Патент. Заявл. 31.07.1970. № 3617569. Оpubл. бюл. по матер. Патентных ведомств США, 1971. Ноябрь 1-3; МКИ: С02 С1/40. Кл. США 210-53.
50. Химический способ удаления фосфатов из сточных вод. Франция. Патент Заявл. 23.05.1969, № 32009220. Оpubл. Официальный бюллетень промышленной собственности, 1971. № 10-13, МКИ: С02 С5/00.
51. Способ удаления фосфора из сточных вод. ФРГ. Патент. Заявл. 24.05.1968. № 1959652. Оpubл. Патентные заявки ФРГ, 1971. № 25/1/. МКИ: С02 с; кл. ФРГ 85с-3/02.
52. Авторское свидетельство 228210 СССР. Способ определения токсичности сочных вод, содержащих компоненты РТ. 1984.
53. Авторское свидетельство 258499 СССР. Определение токсичности веществ по интенсивности потребления растворенного кислорода микроорганизмами .1985.
54. ОСТ В-84-2398-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Основные положения.
55. ОСТ В-84-2399-88. Биотестирование отраслевых сточных вод. Методы анализа.
56. Fox J.L. // Ibid. 1991. V. 9. № 11. P. 693.
57. 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.
58. 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.