

*На правах рукописи*



*Орлова Ольга Геннадьевна*

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ  
С ПРОДУКТАМИ ГИДРОЛИЗА ИПРИТА**

Специальность 03 00 07 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Санкт-Петербург – 2007

Диссертационная работа выполнена в лаборатории микологии и микробиологии Санкт-Петербургского Научно-исследовательского центра экологической безопасности (НИЦЭБ) РАН

Научный руководитель

доктор технических наук  
Н Г Медведева

Научный консультант

кандидат биологических наук  
Т Б Зайцева

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,  
профессор Е П Яковлева

кандидат биологических наук  
Л Н Пароменская

Ведущая организация

Санкт-Петербургский  
Государственный технологический  
институт (технический университет)

25

Защита состоится 25 октября 2007г в 11 00 часов на заседании диссертационного совета (К 006 028 01) по присуждению ученой степени кандидата биологических наук во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной микробиологии по адресу 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии

Автореферат разослан «06 09» 2007г

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



С М Алисова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы** К числу хлорорганических соединений, представляющих собой устойчивые поллютанты, относится иприт и продукты его гидролиза

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

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

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

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

**Цель исследований** – провести сравнительное изучение чувствительности микроорганизмов к продуктам гидролиза иприта, из числа наиболее устойчивых выделить культуру - высокоактивного деструктора этих продуктов, определить возможный механизм их биодеструкции.

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

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

ПГИ в условиях почвы

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые изучены характер, и степень воздействия смеси продуктов гидролиза иприта на рост микроорганизмов различных таксономических групп. Показано, что повышенная чувствительность к этому загрязнителю характерна для микромицетов и актиномицетов и в меньшей степени для дрожжей. Бактерии отличаются наибольшей устойчивостью к этим веществам.

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

В результате скрининга толерантных к смеси ПГИ бактерий выделена культура, отличающаяся способностью к полному их потреблению при высоких концентрациях в среде (2,3 г/л ХОС и 20 г/л ТДГ). По совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков культура отнесена к роду *Pseudomonas* и обозначена как *Pseudomonas* sp Y-13. Установлено, что эта культура отличается отсутствием патогенных свойств по отношению к теплокровным животным и растениям.

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

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

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

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

**Апробация работы.** Результаты работы доложены на 13-м международном симпозиуме по биоповреждениям и биодegradации

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

По теме диссертации опубликованы 2 статьи и 5 тезисных сообщений

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

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и списка литературы

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

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

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В качестве тест-культур в работе использовали 18 культур мицелиальных грибов, 10 культур актиномицетов, 12 культур дрожжей и 12 культур бактерий разных родов, полученных из разных коллекций. Чувствительность микромицетов и актиномицетов к ТДГ и смеси ПГИ проверяли на агаризованной среде Чапека с глюкозой, дрожжей на среде Сабуро, а бактерий на двух агаризованных средах Чапека с глюкозой и МПА с глюкозой. В состав сред вносили ТДГ в концентрациях от 5 до 100 г/л, или смесь ПГИ – от 0,6 г/л ХОС и 0,5 г/л ТДГ до 6,6 г/л ХОС и 55 г/л ТДГ

Изучение морфологии культур проводили методами просвечивающей (Nayat, 1974) и сканирующей (Spurr, 1969) электронной микроскопии

Об изменении уровня проницаемости клеток микроорганизмов судили по "утечке" из клеток в среду метаболитов, имеющих полосу поглощения в ультрафиолетовой области (220-350 нм) (Federson et al, 1990, Александров и др, 1993, Иванов и др, 1993). Количественное содержание белка определяли методом Лоури (Lowry, et al, 1975), аминокислот - методом тонкослойной хроматографии на пластинах "Silufol" (Munavalli et. al., 1988), ионы калия - фотометрически (Аринушкина, 1970)

Выделение липидов микромицетов проводили методом Фолча (Кейтс, 1975) Состав жирных кислот определяли методом газожидкостной хроматографии по ГОСТ Р51483-99 Амилолитическую активность микроорганизмов определяли по общепринятой методике (Грачева и др., 1982) Каталазную и глюкозооксидазную - по методу, основанному на титрометрическом определении (Борисова, 1973) Активность дегидрогеназ определяли с использованием 2,3,5-трифенил тетразолиум хлорида и выражали в мкг/100 мг а с б (Логинава ЛГ и др., 1961) Количество пигментов учитывали общепринятым методом (Лысенко, Лях, 1977), количество экзополисахаридов методом осаждения их этанолом из нативного раствора (Егоров, 1976) Комплекс целлюлолитических ферментов - методом Мандерс-Вебера (Марчева, 1985)

Микроорганизмы-деструкторы продуктов гидролиза иприта выделяли из почвенных компостов Для этого почвенные образцы (20-25г воздушно-сухой почвы) увлажняли (60% от полной влагоемкости почвы), вносили смесь ПГИ из расчета 0,30 г ХОС/кг почвы и инкубировали в течение 20 суток при температуре 28°C, с периодическим поддержанием влажности

Предварительный отбор толерантных к продуктам гидролиза иприта бактериальных культур проводили путем высева их на твердую среду № 1а следующего состава (г/л)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -4,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -1,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -1,5,  $\text{MgSO}_4$ -0,2, с добавлением (г/л) глюкозы-5,0, дрожжевого экстракта-2,0, смеси ПГИ ( $0,08 \pm 0,006$  ХОС и  $0,72 \pm 0,04$  ТДГ), и агара-20

Способности отобранных культур осуществлять деструкцию ПГИ определяли двумя методами

1 по росту на твердой среде № 1а содержащей (г/л) ТДГ-2,0,  $\text{CaCO}_3$ -2,5, агара -20, pH 7,2-7,4

2 по способности к росту в глубинных условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со стерильной жидкой средой №1 следующего состава (г/л)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -6,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -5,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -5,0,  $\text{MgSO}_4$ -0,2, с добавлением  $\text{CaCO}_3$ -10 г/л и смеси ПГИ, в качестве единственного источника углерода,  $0,78 \pm 0,04$  г /л ХОС и  $7,0 \pm 0,2$  г/л ТДГ, pH - 6,8 - 7,2 Объем среды в колбе - 50 мл

Изучение морфолого-культуральных признаков наиболее активной культуры-деструктора проводили по общепринятым методам (Егоров, 1983, Hugh et al, 1953, Sneath et al, 1974) Оценку фитотоксичности *Pseudomonas* sp Y-13 осуществляли по методу Берестецкого [Берестецкий, 1971] Токсикологические исследования с целью изучения безопасности этой культуры для теплокровных животных по общепринятым методикам (Лабинская и др., 2004)

Культуру хранили на твердой питательной среде № 1а с добавлением (г/л) глюкозы-5,0, дрожжевого экстракта-2,0, смеси ПГИ  $0,015 \pm 0,001$  г/л ХОС и  $0,12 \pm 0,01$  г/л ТДГ, агара -20, pH - 7,0, при 4°C с частотой пересевов - 1 раз в месяц

Изучение свойств выделенной культуры как деструктора проводили при выращивании ее в глубинных условиях в колбах на среде №1, рН - 6,8-7,2, при  $+28 \pm 1^\circ\text{C}$  на роторной качалке ( $n=230$  об/мин) В качестве единственного источника углерода в питательную среду вносили смесь ПГИ (от 0,15 до 2,70 г/л ХОС, содержащую соответственно от 1,2 до 24,4 г /л ТДГ)

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

Количественное определение ТДГ в растворах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе "Hewlett - Packard" HP1090 Для идентификации и количественного определения промежуточных продуктов деструкции ТДГ использовали метод ВЭЖХ (хроматограф HP-1090 с диодно-матричным УФ-детектором и компьютерной системой управления и сбора данных)

Содержание хлорорганических соединений в смеси ПГИ определяли спектрофотометрическим методом (Франке, 1973, Issa et al, 1975)

Изучение токсичности исследуемых почвенных образцов проводили методом фитотестирования (Звягинцев, 1991, Андреюк, 1981)

Математическую обработку результатов проводили методами Ашмарина (Ашмарин и др, 1974) и Максимова (Максимов, 1980)

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Загрязнение почв ТДГ и смесью ПГИ приводит к формированию новых микробных сообществ, характерной чертой которых является повышенный уровень показателя доминирования, понижение уровней сходства и видового разнообразия, что свидетельствует о снижении биоустойчивости системы в целом На изменение видового разнообразия микробного состава в почвах влияет различный уровень чувствительности отдельных групп микроорганизмов к этим ксенобиотикам В литературе весьма ограничена информация о характере и механизмах действия ПГИ, как на природные микробиоценозы в целом, так и на отдельные компоненты микробных сообществ. В настоящем разделе представлены результаты сравнительного исследования степени чувствительности различных микроорганизмов – бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов и дрожжей к смеси ПГИ и основному из них – ТДГ, а также влияния этих субстратов на морфологические и физиолого-биохимические свойства одной из основных групп почвенных микроорганизмов – мицелиальных грибов

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

Как показали результаты, на средах, содержащих ТДГ и смесь ПГИ, наблюдается подавление роста у всех исследованных микроорганизмов. Однако, как и следовало ожидать, степень чувствительности к этим веществам зависит от родовой, а в некоторых случаях и видовой их принадлежности, а также от концентрации ПГИ (рис 1). Однако наибольшую чувствительность проявляют актиномицеты и мицелиальные грибы.

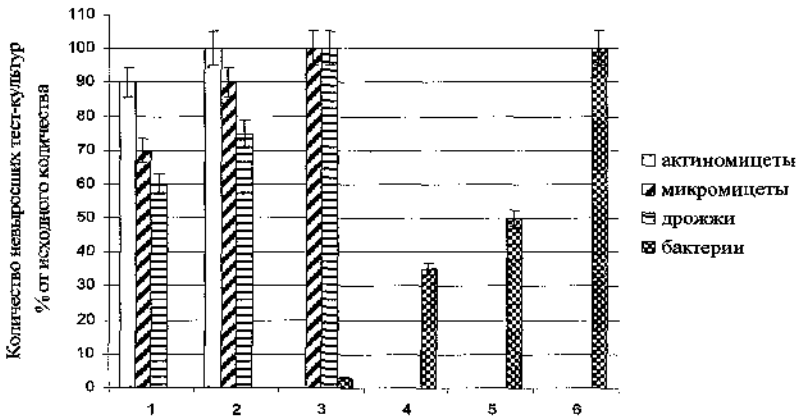


Рис 1 Количество тест-культур микроорганизмов, рост которых отсутствует на среде с различным содержанием ТДГ. Контроль – исходное число тест-культур, 100%

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

При концентрации ТДГ до 20 г/л размер колоний микромицетов уменьшается на 30-40% у всех культур, за исключением грибов родов *Botrytis*, *Helminthosporium*, *Mucor*, у которых признаки подавления роста отсутствуют. При концентрации ТДГ равной 40 г/л отмечается подавление роста 70% культур мицелиальных грибов. Полное подавление роста всех культур микромицетов происходит только при 60 г/л ТДГ.

Значительно большую чувствительность микромицеты проявляют к смеси ПГИ. В силу повышенной токсичности ХОС шаг варьирования его концентраций в среде был меньше, чем ТДГ и составлял около 0,6 г/л по ХОС.

Результаты этих наблюдений показали, что у основной части мицелиальных грибов рост отсутствует уже при концентрации смеси ПГИ



16 г/л ХОС (30 г/л ТДГ), а у всех культур при 4,2 г/л ХОС (35 г/л ТДГ) (рис 2)

Дрожжи по своей реакции на присутствие в среде ТДГ и смеси ПГИ, в целом, сходны с мицелиальными грибами (рис.1,2), однако и в том и в другом вариантах дрожжи проявляют большую устойчивость

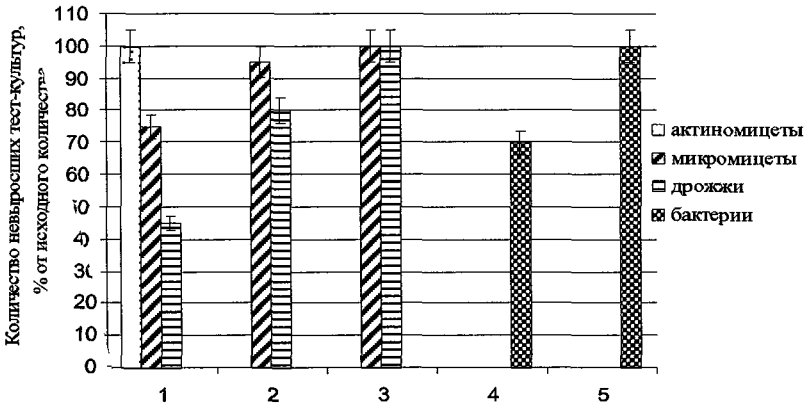


Рис 2 Количество тест-культур микроорганизмов, рост которых отсутствует на среде с различным содержанием смеси ПГИ Контроль – исходное число тест-культур, 100%

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

Самыми чувствительными к ТДГ и смеси ПГИ являются актиномицеты Рост всех исследованных актиномицетов отсутствовал на среде с 50 г/л ТДГ и при самой низкой из испытанных концентраций смеси ПГИ - 1,2 г /л ХОС, 10 г ТДГ/л

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

Полное подавление всех использованных в работе бактериальных культур (12 культур) на среде с ТДГ наблюдается при концентрации 170 г/л ТДГ, а смеси ПГИ – 6,0 г/л ХОС, 50 г/л ТДГ

Таким образом, для бактерий биоцидные концентрации ТДГ в 2,6 раза, а смеси ПГИ в 1,4 раза выше, чем для других микроорганизмов

### 1.2. Действие продуктов гидролиза иприта на некоторые морфологические свойства микроорганизмов

Сравнительно высокая чувствительность грибов к ПГИ позволяет предположить, что загрязнение ими почв приводит к нарушению

жизнедеятельности этих микроорганизмов со всеми вытекающими из этого негативными последствиями

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

Изучение морфологии мицелиальных грибов, выращенных на среде со смесью ПГИ, проводили с использованием двух культур - *Aspergillus terreus* и *Penicillium ochrochloron*. С помощью электронной микроскопии показано, что на среде, содержащей смесь ПГИ в концентрации 1,2 г/л ХОС, 10 г/л ТДГ гифы грибов утолщаются, наблюдается плотное их прилегание друг к другу с образованием плотных тяжей. Плотность прилегания несколько велика, что изменяется форма клеток – создается впечатление, что наружные слои клеточных стенок сливаются. Кроме того, в опытных клетках увеличивается количество митохондрий

Результаты исследования на клеточную проницаемость микромицетов показали, что изучаемые токсиканты способствуют увеличению проницаемости у всех культур на 30–430% по сравнению с контролем. Такой же характер воздействия ТДГ и смеси ПГИ на мембраны наблюдается у дрожжей (родов *Cryptococcus* и *Candida*), однако увеличение проницаемости их мембран менее значительно и не превышает 60%

Результаты сравнительного исследования жирнокислотного состава липидов мицелия, полученного при культивировании *P. ochrochloron* на среде Чапека с ПГИ и без них (контроль) показали, что под действием ПГИ состав жирных кислот существенно изменяется. В опытных вариантах, при концентрации ТДГ равной 20 г/л и смеси ПГИ в 1,2 г/л по ХОС степень ненасыщенности жирных кислот в 1,3 и 2,3 раза выше по сравнению с этими показателями липидов контрольного мицелия. Наблюдаемое изменение в жирнокислотном составе липидов клеток гриба является, по-видимому, одним из проявлений их адаптации к неблагоприятным воздействиям исследуемых веществ

### 1.3. Влияние продуктов гидролиза иприта на физиолого-биохимические признаки микромицетов

**Влияние продуктов гидролиза иприта на активность ферментов у мицелиальных грибов.** В настоящем разделе работы представлены результаты изучения действия ТДГ и смеси ПГИ на активность у микромицетов таких ферментов как дегидрогеназы, амилазы, целлюлазы, каталазы, пероксидазы

Проведенные эксперименты показали, что суммарная активность дегидрогеназ у *Penicillium ochrochloron*, под действием ТДГ и смеси ПГИ, возрастает 2–10 и 3–3,5 раза соответственно, по сравнению с таковой в контрольных условиях. Аналогичные результаты получены в вариантах с использованием *Aspergillus terreus*

Под действием продуктов гидролиза иприта, у культур *A. niger* и *P. fumiculosus* наблюдается одновременная активация каталазы и глюкозооксидазы, у *A. terreus* и *Pochrochloron* активность каталазы снижается при резком увеличении активности глюкозооксидазы, а у *A. versicolor* снижается активность обоих ферментов. Таким образом, характер действия изучаемых веществ – активация или подавление, определяется, прежде всего, свойством каждого штамма, независимо от его родовой принадлежности. Интерпретация полученных результатов в настоящее время затруднена из-за недостаточной изученности механизма функционирования ферментативной системы антиоксидантной защиты в целом (Семашко и др., 2004, Scandalios, 2005).

При исследовании влияния ТДГ и смеси ПГИ на комплекс целлюлолитических ферментов у грибов было выявлено, что оба токсиканта подавляют их активность. Так, под действием ТДГ в концентрации 15 г/л активность ферментов снижается в 1,7-3,5 раза, а под действием смеси ПГИ (1,8 г /л ХОС, 15 г /л ТДГ) в 3-5 раз в зависимости от культуры.

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

**Влияние продуктов гидролиза иприта на образование пигментов и полисахаридов у мицелиальных грибов.** Учитывая, что одной из функций пигментов и полисахаридов является защитная, нами изучен характер действия ПГИ на образование этих метаболитов грибами. Результаты экспериментов показали, что под действием ТДГ в концентрации 20 г/л продуктивность мицелия по пигментам возросла на 14-197%, а под действием ПГИ в концентрации 1,8 г/л на 136-159% в зависимости от культуры. Значительно больший эффект наблюдается в процессе образования полисахаридов. Продуктивность мицелия по экзополисахаридам на среде с ТДГ и смесью ПГИ в тех же концентрациях возросла от 75 до 161% и от 76 до 300% соответственно.

Таким образом, действие ТДГ и смеси ПГИ на микромицеты многообразно и касается как морфолого-культуральных, так и физиолого-биохимических признаков. Характер их воздействия, в принципе, однотипный, однако наибольшую чувствительность они проявляют к смеси ПГИ, что, очевидно, связано с содержанием в ее составе хлорорганических соединений. В настоящее время, определить основной или какой-либо конкретный механизм ингибирующего действия ТДГ и смеси ПГИ на рост мицелиальных грибов не представляется возможным в связи с недостаточной изученностью этого вопроса. Однако не исключено, что оно является итогом всех вышеуказанных воздействий.

Учитывая, что наибольшую устойчивость к ТДГ и смеси продуктов гидролиза иприта, а также способность к их деструкции проявляют бактерии,

нами проведена работа по поиску и выделению из почв высокоактивного деструктора этих загрязнителей именно из этой группы микроорганизмов

## 2. Выделение и отбор бактериальных культур-деструкторов продуктов гидролиза иприта

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

Из приготовленных почвенных компостов высевом на среду № 1а с добавлением глюкозы и дрожжевого экстракта было выделено 210 бактериальных культур, способных к росту в присутствии ПГИ. Из их числа провели отбор культур-деструкторов ПГИ путем посева изолированных бактерий на агаризованную среду № 1а, содержащую в качестве единственного источника углерода смесь ПГИ в концентрации  $0,08 \pm 0,006$  г/л ХОС и  $0,72 \pm 0,04$  г/л ТДГ. Как показали результаты, только 89 культур проявили способность к росту на этом субстрате.

На следующем этапе отбора, в условиях поверхностного роста на агаризованной среде, содержащей 2,0 г/л ТДГ, эти культуры были проверены на способность окислять ТДГ. Определение проводили визуально по просветлению среды в результате растворения карбоната кальция в зоне роста колоний за счет кислот, образующихся при окислении ТДГ. По этому критерию были отобраны 27 бактериальных культур, которые подвергли сравнительной оценке по активности и степени потребления ТДГ при глубинном культивировании в среде, содержащей  $0,78 \pm 0,04$  г/л ХОС и  $7,0 \pm 0,2$  г/л ТДГ.

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

По совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков культура, согласно определителю Берги (Holt et al, 1994), была отнесена к роду *Pseudomonas* и обозначена как *Pseudomonas* sp Y-13.

**Определение патогенности культуры *Pseudomonas* sp. Y-13** В результате проведенных токсикологических исследований на теплокровных животных установлено отсутствие патогенных свойств у культуры *Pseudomonas* sp. Y-13 по таким показателям как вирулентность, токсичность, токсигенность, диссеминация во внутренних органах.

Оценку фитотоксичности *Pseudomonas* sp Y-13 осуществляли по методу Берестецкого [Берестецкий, 1971]. В качестве тест-культуры использовали семена редиса. Показано, что микроорганизмы не оказывали отрицательного действия на проростки редиса.

Эти свойства культуры свидетельствуют о перспективности и целесообразности изучения ее как возможного средства биологической детоксикации ПГИ в природных экосистемах.

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

**Влияние условий культивирования на деструкцию и потребление продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas* sp. Y-13.** С целью повышения эффективности деструкции ПГИ отобранной культурой проведены исследования по влиянию на этот процесс некоторых из основных факторов среды культивирования – температуры, pH, аэрации. Результаты показали, что наиболее благоприятными для роста и потребления субстрата на среде №1, содержащей смесь ПГИ в концентрации  $0,78 \pm 0,04$  г/л ХОС и  $7,0 \pm 0,2$  г/л ТДГ, в качестве единственного источника углерода, являются температура в интервале от  $+24^\circ\text{C}$  до  $+32^\circ\text{C}$ , уровень аэрации  $0,71$  г $\text{O}_2$ /л ч, pH среды в интервале  $7,0 - 9,0$ . При этих условиях наблюдается наибольший прирост биомассы и максимальное потребление ТДГ (на 99,9% от исходного).

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

**Рост и деструктивная активность *Pseudomonas* sp. Y-13 на среде в зависимости от концентрации продуктов гидролиза иприта.** Скорость микробиологических процессов в значительной степени определяется усвояемостью и концентрацией питательного субстрата. Эта зависимость в наибольшей степени проявляется на труднодоступных и, тем более, на токсичных субстратах, какими являются продукты гидролиза иприта.

Результаты, полученные при культивировании *Pseudomonas* sp Y-13 на среде со смесью ПГИ, показали, что с увеличением концентрации этого субстрата продолжительность процесса, в котором ТДГ, входящий в состав смеси, подвергается полной деструкции, возрастает с 3-х до 22 суток (табл 1).

Динамики процессов роста бактерий, потребления ТДГ, а также процесса дехлорирования ПГИ в среде культивирования изучали с использованием среды, содержащей те максимальные количества этих субстратов, при которых происходит полное потребление ТДГ, а именно – 2,3 г/л ХОС, 20 г/л ТДГ. В этих условиях рост культуры завершается через 13-14 суток, а полное исчезновение из среды ХОС и ТДГ наблюдается через 22 дня от начала культивирования (рис 3).

Некоторое увеличение количества ТДГ, наблюдаемое в контрольном варианте происходит, по-видимому, за счет химического гидролиза ХОС,

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

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

тогда как в опытном варианте, в присутствии микроорганизмов, количество ТДГ уменьшается и на 22 сутки культивирования ТДГ полностью потребляется. Рост бактерий коррелирует с убылью ТДГ. Максимальное потребление ТДГ (75% от исходного количества) происходит в период активного роста *Pseudomonas* sp Y-13 (в экспоненциальной фазе).

Длительность лаг-фазы – 4 суток, очевидно, вызвана неблагоприятным воздействием на культуру ПГИ и, прежде всего, ХОС. Это предположение подтверждается тем, что переход культуры в экспоненциальную фазу начинается только после того, как количество ХОС снижается в среднем на 40% (рис 3).

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

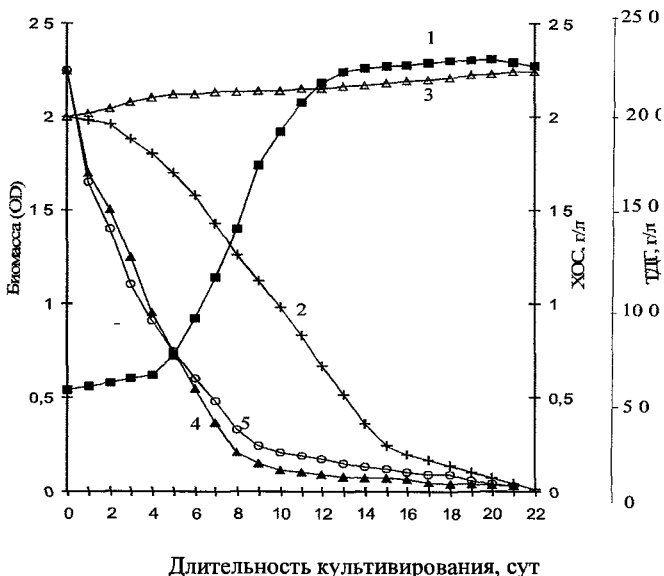


Рис 3 Динамики роста и деструкции ТДГ культурой *Pseudomonas* sp Y-13, процесса дехлорирования ХОС в среде, содержащей ПГИ (2,3 г ХОС/л, 20,0 г ТДГ/л) 1 - рост культуры, 2 – потребление ТДГ в опытном варианте (с культурой), 3 – содержание ТДГ в контроле, 4 – дехлорирование ХОС в опыте, 5 – дехлорирование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

В контрольном варианте динамика химического гидролиза практически полностью совпадает с динамикой убыли ХОС в опытном варианте, что позволяет сделать вывод о неферментативной, небактериальной природе дехлорирования ХОС

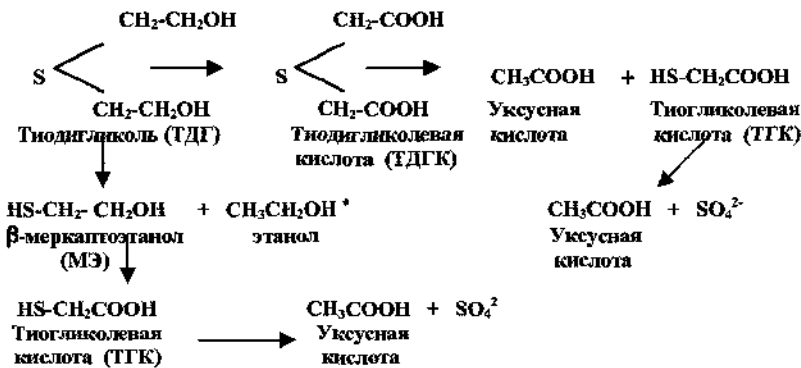
**Образование и потребление промежуточных продуктов деструкции тиодигликоля культурой *Pseudomonas* sp. Y-13.** Изучение путей окисления основного продукта гидролиза иприта – ТДГ выделенной культурой проводили посредством анализа промежуточных продуктов, образующихся в процессе ее роста на жидких средах, содержащих в качестве единственного источника углерода ТДГ

Анализ культуральной жидкости проводили с помощью метода ВЭЖХ В течение всего периода культивирования (за исключением первых суток) в качестве промежуточного продукта деградации ТДГ была идентифицирована тиодигликолевая кислота (ТДГК) Максимальное количество ТДГК в культуральной жидкости коррелирует с полным потреблением ТДГ

Одновременно с образованием ТДГК в культуральной жидкости впервые обнаружено невысокое, но возрастающее в течение экспоненциальной фазы роста, количество  $\beta$ -меркаптоэтанола (МЭ) ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  % масс)

Выделенная культура бактерий использует ТДГК в качестве источника углерода, при этом прирост биомассы тем больше, чем выше концентрация кислоты. При исследовании продуктов, образующихся при росте бактерий на среде с ТДГК, в культуральной жидкости обнаружены тиогликолевая кислота (ТГК) и ацетат, что свидетельствует о разрыве достаточно прочной (энергия связи 64 ккал/моль) C-S связи в ТДГК, что и приводит к образованию этих продуктов. Обнаруженная в качестве продукта деградации ТГК, также используется *Pseudomonas* sp Y-13 в качестве источника углерода. При этом, в качестве промежуточного продукта ее деградации в культуральной жидкости определена уксусная кислота. Меркаптоэтанол (МЭ) в концентрации  $1 \times 10^{-2}$  % не используется бактериями для роста, но через 7 суток полностью трансформируется до ТГК.

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



\* - не определяли

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

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

Эксперименты проводили с использованием образцов верхних горизонтов серой лесной почвы (Московская обл., г Серпухов). В образцы



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

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

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

После 14 недель инкубирования в опытном образце почвы оставалось 0,34 г ТДГ/кг а с почвы, что составляет 4,4% от исходного количества В варианте почвы без культуры обнаружено – 0,49 г ТДГ/кг а с почвы, что составляет 6,3% от исходного

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

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

Показано, что в контрольном образце проявляется большая фитотоксичность, чем в опытном (рис 4) Так, через 10 недель инкубирования в опытном образце при концентрации ТДГ – 1,7 г/кг почвы, всхожесть овса увеличивалась на 58%, длина coleoptilia и длина корня также превышали контрольные показатели в 2 и 1,7 раза соответственно При дальнейшем инкубировании (14, 30 недель) аналогичная тенденция сохраняется

Однако, изучаемые показатели фитотоксичности образцов почвы с ПГИ, как инокулированных бактериальными клетками, так и неинокулированных, значительно ниже, чем в чистой почве (не загрязненной ПГИ)

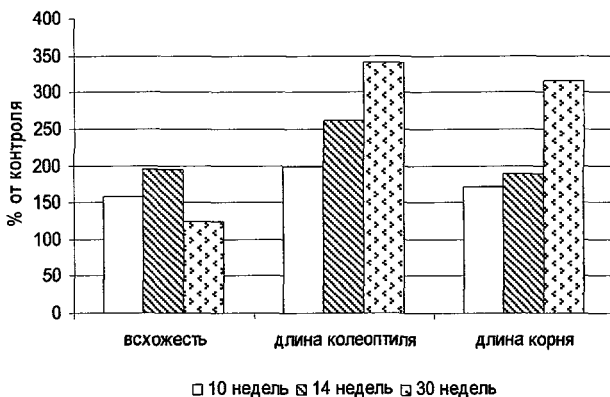


Рис 4 Динамика изменения фитотоксичности серой лесной почвы, загрязненной смесью ПГИ (1,0 г ХОС/кг почвы, 7,7 г ТДГ/кг почвы) и инокулированной клетками *Pseudomonas* sp Y-13, относительно контроля - загрязненной почвы без культуры-деструктора Контроль-100%

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

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

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

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

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

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

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

### ВЫВОДЫ

- 1 Изучено влияние смеси ПГИ и основного ее компонента – ТДГ на микроорганизмы различных таксономических групп. Показано, что наиболее чувствительны к этим продуктам микромицеты и актиномицеты, а наиболее устойчивы бактерии.
- 2 Показано, что наиболее значительным ингибиторным действием на изученные микроорганизмы обладает смесь ПГИ (по сравнению с ТДГ), что, по-видимому, связано с содержанием в ее составе хлорорганических веществ.
- 3 С использованием микромицетов, как наиболее чувствительных к ТДГ и смеси ПГИ микроорганизмов, показано, что эти продукты оказывают значительное влияние на морфологические и физиолого-биохимические признаки разных микромицетов, увеличивают проницаемость клеточных мембран, изменяют жирнокислотный состав липидов, активизируют дегидрогеназы и подавляют активность гидролитических ферментов, стимулируют образование пигментов и экзополисахаридов.
- 4 Проведен скрининг наиболее устойчивых к смеси ПГИ штаммов бактерий, выделенных из почвенных образцов. Среди изученных микроорганизмов выбран штамм *Pseudomonas* sp Y-13 как высокоактивный деструктор ПГИ. Концентрация смеси ПГИ в среде, при которой культура растет и полностью их потребляет, составляет 2,3 г/л ХОС и 20 г/л ТДГ.
- 5 По результатам изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков выделенная культура отнесена к роду *Pseudomonas*.
- 6 Впервые в продуктах трансформации ТДГ выделенной культурой обнаружен  $\beta$ -меркаптоэтанол, что позволяет определить два пути, по которым может происходить деструкция основного продукта смеси ПГИ с образованием тиодигликолевой (ТДГК) и тиогликолевой (ТГК) кислот и с образованием  $\beta$ -меркаптоэтанола с последующей его трансформацией также в ТГК.
- 7 Показано, что продукты, образующиеся в процессе биодеструкции ТДГ – ТГК, ТДГК, уксусная кислота, а также  $\beta$ -меркаптоэтанол (после трансформации его в ТГК), используются культурой в качестве источника углерода.
- 8 На модельных опытах показано, что внесение клеток бактерий *Pseudomonas* sp Y-13 в почвы, загрязненные смесью ПГИ, приводит к ускорению процесса очистки от этих загрязнителей и снижению фитотоксичности почв.

**Список опубликованных работ**

- 1 Медведева Н Г , Зайцева Т Б , Зиновьева С В , Орлова О Г Деструкция продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas sp Y* – 13 // Тезисы докладов Международной конференции “Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды”, Саратов, 14 – 16 сентября 2005 г. – С 36 – 37
- 2 Медведева Н.Г , Кузикова И Л , Рыбальченко О В , Орлова О.Г , Жариков Г А The influence of mustard gas hydrolysis products on soil micromycetes // ConSoil 2005, Франция, Бордо, 3 – 7 октября 2005 г. – С 95 – 100
- 3 Медведева Н Г , Зайцева Т Б , Зиновьева С В , Орлова О Г , Жариков Г А Microbiological destruction of uperite in soil // 13<sup>th</sup> International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Испания, Мадрид, 4 – 9 сентября 2005 г – С. 282
- 4 Медведева Н Г , Орлова О Г , Жариков Г А The influence of mustard gas hydrolysis products on soil microbiota - 10<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of industrial microorganisms, Praque, June 24-28, 2006 – P 133
- 5 Медведева Н Г ., Поляк Ю М., Орлова О Г , Пастухов А , Жариков Г А The effect of mustard gas on the biological activity of soil – International Conference Protection and restorations of environment VIII, Chania, Greece, July 3 – 7, 2006 – P. 117
- 6 Медведева Н Г , Зайцева Т Б , Зиновьева С В , Сухаревич В И , Орлова О Г Деструкция продуктов гидролиза иприта культурой *Pseudomonas sp Y-13* // Биотехнология – 2006 - № 2 – С 50-56
- 7 Кузикова И Л , Медведева Н Г , Сухаревич В И , Орлова О Г , Рыбальченко О В Влияние продуктов гидролиза иприта на микромицеты // Микология и фитопатология – 2007 – № 3 – С 252-260