**1.Реферат**

Работа посвящена актуальной проблеме современной экологической биотехнологии - микробной утилизации полиароматических углеводородов (ПАУ). В рамках работы проведены: поиск и селекция штаммов ПАУ- резистентных грибов, подбор питательных сред и адаптация к ним отобранных штаммов, исследованы процессы деструкции смеси ПАУ грибами *Trichoderma linorum* и *Phanerochaete chrysosporium*, а также процесс фотолиза смеси ПАУ. Предложена модификация среды Ван-Итерсона для выделения и селекции грибов-деструкторов целлюлозы, резистентных к ПАУ.

**2.Содержание**

3.Введение.........................................................................................................................

3.1.Актуальность проблемы...........................................................................................

3.2.Состояние разработки проблемы.............................................................................

3.3.Научная новизна работы............................................................................................

4.Аналитический обзор....................................................................................................

4.1.Вредные ароматические вещества-аналоги

компонентов древесины...................................................................................................

4.1.1.Химический состав и структура древесины.........................................................

4.1.1.1.Целлюлоза..............................................................................................................

4.1.1.2.Лигнин.....................................................................................................................

4.1.1.3.Экстрактивные вещества......................................................................................

4.1.2.Карбонизация древесины. Процессы образования

конденсированных ароматических систем......................................................................

4.1.3.Полиароматические соединения каменноугольной смолы.................................

4.2.Лигнин и ПАУ-разрушающие микроорганизмы.......................................................

4.2.1.Воздействие грибов белой гнили............................................................................

4.2.2.Воздействие грибов мягкой гнили..........................................................................

4.2.3.Действие бактерий.....................................................................................................

5.Цели и задачи исследования..........................................................................................

6.Патентный поиск...............................................................................................................

7.Экспериментальная часть.................................................................................................

7.1.Материалы и методы......................................................................................................

7.1.1.Материалы....................................................................................................................

7.1.1.1.Штаммы микроорганизмов....................................................................................

7.1.1.2.Питательные среды.................................................................................................

7.1.1.3.Субстраты.................................................................................................................

7.1.1.4.Пробы........................................................................................................................

7.1.2.Методы.........................................................................................................................

7.1.2.1.Выделение культур микромицетов.......................................................................

7.1.2.2.Изучение морфологических и физиолого-

биохимических свойств микромицетов............................................................................

7.1.2.3.Отбор штаммов-деструкторов ПАУ....................................................................

7.1.2.4.Твердофазное культивирование микроорганизмов............................................

7.1.2.5.Фотолитическая обработка субстратов...............................................................

7.1.2.6.Определение ПАУ в твердой фазе........................................................................

7.2.Результаты и обсуждение.............................................................................................

7.2.1.Направленный поиск микромицетов-деструкторов ПАУ.....................................

7.2.2.Микробная деструкция смеси ПАУ..........................................................................

7.2.3.Применение облучения ( λ=257,3 нм ) для предобработки

ПАУ-содержащих субстратов.............................................................................................

7.2.4.Происхождение микроорганизмов-деструкторов ПАУ........................................

7.2.5.Анализ возможности создания систем по утилизации

твердых ПАУ-содержащих отходов...................................................................................

8.Стандартизация....................................................................................................................

9.Охрана труда и окружающей среды.................................................................................

9.1.Характеристика опасных и вредных производственных факторов..........................

9.2.Пожаробезопасность......................................................................................................

9.3.Санитария и гигиена..........................................................................................................

9.4.Безопасная работа в лаборатории..................................................................................

9.5.Меры первой помощи при несчастных случаях в лаборатории................................

9.6.Охрана окружающей среды............................................................................................

10.Технико-экономическая оценка результатов исследования......................................

10.1.Анализ возможности реализации результатов исследования..................................

10.1.1.Сегментация рынка.....................................................................................................

10.1.2.Позиционирование товара.........................................................................................

10.2.Расчет затрат на проведение исследовательской работы.......................................

10.2.1.Расчет текущих затрат...............................................................................................

10.2.2.Расчет затрат на проведение дополнительных работ............................................

11.Выводы и предложения...................................................................................................

12.Список использованной литературы......................................................................

**3.Введение**

**3.1.Актуальность проблемы**

Интенсивное развитие химической и обрабатывающей промышленности привело к интенсивному накоплению в природных биоценозах значительных количеств токсичных веществ, что, в свою очередь, обусловило развитие исследований в области охраны окружающей среды. Ведущее значение в изучении проблемы экологической безопасности играет биотехнология, так как все основные реакции детоксикации или частичной химической модификации токсичного субстрата связаны с метаболической активностью микроорганизмов.

Вместе с тем, в решении экологических проблем до последнего времени (5-7 лет назад) доминировало традиционное направление-мониторинг объектов окружающей среды и определение ПДК экотоксикантов. Сегодня ведутся работы по использованию штаммов-деструкторов экотоксикантов в очистных сооружениях /1/, но вопросы биодеградации токсичных веществ непосредственно в природных биоценозах (биоремедиации) и создания промышленных технологий, позволяющих очищать природные ландшафты от техногенных загрязнений разработаны недостаточно.

Среди веществ-экотоксикантов полиароматические соединения занимают одно из первых мест по урону, наносимому окружающей среде. Спектр этих веществ чрезвычайно разнообразен. Их утилизация сводится в основном к захоронению на специальных полигонах. Токсичность, канцерогенность и мутагенность этих веществ общеизвестна /2/.

Все эти вещества имеют в своей структуре бензольное кольцо, которое содержится в природном полимере лигнине, являющимся, наряду с целлюлозой, одним из основных компонентов древесины. Показано /3/, что почвенные микроорганизмы способны разрушать лигнин и размыкать, входящее в его структуру, бензольное кольцо. Вполне возможно, что некоторые из этих микроорганизмов, в процессе селекции могут приобрести способность утилизировать ПАУ качестве косубстратов или единственных источников углерода и энергии.

В этой связи представляется перспективной селекция древоразрушающих микроорганизмов в направлении создания штаммов-деструкторов ароматических экотоксикантов, способных разрушать эти вещества в природных биоценозах и промышленных очистных сооружениях.

**3.2.Состояние разработки проблемы**

В России и СНГ: В России и СНГ (в основном на Украине) активно ведутся работы по поиску штаммов-деструкторов отходов коксохимической промышленности /4/. Изучаются молекулярно-биологические аспекты деструкции ПАУ. Следует отметить, что большинство работ выполнено с использованием бактерий рода *Pseudomonas*. Сведений об использовании грибов в процессах детоксикации в отечественной литературе очень мало. Процессам биоремедиации техногенно загрязненных территорий так же не уделяется должного внимания (из за мягкого экологического законодательства).

В других странах: Анализ доступной литературы показал, что в США и Европе (особенно в ФРГ) ведутся многочисленные исследования по биодеградации полиароматических экотоксикантов непосредственно в природных биоценозах. /5-7/. Можно выделить следующие подходы к решению проблемы, в свете которых ведутся разработки:

1.В почву единовременно или через определенные интервалы вносится суспензия микроорганизмов, которые разлагают вещества-загрязнители.

2.В почву вносится специальная питательная среда, содержащая азот, фосфор, микроэлементы и стимуляторы роста микроорганизмов. В состав смеси входят добавки, способствующие солюбилизации гидрофобных соединений. При использовании таких сред почвенная микрофлора разлагает экотоксиканты значительно быстрее. Исследователи ФРГ активно разработывают это направление /8/.

3.Совместно используются питательные среды и микроорганизмы и/или производится предобработка субстрата. Американские ученые показали эффективность предобработки экотоксикантов УФ-светом с последующей их утилизацией грибом *Phanerochaete chrysosporium* и запатентовали данный процесс /9/.

В США и странах Европы исследованы процессы разрушения таких конденсированных систем как нафталин, антрацен, фенантрен, пирен и др./10,11/. Исследованы генетические аспекты деградации ароматических экотоксикантов /12,13/. Однако исследования носят узко специализированный характер-изучаются процессы деструкции одного вещества (в случае смеси исследуется лишь суммарное содержание веществ либо число компонентов, не превышающее 3-5). Данные по процессам, идущим при биодеградации и фотолизе многокомпонентных (более 10-ти веществ) смесей полиароматических углеводородов отсутствуют как в отечественной так и зарубежной литературе.

Резюмируя вышеперечисленное можно сказать, что сегодня в России и развитых зарубежных странах ведутся интенсивные исследования в области биодеградации техногенных загрязнителей биоценозов, причем основная роль в процессах детоксикации отводится грибам белой гнили (особенно *Phanerochaete chrysosporium*) и бактериям рода *Pseudomonas*. Сведения об использовании для деструкции полиароматических веществ грибов не относящихся к базидиомицетам носят отрывочный характер /14/. Сведений о процессах происходящих при деструкции многокомпонентных смесей экотоксикантов (10 и более компонентов) в доступной литературе не оказалось.

**3.3.Научная новизна работы**

Предложена модифицированная среда Ван-Итерсона для выделения и селекции ПАУ-резистентных грибных культур; впервые изучен процесс деструкции смеси ПАУ, состоящей из 16-ти веществ грибами *Trichoderma lignorum* и *Phanerochaete chrysosporium*. Изучен процесс фотолиза смеси ПАУ состоящей из 16-ти веществ.

**4.Аналитический обзор**

**4.1.ПАУ-производные компонентов древесины**

**4.1.1.Химический состав и структура древесины**

**4.1.1.1.Целлюлоза**

Основным компонентом древесины является целлюлоза, ее содержание в древесине различных пород варьируется от 34,2% (*Chlorophora excelsa* Benth. et Hock.f.) до 61,6% (*Pinus strobus* L.), в среднем на ее долю в растительных тканях приходится 30-50% сухого вещества. Кроме целлюлозы, древесина содержит ряд других полисахаридов: гемицеллюлозу, крахмал, пектиновые вещества, а также различные органические соединения, такие как лигнин, воска, танин, смолы и т.д. /15/.

Растительные ткани древесины представляют собой сочетание клеток разнообразной формы, имеющих сложное строение целлюлозной стенки, состоящей из 3-х слоев /16/. Первичные клеточные стенки соседних клеток соединены между собой когезивным межклеточным веществом-срединной пластинкой. В период роста срединная пластинка на 2/3 состоит из пектиновых веществ, затем происходит ее лигнификация /17/.

Вторичная клеточная стенка наиболее утолщена и образует большую часть клеточной стенки. Она состоит главным образом из целлюлозы и представляет собой множество концентричных слоев параллельно расположенных вдоль оси микрофибрилл целлюлозы. Вторичный слой определяет форму клетки и ее механические свойства /18/. Толщина третичной стенки достигает 70-80 нм. Из-за высокого содержания лигнина она прочна и химически устойчива /19/.

По современным данным макромолекула целлюлозы-это линейный полимер β-D глюкопиранозы с β-1,4-гликозидными связями между мономерами.

Макромолекула целлюлозы представляет собой стереорегулярный высокоориентированный кристаллический полимер с различной степенью полимеризации (степень полимеризации равна числу глюкозных остатков). Степень полимеризации варьируется в зависимости от происхождения: от 15 до 14000 .Так, для целлюлозных волокон хлопчатника, степень полимеризации равна 13000...14000, для древесной целлюлозы-8000 /20/ .Химический состав целлюлозы соответствует формуле (С6 Н10 О5)n. Элементарным звеном макромолекулы является ангидроцеллобиоза, являющаяся основным продуктом расщепления целлюлозы микробными ферментами /21/. Олигосахариды- продукты ферментативного гидролиза-(ди, три, тетрамеры D-глюкозы) растворимы в воде. Однако сама целлюлоза не растворяется в простых растворителях. Ее можно растворить либо в комплексных растворителях на основе солей металлов (реактив Швейцера), либо в неводных смесях органических веществ. Можно так же получить растворы целлюлозы, переведя ее в сложный (нитрат, ацетат) или простой эфир. Однако получить растворы целлюлозы, где молекулы были бы полностью разделены очень трудно. Так молекулы нитрата целлюлозы (степень полимеризации 6000), благодаря водородным связям, образуют сетку даже при концентрации их в растворе всего 0,1% /22/. Наличие водородных связей обуславливает также важные свойства целлюлозы, такие как гигроскопичность, скорость растворения, реакционную способность.

В строение древесины, в обеспечение ее механической прочности и взаимодействии с микробными ферментами важную роль играют участки целлюлозы с высокой степенью упорядоченности фибрилл-такие участки получили название кристаллические, в отличие от аморфных участков с беспорядочной ориентацией. Аморфная целлюлоза, в силу менее плотной ,чем у кристаллической целлюлозы, упаковки фибрилл более доступна для химических воздействий и микробных ферментов.

Надмолекулярная структура целлюлозы представлена элементарными фибриллами или мицеллами, диаметр которых составляет 10нм. Мицеллы. в свою очередь, объединяются в микрофибриллы диаметром 25 нм. Последние формируют целлюлозные волокна. Плотно упакованные фибриллы образуют подобие кристаллической решетки, обеспечивая прочность растительной клетки, взаимодействие с аморфным матриксом, содержащим другие полисахариды и органические вещества.

**4.1.1.2.Лигнин**

Наряду с целлюлозой, важным компонентом растительной ткани является лигнин. Лигнин- один из самых устойчивых и широко распространенных органических полимеров в природе. Он накапливается в клеточной стенке и в промежутках между целлюлозными волокнами, что придает древесине дополнительную прочность и устойчивость к химическим воздействиям.

В состав древесины входит от 17,6% ( *Populus tremuloides* Michx. ) до 39,8% ( *Lophira alata* Bauks. ex Gaertu.f. ) лигнина /15/. Содержание лигнина в различных тканях растений различно и варьируется от 5% до 30% /23/.

Лигнин- сложный трехмерный полимер фенольной природы, в котором оксифенилпропановые мономеры соединены между собой эфирными и С-С связями /24/. Роль мономеров играют различные оксифенилпропановые спирты: конифериловый ( в древесине хвойных деревьев), синановый (в древесине лиственных растений) и n-кумаровый (в травянистых растениях) /Рис.1./.

Рис.1.

Структуру лигнина, в отличии от целлюлозы, нельзя описать простой комбинацией одной или нескольких мономерных единиц с одним типом связи. В связи с этим структура лигнина является предметом моделирования. Последняя модель, построенная на основе информации полученной при изучении соснового (*Pinus taeda*) лигнина, включает 94 единицы (общая молекулярная масса более 17000) / 15 /. В лигнине можно насчитать двенадцать типов связей, причем более 50% из них это α-Ο-4 и β-Ο-4 связи /24/. В настоящее время общепринята концепция которая утверждает, что структура лигнина является результатом случайного сочетания его предшественников. Наряду с этой концепцией существуют гипотезы упорядоченного строения лигнина, однако экспериментальные факты свидетельствуют в пользу представлений о неупорядоченном строении макромолекулы лигнина.

Важной способностью лигнина является его способность образовывать тесную ассоциацию с полисахаридными частями клеточной стенки- лигноцеллюлозные или лигноуглеводные комплексы, в формировании которых главную роль выполняют ковалентные связи. Считается, что с лигнином химически связаны полиозы, хотя связь с целлюлозой полностью не исключаентся. Фрагменты полиоз в лигноуглеводных комплексах представлены остатками ксилана и маннана. Из древесины лиственных пород выделяли лигнин-ксилановые комплексы /25,26/, а из древесины хвойных-лигнин-маннановые и лигнин-ксилановые /27-31/.

На электронных микрофотографиях елового лигнин-полиозного комплекса видно, что полиозы внедрены в лигнин, а так же сильно закручены и перевиты вместе с ним. Чаще всего с лигнином связаны боковые ответвления полиоз- звенья арабинозы, галактозы и 4-О-метилглюкуроновой кислоты. Показано, что лигноуглеводные комплексы богаты именно этими сахарами /28,32/.

При воздействии микроорганизмов на древесину лигнин, ассоциированный с полисахаридами клеточной стенки, является основным препятствием для действия микробных ферментов на целлюлозу растительных тканей.

**4.1.1.3.Экстрактивные** **вещества**

Экстрактивные вещества играют огромную роль в жизни дерева и обуславливают многие свойства древесины (цвет, запах, резистентность к фитопатогенам и т.д.). При нормальных условиях доля этих веществ составляет в среднем не более 5%, причем у различных видов их содержание неодинаково, так например в древесине *Pinus abies* содержится 2,22%, а в древесине *Populus tremula* - 4,53%. Искусственно содержание экстрактивных веществ в сосне различных видов может доводиться до 15%. При обработке дерева перед рубкой гербицидом паракваном или подобными соединениями в стволе появляются зоны, пропитанные смолой (стволовой осмол)/15/.

Химический состав экстрактивных веществ чрезвычайно разнообразен, однако в свете данной работы нас интересуют лишь их ароматическая фракция.

Ароматические терпены. Содержание ароматических терпенов в древесине хвойных пород ничтожно и единственным примером соединений такого рода является представитель класса монотерпенов π-цимол (рис.2.).

Рис.2.

Лиственные породы богаче ароматическими терпенами: в древесине видов *Ulmus, Celtis* и *Zelkowa* найдены 5 видов ароматических сесквитерпенов, среди которых наиболее интересны лацинилен А и 7-гидроксикадаленаль, содержащие нафталиновое ядро (с.рис.2.)

Простые фенолы. Среди простых фенолов, выделенных их экстрактивных веществ ели (*Picea abies*), присутствуют ванилин, n-гидрокси-бензойальдегид, конифериловый альдегид, гваяцилглицерин, n-этилфенол, кониферил и сирингин, а так же крезол и другие фенолы. Некоторые простые фенолы были выделены из древесины сосны (виды *Pinus*). Из древесины лиственных пород *Populus* и *Salix* выделили n-гидроксибензойную, ванилиновую, сиреневую, феруловую кислоты, ванилин, сиреневый альдегид.

В экстрактах древесины *Quercus alba* обнаружили ряд фенолов, среди которых присувствовали синаповый, конифериловый, сиреневый альдегиды, ванилин, пропионгваякол и n-гидроксибензальдегид. В древесине дуба найдены фенол, крезолы, гваякол, n-этилфенол, эвгенол и другие фенольные соединения.

Лигнаны. Лигнаны-соединения, состоящие из двух фенилпропановых единиц, соединенных различными способами. Некоторые из этих соединений аналогичны димерным структурам, присутствующим в макромолекуле лигнина. Многие лигнаны, найденные в экстрактах древесины видов *Picea, Pinus, Larix* и *Tusida* содержат цикл тетрагидрофурана, например пинорезинол, лариццирезинол, конидендрин и лиовил. Существуют так же и нециклические структуры с β-β связями между структурными единицами (секоизоларицирезинол) и шестичленные циклы (изоларицирезинол, конидендрин, пликатин). Из древесины *Thuja plicata* выделен пликатинафтол-лигнан, содержащий нафталиновое ядро(рис.3.)/15/.

Рис.3.

**4.1.2.Карбонизация древесины. Процессы образования конденсированных ароматических систем**

После гибели дерева древесина либо разлагается микроорганизмами либо, в некоторых природных условиях превращается в ископаемую древесину.

Различают два типа процесса образования ископаемой древесины: силикатизацию (окаменение) и карбонизацию (углификацию). В свете нашей работы интерес представляют химические процессы, происходящие при карбонизации древесины. Рассмотрим их более подробно.

Химический анализ образцов старой и ископаемой древесины указывает на уменьшение содержание полисахаридов и возрастание количества негидролизуемого остатка по мере увеличения возраста и степени деградации. У относительно молодых, но сильно деградированных образцов обнаружили присутствие микроорганизмов.

Из результатов исследований древних образцов дуба, а также образцов березы, ясеня и сосны видно, что на степень деградации влияют окружающие условия, особенно на ранних стадиях. Некоторые старые образцы (возрастом 8500 лет) содержали больше полиоз, чем молодые (возрастом 900 лет).

По увеличению относительного содержания целлюлозы в образцах деградированной древесины видно, что превращения начинаются с полиоз. Быстрее разрушаются легкорастворимые полиозы, в частности пентозаны, чем труднорастворимые. Массовая доля полиоз, растворимых в 5%-ным КОН в ядровой древесине современного образца дуба ,составила 22,4%, а в образце возрастом 8500 лет снизилась до 12,4%,тогда как массовая доля полиоз ,растворимых в 24%-ном КОН, снизилась с 6,1% только до 5,4% /15/.

Деградация полисахаридов начинается на ранних стадиях процесса, однако некоторая часть полисахаридов может сохраняться многие миллионы лет. В образце древесины хвойной породы возрастом 100 млн. лет нашли около 2% сахаров. Из образца древесины из нижнего мелового периода (140 млн. лет назад) выделили 1,1% холоцеллюлозы, в гидролизате которой основными сахарами были глюкоза и манноза. В образце ископаемой древесины семейства *Protopinaceae*, очевидно, еще сохранились небольшие количества целлюлозы и полиоз даже после 180 млн. лет, так как гидролизаты содержали глюкозу, маннозу и ксилозу.

Лигнин способен сохраняться в течении миллионов лет, но в то же время он может претерпевать изменения даже и за относительно короткие промежутки времени. В молекулах лигнина образцов древесины возрастом 900-4400 лет обнаружили окислительные превращения. Окисление лигнина было замечено также в образцах древесины возрастом 30 млн. лет. Лигнин может терять 2/3 метоксильных групп. ИК-спектры образцов древесины указывают на присутствие конденсированных колец, образовавшихся главным образом из лигнина. С увеличением возраста превращение лигнина в конденсированные ароматические системы усиливается. Битуминозный уголь имеет высокое содержание таких систем. Конденсация ароматических колец служит причиной увеличения содержания углерода в процессе карбонизации. В конце этого процесса получается графит. Ароматические кольца могут возникать и из продуктов деградации полисахаридов. Известно, что пировиноградный альдегид может легко ароматизироваться через хиноны /33/.

В настоящее время каменный уголь является основным источником ПАУ для промышленности. Таким образом, ПАУ, выбрасываемые промышленностью в биосферу, являются производными древесины древних сосудистых растений.

**4.1.3.Полиароматические соединения каменноугольной смолы**

Каменноугольная смола (креозот) образуется при коксовании каменного угля и является основным источником ПАУ для химической промышленности. Именно креозот является основным источником ПАУ-экотоксикантов.

В составе каменноугольной смолы нами были обнаружены 16 ПАУ, а именно: нафталин, аценафтен, аценафтилен, флуорен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пирен, бензантрацен, хризен, бенз[b]флуорантен, бенз[k]флуорантен, бенз[а]пирен, дибензантрацен, бензперилен, инденопирен (Рис.4.). Больше всего в креозоте содержится фенантрена и флуорантена. Суммарно эти вещества составляют 64% фракции ПАУ. Другие вещества, такие как бенз[а]пирен, хотя и составляют 0,7% фракции ПАУ являются сильнейшими канцерогенами.

Химически эти вещества представляют собой многоядерные ПАУ. Содержание нафталина в смеси очень низко. Основная масса ПАУ- трех-, четырех- и более ядерных соединения.

Рис.4.ПАУ каменноугольной смолы

**4.2.Лигнин и ПАУ-разрушающие микроорганизмы**

Как было отмечено выше, естественным резервуаром микроорганизмов-деструкторов ПАУ являются почва и лесная подстилка. Фитопатогенные грибы, поражающие древесину, также перспективны в плане отбора ПАУ-разрушающих штаммов.

Грибы, разрушающие древесину, подразделяются на четыре группы:

1.Грибы бурой гнили- принадлежат к подотделу базидиомицетов, разрушают, главным образом, полисахариды древесины.

2.Грибы белой гнили- - принадлежат к подотделу базидиомицетов, разрушают, главным образом, лигнин, однако способны разрушать полисахариды.

3.Грибы мягкой гнили- сумчатые и несовершенные грибы, разрушают полисахариды и лигнин.

4.Грибы синевы- сумчатые и несовершенные грибы, живут, главным образом, за счет остаточных белков паренхимных клетках. Ограничено разрушают полисахариды.

5.Бактерии- способны разрушать полисахариды и лигнин, однако, их морфологические свойства (колониальный рост) не позволяет им выступать в качестве высоко эффективных деструкторов при твердофазной ферментации.

Таким образом, наиболее перспективными для отбора ПАУ-разрушающих штаммов являются грибы белой и мягкой гнили (базидио- и аскомицеты). Рассмотрим влияние их ферментных систем на природные ароматические вещества.

**4.2.1.Воздействие грибов белой гнили**

Грибы белой гнили вырабатывают различные ферменты, способствующие усвоению лигнина /34/. Некоторые из грибов дают, преимущественно, лакказу, другие пероксидазу и тирозиназу. Процесс выработки ферментов различен в зависимости от того используется фермент внутри или вне гиф.

У всех видов диких грибов обнаружена комбинированная деструкция всех компонентов древесины. Обнаружен фермент, который нуждается в целлобиозе (продукте разложения целлюлозы) для деструкции лигнина при совместном действии с локказой /15/.Этот фермент был назван целлобиозохиноноксиредуктазой. В дальнейшем было показано, что для разложения лигнина грибом *Phanerohaete chrisosporium.*(синоним *Sporotrichum pulverolentum*)наличие целлобиозохиноноксиредуктазы не является необходимым. Наличие же лакказы абсолютно необходимо. Мутант гриба, не вырабатывающий этой фенолоксидазы, не способен разрушать лигнин.

Изменение в лигнине под воздействием грибов белой гнили заключается в увеличение содержания карбонильных и карбоксильных групп. Отношение О/С увеличивается, а Н/С понижается. Увеличение содержания кислорода происходит в результате окисления α-углеродных атомов и окислительной деструкции связей между β- и γ-углеродными атомами пропановой цепи. В опытах с меченным (14С) лигнином показано, что при действии грибов белой гнили (*Coriolus versicolor, Phanerohaete chrysosporium*) конечный продукт метаболизма СО2 образуется главным образом из метоксильных групп и в небольшой степени из углерода пропановых цепей и ароматических колец. Далее осуществляется окислительное расщепление β-О-4,β-5, β-1 и β-β связей. При этом получаются мономерные звенья лигнина, которые далее разрушаются посредством раскрытия ароматического кольца. Однако, ароматические кольца могут расщепляться и в полимере лигнина /15/.

**4.2.2.Воздействие грибов мягкой гнили**

Грибы мягкой гнили вырабатывают ферменты, разрушающие все компоненты древесины. Деструкция лигнина грибом *Chaetomium globosum* до общей потери массы древесины 12% заключается в деметилировании. С увеличением потери массы происходит дальнейшее разложение лигнина. Исследования показали, что при этом не происходит накопление ароматических соединений, следовательно грибы мягкой гнили разрушают ароматические кольца и в самом лигнине и в продуктах.

**4.2.3.Действие бактерий**

Способность различных бактерий разрушать мономеры и предшественники лигнина показано в опытах с модельными соединениями /35,36/. Однако, в силу морфологических особенностей бактерии не способны эффективно разлагать его полимерные формы.

Исследования по разрушению ПАУ почвенными бактериями показали, что псевдомонады являются наиболее эффективными деструкторами этих соединений. Исследования показали, что ПАУ эффективно разлагаются псевдомонадами в условиях глубинной и твердофазной ферментации, в ризосфере растений /37/.

Исследования механизмов деструкции ПАУ (фенантрена) культурой *Pseudomonas fluorescens* показали /4/, что окисление ПАУ бактериями происходит последовательно, то есть ферментная атака направлена только на одно кольцо(Рис.5.).

Рис.5.Механизм деструкции фенантрена

Способность разрушать природные ароматические вещества натолкнула исследователей на мысль об использовании микроорганизмов для разрушения ароматических и полиароматических веществ- отходов химической индустрии. В 1990 году американские исследователи показали, что разрушающие лигнин грибы белой гнили *Phanerohaete chrysosporium* способны также разлагать полициклические ароматические углеводороды до СО2 /38/. Была так же показана способность бактериальных штаммов разлагать ПАУ /39/. В настоящее время работы по микробной деструкции ПАУ ведутся, практически, во всех развитых странах. Показано /40/, что деструкция ПАУ идет последовательно и начинается с гидроксилирования только одного ароматического кольца (рис.6.).

Рис.6.Гидроксилирование бензольного кольца. Упрощенная схема микробной деструкции нафталина

Таким образом простые ПАУ должны разлагаться микроорганизмами гораздо быстрее чем такие ПАУ как пирен, хризен, 3,4бензпирен и другие. В соответствии с правилом последовательного окисления только одного ароматического кольца при деструкции смеси ПАУ должно происходить накопление полиядерных веществ, разрушение которых требует длительных сроков инкубации. Правило последовательного окисления действует для различных видов микроорганизмов.

**5.Цели и задачи исследования**

Целью работы является изучение процессов биодеградации смеси вредных ПАУ микроорганизмами, разрушающими древесину и создание на их основе высокоэффективных штаммов-деструкторов указанных соединений.

Задачи исследования сводятся к:

1)Поиску в коллекциях и выделению из природных биоценозов микроорганизмов-деструкторов вредных веществ и отбор наиболее активных штаммов;

2)Адаптации штаммов к условиям культивирования (масштабирование процесса);

3)Изучению процессов разрушения многокомпонентной смеси ПАУ в условиях твердофазной ферментации;

4)Изучению фотолиза ПАУ.

**6.Патентный поиск**

Поиск патентной информации проводился на базе фундаментальной библиотеки СПбГТИ(ТУ), объединенной библиотеки ВИЗР и ВНИИСХМ, библиотеки АН, а также Российской Национальной библиотеки. Поиск осуществлялся по следующим направлениям: штаммы-деструкторы ароматических экотоксикантов, питательные смеси для очистки загрязненных почв, аппаратурное оформление процессов компостирования твердых отходов, методы предобработки отходов. По данным направлениям обнаружена следующая инормация:

1.Штамм актиномицетов *Streptomyces rochei*, осуществляющий полное разложение 2,4,6-трихлорфенола или 2,4-дихлорфенола или 2,6- дихлорфенола, или 2-хлорфенола: А.с. 1652335 СССР, МКИ5 С12 N 1/20, С12 S 13/00/ Головлева Л.А., Заборина О.Е., Перцова Р.Н., Евтушенко Л.И.; Ин-т биохимии и физиол. микроорганизмов АН СССР.- № 4696431; Заявл. 08.06.89; Опубл. 30.05.91, Бюл. № 20.

2.Методы и установка для [проведения] аэробного ферментативного, в частности, для компостирования органических материалов. Verfahren und Vorrichtung zur aeroben, fermentativen Hydrolyese, insbesondere zur Kompostierung vor organischen Stoffen: Заявка 3925905 ФРГ, МКИ5 С12М 1/02, СО5F 9/04/ Hofmann Hermann, Schnorr Karl Ersnt.-№ 3925905.6; Заявл. 04.08.89; Опубл. 28.02.91.

3.Фотолитически усиленное микробное разрушение [веществ] загрязняющих окружающую среду. Photochemically enhanced microbial degradation of enviromental pollutants: Пат. 5342779 США МКИ5 ВО9В 3/00, D06Н 16/00/ Matsumura Fumio, Katayama Arata; The Regents of the University of California.- №687368; Заявл.18.04.91; Опубл. 30.08.94; НКИ 453/262.5.

4.Улучшенная смесь питательных соединений для биологической очистки загрязненых почв и вод. Verbesserte Nahrstoffgemische fur die Bioremediation verschmutzter Boden und Cewasser: Заявка 4228168 ФРГ, МКИ5 С12N 1/26, С12S 9/00/ Kopp-Holtwiesche Bettinna, Weiss Albricht; Henkel KGaA.-№ 4228168.7; Заявл. 25.08.92; Опубл. 03.03.94.

5.Штамм бактерий - деструктор фенола, бензола и их галогензамещенных аналогов: Пат. 2041943 Россия, МКИ6 C12N 1/12, CO2F 3/34/ Зайцев Г.М., Ивойлов В.С; Суровцева Э.Г.; Науч.-произв. предприятие Биотехинвест. - №92014789/13; Заявл. 28.12.92; Опубл. 20.08.95, Бюл. № 23.

**7.Экспериментальная часть**

**7.1.Материалы и методы**

**7.1.1.Материалы**

**7.1.1.1.Штаммы микроорганизмов**

В нашей работе были использованы штаммы мицеллиальных грибов любезно предоставленные Ю.С.Оследкиным (ВНИИСХМ, г.Пушкин).

В таблице №1 приводится список видов и номера штаммов, а также указывается доступная информация об источнике их происхождения (организации и/или географическом и/или экологическом происхождении).

таблица 1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №п/.п | название штамма | коллекционный/  музейный  номер штамма | источник |
| 1 | *Trichoderma linorum* | 32 | ARRIAМ |
| 2 | *Trichoderma linorum* | 37 | ARRIAM |
| 3 | *Trichoderma linorum* | 48 | ARRIAM |
| 4 | *Chaetomium elatum* Kunze:Fris 1817 | 341 | СПбГУ |
| 5 | *Chaetomium bainieri* Munk 1957 | 344 | СПбГУ |
| 6 | *Chaetomium funicolum* Cooke 1873 | 347 | СПбГУ |
| 7 | *Chaetomium coclioides* Palliser 1910 | 491 | Укр.ИСХМ |
| 9 | *Coriolus* *versicolor*  (L.1753:Fr. 1821) Quelet 1888 | 330 | ВИЗР |
| 10 | *Fusarium solani* (Martius) Sacc 1881 | 464 | Ленинград- ский рег., почва |
| 11 | *Fusarium solani* (Martius) Sacc 1881 | 496 | РФ,  почва |
| 12 | *Phanerochaete chrysosporium* | F-20696 | ATCC |

**7.1.1.2.Питательные среды**

В работе были использованы следующие питательные среды:

1.Среда Ван-Итерсона /41/, г/л:

NH4NO3 -0,5

KH2PO4 -0,5

полоска фильтровальной бумаги -1x12 см

H2O -1 литр

2.Среда Ван-Итерсона модифицированная /42/:

минеральный состав среды тот же, что и в классическом варианте, полоска фильтровальной бумаги инпрегнированна веществом, для которого отбирается штамм-деструктор содержание вещества составляет 5% от массы полоски бумаги

3.Среда Чапека /41/, г:

KH2PO4 -1,0

NaNO3 -3,0

KCl -0,5

MgSO4.7H2O -0,5

FeSO4.7H2O -0,01

H2O -1 литр

4.Среда Чапека с сахарозой/41/:

Минеральный состав без изменений, добалено 30 г/литр сахарозы

5.Сусло пивное неохмеленное /41/:

Неохмеленное пивное сусло разводится в два раза водопроводной водой и стерилизуется

Для получения твердых питательных сред добавляли 2 г/литр агар-агара.

**7.1.1.3.Субстраты**

Для выделения, отбора, хранения и культивирования микромицетов использовали следующие субстраты (табл.2.):

таблица 2

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| №  п.п. | наименование  субстрата | источник  получения | применение |
| 1 | бумага  фильтровальная | Whatman No 1  Великобритания | выделение  микромицетов |
| 2 | березовые  опилки | Столярная  мастерская СПбГТИ(ТУ) | культивирование  микромицетов |
| 3 | древесина  шпал | Пропиточный з-д.  г.Отрадное | культивирование  микромицетов |

**7.1.1.4.Пробы**

В работе были использованы образцы древесины телеграфных столбов, подвергшихся воздействию микроорганизмов (Новгородский регион), любезно предоставленныe Марьяновской Юлией Валентиновной (кафедра МБТ СПбГТИ(ТУ)).

**7.1.2.Методы**

**7.1.2.1.Выделение культур микромицетов**

Выделение первичных культур велось на модифицированной среде Ван-Итерсона. Для устранения посторонних микроорганизмов образец короткое время обжигали в пламени спиртовки и помещали на питательную среду. Микроорганизмы, находящиеся на поверхности, гибли, а те микробы, которые находились внутри образца сохраняли жизнеспособность. Продолжительность инкубации составляла 60 суток. Остальные условия оговариваются особо.

Выделение чистых культур велось на агаре Чапека с использованием стандартных микробиологических методов /43/.

**7.1.2.2.Изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств культур микромицетов**

Для изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств культур микромицетов использовали стандартные микробиологические среды и методы /41/.

Цитоморфологические наблюдения проводили с помощью общепринятых методов и растворов красителей /41/.

**7.1.2.3.Отбор штаммов-деструкторов ПАУ**

Отбор целлюлолитических штаммов мицеллиальных грибов оcуществляли на среде Чапека c целлюлозой и ПАУ (содержание ПАУ 5% от массы целлюлозного субстрата). Оценка роста производилась визуально.

**7.1.2.4.Твердофазное культивирование микроорганизмов**

Культивирование мицелиальных грибов в твердой фазе проводили в кюветах емкостью 0,5 л и бутылях емкостью 30 л.

Содержание среды в кюветах-250 г, в бутылях-2,5 кг. Перемешивание осуществляли вручную: в кюветах-шпателем, в бутылях встряхиванием. Периодичность перемешивания и остальные условия оговариваются особо.

Культивирование мицеллиальных грибов проводилось на специально разработанных средах, представляющих собой измельченную древесину, инпрегнированную ароматическими веществами и увлажненную раствором солей и сахаров. Объем увлажняющей жидкости составлял 200-400 мл на 1 кг древесины.

Посевной материал для кювет выращивали на чашках Петри на тех же средах. Чашки Петри засевали суспензией спор, полученной путем смыва увлажняющей жидкостью с газона 7-суточной культуры на агаре Чапека. Для засева бутылей использовали содержимое кювет, во всех случаях посевной материал вносился в количестве 10% от объема ферментационной среды.

**7.1.2.5.Фотолитическая обработка субстратов**

Субстраты помещали в кюветы, которые располагались под источником излучения на расстоянии 50-60 см. Чтобы избежать перегрева поверхности субстрата, лампа работала периодически, не более 4 часов в течении рабочего дня.

В качестве источника излучения использовали газоразрядную лампу ПРК-7 (λmax=257,3 нм).

**7.1.2.6.Определение ПАУ в твердой фазе**

Экспериментальные образцы подвергались сушке в термостате при 105ОС до постоянного веса.

Экстракцию ПАУ осуществляли в аппарате Сокслета в течении 6 часов. В качестве экстрагента использовали предварительно очищенный от примесей углеводородов гексан.

Полученный экстракт упаривали до небольшого (4-5мл) объема. Затем в него добавляли около 1г активированного силикагеля (Silpearl) и упаривали досуха. Далее пробу вносили в разделительную колонку с силикагелем и вымывали посторонние примеси 40мл гексана. Затем элюировали фракцию ПАУ 120мл смеси гексан:хлористый метилен (4:1). Фракцию, содержащую ПАУ упаривали до объема 0,25-1,0мл.

Газхроматографический анализ сконцентрированных компонентов проводили на хроматографе ’’Цвет-570М’’ с пламенно-ионизационным детектором на кварцевой капиллярной колонке (30м, 0,25мм) с неподвижной фазой DB-5 при программном повышении температуры от 70 до 320ОС со скоростью 4ОС в минуту. Количественные данные получали методом абсолютной градуировки детектора стандартными растворами ПАУ (’’Экрос’’, Санкт-Петербург). Градуировку по бенз[а]пирену осуществляли при помощи ГСО 7064-93.

Идентификацию компонентов смеси осуществляли хромато-масс-спектрометрически на приборе LKB-2091 фирмы LKB-BROMMA (Швеция). Хроматографические условия были те же, что и в случае количественного анализа. Идентификацию проводили путем сравнения масс-спектров электронного удара при помощи компьютерной информационно-логической системы ’’Компас-МС’’.

**7.2.Результаты и обсуждение**

**7.2.1.Направленный поиск микромицетов-деструкторов ПАУ**

Микробная деструкция экотоксикантов в последние десятилетия стала объектом интенсивных исследований практически во всех развитых странах мира. Эффективность этого процесса определяется в первую очередь активностью штамма-деструктора экотоксикантов. Необходимость интенсифицировать процессы биоремедиации побуждает исследователей как к проведению селекции коллекционных штаммов, так и к поиску новых деструкторов /44-46/.

Проведенные эколого-таксономические исследования показали, что представители микрофлоры лесной подстилки (рода *Alternaria, Cladosporium, Helmintosporium-подобные, Chaetomium* и др.), а так же почвенной микрофлоры ( рода *Aspergillus, Trichoderma, Penicillium* и др.) способны разлагать лигниноцеллюлозу и разрушать ароматические ядра лигнина /34/.

Фитопатогенные грибы так же способны разрушать природные аромитические вещества (*Fusarium*) /34/.

Обычно для выделения штаммов, разлагающих то или иное вещество, используют жидкие или агаризованные среды, содержащие это вещество как единственный источник углерода и энергии. Однако, по нашему мнению, для биоремедиации следует использовать микроорганизмы, сочетающие в геноме способность утилизировать как экотоксикант, так и целлюлозу, которая содержится в почве и является основным компонентом твердых отходов. Мы решили, что наилучшей средой для отбора микромицетов, разрушающих ПАУ в соокислительных условиях будет среда Чапека с целлюлозой и ПАУ. В качестве критерия отбора использовали общепринятый метод оценки роста культур мицеллиальных грибов по характеристике их роста в баллах через определенные, одинаковые для всех штаммов периоды времени. Такая методика позволяет отобрать наиболее резистентные и быстрорастущие штаммы.

Для выделения ПАУ-резистентных целлюлолитиков из природных биоценозов на наш взгляд наиболее подходит среда модифицированная Ван-Итерсона /42/, где полоска фильтровальной бумаги была инпрегнированна ПАУ. На такой среде селективно отбираются ПАУ-резистентные микроорганизмы. Для отработки методики и с целью поиска штаммов-деструкторов ПАУ нами из техногенных биоценозов был выделены ряд микроорганизмов.

Из биоценоза свалки старых телеграфных столбов было отобрано 5 проб древесины, имеющей ярко выраженные биоповреждения. Пробы помещали в стерильные пробирки с ватно-марлевыми пробками высушивали и хранили при обычных условиях.

Выделение первичной культуры велось на модифицированной среде Ван-Итерсона. Для устранения посторонних микроорганизмов образец короткое время обжигали в пламени спиртовки и помещали на питательную среду. Микроорганизмы, находящиеся на поверхности, гибли, а те микробы, которые находились внутри образца сохраняли жизнеспособность. Продолжительность инкубации составляла 60 суток, температура поддерживалась на уровне +25ОС.

Идентификация велась на сусло-агаре и среде Чапека.Было выделено и идентифицировано 5 штаммов: *Trichoderma linorum,* *Trichoderma sp.* и три представителя рода *Fusarium*.Хранили штаммы на модифицированной среде Ван-Итерсона. Во избежании путаницы штаммам были присвоены музейные номера (см. табл.3. ).

таблица 3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| №  п.п. | видовое название  штамма | музейный номер\* |
| 1 | *Trichoderma linorum* | Н-1 |
| 2 | *Trichoderma sp.* | Н-2 |
| 3 | *Fusarium sp.* | Н-3 |
| 4 | *Fusarium sp.* | Н-4 |
| 5 | *Fusarium sp.* | Н-5 |

\*Н- Новгородский рег., 1- порядковый № штамма

Для проведения исследований мы использовали культуры, выделенные из техногенных биоценозов, а так же коллекционные, любезно предоставленные Оследкиным Ю.С. (разд. ). Отбор штаммов оcуществляли на среде Чапека с целлюлозой и ПАУ (содержание ПАУ 5% от массы целлюлозного субстрата). Оценка роста производилась визуально. Результаты представлены в таблице 4.

таблица 4

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | название | коллекцион-  ный/музейный | колонизация поверхности субстрата, % | | | | | | | | | | |
| п.п. | штамма | номер | время инкубации, сутки | | | | | | | | | | |
|  |  | штамма | 3 | 6 | | 9 | | 12 | | 15 | | 20 | |
| 1 | *Trichoderma lignorum* | 32 | 0 | 0 | | 2 | | 4 | | 2 | | 2 | |
| 2 | *Trichoderma lignorum* | 37 | 0 | 10 | | 30 | | 45 | | 60 | | 60 | |
| 3 | *Trichoderma lignorum* | 48 | 0 | 0 | | 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| 4 | *Trichoderma linorum* | Н-1 | 0 | 0 | | 10 | | 15 | | 15 | | 20 | |
| 5 | *Trichoderma sp.* | Н-2 | 0 | 5 | | 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| 6 | *Chaetomium elatum* | 341 | 0 | 2 | | 4 | | 4 | | 8 | | 4 | |
| 7 | *Chaetomium bainieri* | 344 | 2 | 2 | | 2 | | 4 | | 2 | | 2 | |
| 8 | *Chaetomium funicolum* | 347 | 0 | 4 | | 4 | | 6 | | 4 | | 2 | |
| 9 | *Chaetomium coclioides* | 491 | 0 | 0 | | 4 | | 6 | | 6 | | 2 | |
| 10 | *Coriolus* *versicolor* | 330 | 0 | 0 | | 6 | | 8 | | 2 | | 2 | |
| 11 | *Fusarium solani* | 464 | 0 | 0 | | 4 | | 6 | | 6 | | 6 | |
| 12 | *Fusarium solani* | 496 | 0 | 0 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| 13 | *Fusarium sp.* | Н-3 | 0 | | 0 | | 4 | | 6 | | 6 | | 6 |
| 14 | *Fusarium sp.* | Н-4 | 0 | | 2 | | 6 | | 8 | | 8 | | 8 |
| 15 | *Fusarium sp.* | Н-5 | 0 | | 0 | | 6 | | 6 | | 6 | | 6 |

Практически все исследуемые микроорганизмы обладали способностью расти и образовывать колонии на поверхности субстрата. Однако у большинства культур процент заселения поверхности субстрата был незначителен (до 10%). По-видимому таким культурам требуется более длительный срок адаптации или наличие стимуляторов роста. Наибольшей скоростью роста и высокой степенью колонизации (до 60% площади субстрата) обладал штамм *Trichoderma lignorum* №37. Характер роста данного микроорганизма соответствовал каталожному описанию и заключался на начальных этапах в образовании небольших колоний диаметром 1-1,5 мм, постепенно сливающихся в единое целое и формирующих поверхностный мицелий светло зеленого цвета. Этот штамм и был отобран для дальнейших исследований.

**7.2.2.Микробная деструкция смеси ПАУ**

Анализ литературных данных показал, что основная масса работ по деструкции ПАУ посвящена изучению деструкции одного вещества или смеси ПАУ/6,11,14/, содержащей не более 5 компонентов. Однако в реальных условиях спектр ПАУ-экотоксикантов гораздо шире. Данные по деструкции многокомпонентных смесей ПАУ в доступной литературе отсутствуют. Между тем изучение процессов деструкции смеси экотоксикантов имеет очень важное значение для разработки процессов биоремедиации.

Для изучения деструкции смеси ПАУ нами в качестве модельного субстрата была выбрана древесина шпал. Использование этого субстрата значительно упрощало работу так как отпадала необходимость работать с креозотом непосредственно.

Для приготовления ферментационной среды субстрат измельчали до фрагментов размером около 5 мм и увлажняли жидкой средой Чапека с сахарозой (см.разд.7.1.). Посевной материал выращивали в чашках Петри на такой же среде. Объем ферментационной среды составлял 250гр., посевной материал вносился в количестве 10-ти % от объема среды. Температура культивирования составляла 25оС, пробы отбирались на 14-е и 20-е сутки инкубации. Содержание ПАУ в экспериментальных образцах определяли методом хромато-масс-спектроскопии (см.разд.7.1.). Результаты анализа представлены в таблице 5:

таблица 5

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| вещество | содержание ПАУ в образцах, мг/кг | | |
|  | контроль | 14 суток | 20 суток |
| Нафталин | 22 | 0,4 | 0,1 |
| Аценафтен | 7 | 2,2 | 0,4 |
| Аценафтилен | 86 | 1,5 | 0,4 |
| Флуорен | 86 | 3,1 | 2,9 |
| Фенантрен | 1840 | 87 | 43 |
| Антрацен | 600 | 24 | 12 |
| Флуорантен | 1430 | 350 | 210 |
| Пирен | 520 | 100 | 71 |
| Бензантрацен | 230 | 8 | 2,7 |
| Хризен | 160 | 22 | 15 |
| Бенз(b)флуорантен | 45 | 12 | 4,3 |
| Бенз(k)флуорантен | 34 | 3,6 | 27 |
| Бенз(a)пирен | 35 | 5,9 | 2,8 |
| Дибензантрацен | 18 | 2,7 | 4,4 |
| Бензперилен | 10 | 4,7 | 21 |
| Инденопирен | 9 | 3,4 | 16 |

Анализ экспериментальных данных по деструкции ПАУ, приведенные в табл.45 показал, что различные по строению ПАУ разрушаются *Trichoderma lignorum* с различной скоростью. Простые ПАУ, такие как нафталин, антрацен, фенантрен в большей степени подвержены деструкции, чем многоядерные. Литературные /40/ данные свидетельствуют, что микробная деструкция нафталина ферментами оксигеназами происходит последовательно и начинается с гидроксилирования только одного аромтического кольца (см. рис.6.).

В соответствии с правилом последовательного окисления только одного ароматического кольца сложные 4х-5ти ядерные ПАУ в меньшей степени подвержены полному распаду. Необходимо отметить, что на момент отбора проб для анализа в субстратах под воздействием микробных ферментов происходят сложные процессы изменения количественного соотношения ПАУ. Возможно этот процесс обусловлен явлением конденсации частично окисленных углеводородов. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты с увеличением срока культивации.

Исследования проводились с использованием ранее описанных методов и сред, однако были внесены некоторые изменения:

1.Применялись более крупные фрагменты, чем ранее. Линейные размеры фрагментов составляли 10х10х20 см (кубики).

2.При формировании среды в ферментационных емкостях объемом 10 литров было произведено разбавление пропитанных креозотом кубиков чистыми кубиками, щепой и опилками в соотношении 1:1.

Посевной материал вносился в количестве 10%. Температура инкубации составляла 28ОС. Субстрат периодически увлажняли разбавленным водопроводной водой неохмеленным пивным суслом (2% сахаров).

Культура *Trichoderma lignorum* № 37 активно колонизирует поверхность кубиков, причем начальное прикрепление и активное размножение начинается с чистых, не содержащих ПАУ кубиков. Такая последовательность, по-видимому, связана с адаптацией культуры и накоплением в среде активных ферментов. К исходу 20-х суток культура колонизирует до 70% поверхности субстрата.

Отбор проб производился на 30-е и 40-е сутки инкубации. Определение содержания ПАУ в образцах проводили в соответствии с раннее указанным методом. Результаты анализа представлены в таблице 6:

таблица 6

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| вещество | содержание ПАУ в образцах, мг/кг | | |
| держание ПАУ | контроль | 30 суток | 40 суток |
| Нафталин | 7 | 3,8 | 0,42 |
| Аценафтен | 16 | 2,5 | 1,1 |
| Аценафтилен | 170 | 1,7 | 0,31 |
| Флуорен | 337 | 8,3 | 0,91 |
| Фенантрен | 797 | 1230 | 7,4 |
| Антрацен | 303 | 320 | 2,1 |
| Флуорантен | 619 | 1450 | 9,8 |
| Пирен | 382 | 630 | 3,1 |
| Бензантрацен | 94 | 37 | 7,9 |
| Хризен | 50 | 42 | 3,8 |
| Бенз(b)флуорантен | 5,5 | 29 | 0,87 |
| Бенз(k)флуорантен | 23,5 | 39 | 0,94 |
| Бенз(a)пирен | 15 | 9,6 | 0,29 |
| Дибензантрацен | 3,5 | 24 | 0,99 |
| Бензперилен | 10 | 69 | 0,32 |
| Инденопирен | 1 | 49 | 1,3 |

Как видно из представленных данных на 30-е сутки процесса микробной деструкции сохраняется накопление ПАУ, отмеченное раннее. Увеличивается количественное содержание инденопирена (контрольный образец-1 мг/кг, 30-е сутки- 49 мг/кг), бензперилена, дибензантрацена и бенз[к]флуорантена. По сравнению с раннее полученными результатами на 30-е сутки обнаружено дополнительное увеличение содержания бенз[в]флуорантена (в 5 раз), незначительное увеличение пирена,

флуорантена и антрацена. Это объясняется перераспределением вещества между компонентами смеси ПАУ в процессе микробной переработки и меньшей скоростью деструкции, обусловленной переходом к более крупным фрагментам субстрата- кубикам.

По видимому для более полного разрушения ПАУ требуется более длительный срок ферментации. Результат анализов проб отобранных по истечении 40 суток убедительно показал, что только содержание инденопирена сохраняется на прежнем уровне (контрольный образец-1 мг/кг, 40-е сутки-1,3 мг/кг). Содержание всех остальных компонентов смеси к исходу 40-х суток резко снизилось и достигло минимальных значений. На 40-е сутки инкубации исчезает, отмеченное раннее явление накопления полиядернях компонентов смеси, связанное с конденсацией продуктов частичной деструкции.

Параллельно нами был изучен процесс деструкции смеси ПАУ грибом *Phanerochaete chrysosporium*. Этот микроорганизм является самым перспективным среди микромицетов деструктором ароматических ксенобиотиков, ему посвящено огромное количество работ. Однако сведений по деструкции им многокомпонентных смесей ПАУ в литературе так же не оказалось. В этой связи имело смысл изучить данный вопрос. В соответствии с раннее описанными методиками был изучен процесс деструкции ПАУ. В качестве субстрата использовали кубики, анализ содержания ПАУ проводили методом хромато-масс-спектроскопии. Результаты исследования представлены в таблице 7.

Как следует из приведенных экспериментальных данных, гриб *Phanerochaete chrysosporium* активно разрушает ПАУ. Причем важно отметить, что раннеее наблюдаемое явление перераспределения ПАУ сохраняется и в случае *Phanerochaete chrysosporium* (инденопирен, бензперилен, дибензантрацен). Вместе с тем к исходу 40-х суток содержание ПАУ в субстрате резко снижается.

Таким образом подтверждается принцип последовательного окисления ПАУ и общность механизмов деструкции этих веществ у различных микроорганизмов.

таблица 7

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| вещество | содержание,  мг/кг | | |
|  | контроль | 30 суток | 40 суток |
| Нафталин | 7 | 2,1 | 1,1 |
| Аценафтен | 16 | 1,2 | 1,9 |
| Аценафтилен | 170 | 0,98 | 0,54 |
| Флуорен | 337 | 2,9 | 0,82 |
| Фенантрен | 779 | 790 | 14 |
| Антрацен | 303 | 190 | 5,4 |
| Флуорантен | 619 | 840 | 210 |
| Пирен | 382 | 280 | 64 |
| Бензантрацен | 94 | 23 | 11 |
| Хризен | 50 | 30 | 32 |
| Бенз(b)флуорантен | 5,5 | 5,7 | 9,4 |
| Бенз(k)флуорантен | 23,5 | 36 | 20 |
| Бенз(a)пирен | 15 | 4,4 | 0,49 |
| Дибензантрацен | 3,5 | 8,3 | 9,5 |
| Бензперилен | 10 | 17 | 3,8 |
| Инденопирен | 1 | 21 | 7,9 |

**7.2.3.Применение облучения (λ=257,3 нм) для предобработки ПАУ-содержащих субстратов**

В природных условиях ПАУ разлагаются под воздействием комплекса многочисленных факторов: микробной деструкции климатических условий и некоторых других. Солнечный свет несомненно должен оказывать влияние на ПАУ. Для проверки этого предположения нами была создана лабораторная установка (рис.3.) с газоразрядной лампой ПРК-7 (λ=257,3 нм). Кюветы с измельченными фрагментами пропитанной креозотом древесины (фрагменты 5 мм) помещали в кюветы и подвергали облучению. Во избежание перегрева поверхности субстрата установка работала периодически, не более 4-х часов в сутки. Пробы отбирали по истечении 16-ти и 20-ти часов облучения. Анализ содержания ПАУ проводили по методике, описанной раннее. Результаты экспериментов представлены в таблице 8:

таблица 8

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| вещество | содержание,  мг/кг | | |
|  | контроль | 16 часов | 24 часа |
| Нафталин | 22 | 0,26 | 0,10 |
| Аценафтен | 7 | 0,58 | 0,76 |
| Аценафтилен | 86 | 0,40 | 0,52 |
| Флуорен | 86 | 14 | 8,9 |
| Фенантрен | 1840 | 140 | 93 |
| Антрацен | 600 | 24 | 24 |
| Флуорантен | 1430 | 640 | 110 |
| Пирен | 520 | 490 | 27 |
| Бензантрацен | 230 | 3 | 9,9 |
| Хризен | 160 | 24 | 41 |
| Бенз(b)флуорантен | 45 | 24 | 23 |
| Бенз(k)флуорантен | 34 | 13 | 14 |
| Бенз(a)пирен | 35 | 7,3 | 4 |
| Дибензантрацен | 18 | 5,8 | 5,3 |
| Бензперилен | 10 | 16 | 6,5 |
| Инденопирен | 9 | 14 | 21 |

Из таблицы 8 видно, что под воздействием ультрафиолетового излучения происходит деструкция ПАУ. Зафиксировано снижение содержания нафталина, антрацена, флуорена и фенантрена в 10-20 раз. Содержание аценафтилена уменьшилось в 170 раз. Аналогично ведут себя большинство компонентов смеси.

Следует отметить, что обнаруженное нами явление фотолиза ПАУ хорошо совпадает с раннее опубликованными данными. Так французские исследователи показали благоприятное воздействие фотолитической деструкции антрацена и его превращение в антрахинон для последующей деструкции ассоциацией морских микроорганизмов /47/. Авторы отмечают, что разрушение 50% антрахинона в глубинных условиях происходит за 10 суток. Анализ продуктов распада показал наличие следовых количеств бензойной и фталевой кислот (рис.7.).

Рис.7.Процесс фотолитической деструкции антрацена

Необходимо отметить, что окисление антрацена и его превращение в антрахинон, по видимому, является инициирующим фактором для последующей микробной деструкции.

Анализ экспериментальных данных показывает, что бензперилен и инденопирен являются наиболее устойчивыми к действию облучения. Аналогичная картина наблюдалась и при микробной деструкции ПАУ. По-видимому, это явление, обнаруженное при деструкции ПАУ различными методами, может объясняться увеличением реакционной способности продуктов фотолитической и микробной деструкции ПАУ.

Из раннее приведенных данных видно, что первоначальной общей стадией разложения ароматического кольца является его окисление. В дальнейшем такие структуры, как, например о-оксибензойная кислота, продукт разложения нафталина, легко вступают в реакции присоединения с более сложными продуктами деструкции, например, с окисленной формой пирена, с образованием и накоплением в системе инденопирена (рис.8.):

Рис.8.Образование инденопирена

Высказанное предположение и возможный механизм протекания реакций между продуктами деструкции нуждается в дополнительной экспериментальной проверке. Однако, явление фотолитической деструкции ПАУ можно использовать для предобработки этих веществ при проведении их микробной утилизации.

**7.2.4.Происхождение микроорганизмов-деструкторов ПАУ**

Интенсивное промышленное воздействие на окружающую среду началось сравнительно недавно - в XIX веке. Очевидно, что за столь короткий промежуток времени не могли эволюционировать ферментные системы, способные разрушать ПАУ. Однако литературные данные /4,6,11,14,37,/ и наши собственные эксперименты показывают, что современные микроорганизмы такой способностью обладают, то есть в их геноме уже есть гены деструкции этих веществ.

Вероятнее всего, что появление первых микроорганизмов, разрушающих ПАУ следует отнести к эпохе появления первых сосудистых растений, содержащих лигнин в клеточной стенке - древовидных папоротников. Возраст самых древних папоротникообразных составляет около 380 млн. лет (конец Силурийского периода) /48/. Древесина современных растений содержит ряд веществ, имеющих в своем составе нафталиновое ядро /15/. Под воздействием солнечного света и микроорганизмов (собственные данные), а также при горении биомассы /49/, могут образовываться (в результате процессов конденсации) более сложные ПАУ. Таким образом на Земле были все условия для естественного отбора микроорганизмов-деструкторов ПАУ, естественным резервуаром являются почва и лесная подстилка. Логично предположить, что эти микроорганизмы, после интродукции могут приобрести способность разрушать полиароматические вещества и фенолы. В случае низкой субстратной специфичности ферментной системы микроорганизма возможно разрушение ароматических экотоксикантов-ксенобиотиков (нитротолуолы, нитрофенолы, хлорфенолы ит.д.).

**7.2.5.Анализ возможности создания систем по утилизации твердых ПАУ-содержащих отходов**

В связи с ухудшением экологической обстановки перед исследователями встала задача разработки методов утилизации вредных отходов производства и коммунального хозяйства.

Предложенные нами методы фотолитической предобработки техногенных, ПАУ содержащих субстратов, и их микробной деструкции позволяют создать производство по утилизации коммунальных отходов, содержащих ПАУ. Примером таких отходов является листовой опад крупных городов, загрязненнй как ПАУ, так и маслами, смолами и жидкими нефтепродуктами. Предобработку фотолизом можно осуществлять без особых затрат выдерживая субстраты на специальных площадках. Летом для качественной предобработки будет достаточно 4-5 солнечных дней. Далее субстраты перемещают в ферментационные ангары и вносят увлажняющую среду и посевной материал. Инкубацию ведут при температуре 20-30ОС в течении 40-60-ти суток (в зависимости от ПДК экотоксикантов). Производственный процесс желательно вести в теплое время года (с мая по октябрь) так как в этот период не требуется расходовать энергию на обогрев ферментационных ангаров. В процессе ферментации образуется компост, который можно использовать как почвообразователь. Схема установки по переработке ПАУ содержащих отходов представлена на рисунке 9:

Рис.9.Схема установки по утилизации ПАУ содержащих отходов

**8.Стандартизация**

В работе использовались материалы, приборы, оборудование, посуда, отвечающие государственным и отраслевым стандартам. Перечень стандартов приведена в таблице 9:

таблица 9

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| №п/п | наименование | нормативный документ |
|  | 1.Материалы |  |
| 1 | Спирт этиловый | ГОСТ 17299-78 |
| 2 | Сахароза | ГОСТ 5833-75 |
| 3 | Дрожжевой экстракт | АО «Дифко» |
| 4 | Сусло пивное неохмеленное | АО «Бавария», Россия, г.СПб |
| 5 | Креозот | АО «Пропиточный завод»,  Россия, г.Отрадное |
| 6 | Бумага фильтровальная лабораторная | ГОСТ 12026-76 |
|  | 2.Приборы |  |
| 1 | Весы аналитические ВЛР-200 | ГОСТ 24104-88 |
| 2 | Лампа газоразрядная ПРК-7 | ГОСТ10771-82 |
| 3 | Хромато-масс-спектрометр LKB-2091 | LKB-BROMA, Швеция |
|  | 3.Оборудование |  |
| 1 | Шкаф сушильный МЛМ | ГОСТ 28115-89 |
| 2 | Шкаф вытяжной 2Ш-НЖ | ГОСТ 22360-86 |
| 3 | Автоклав | СТ СЭВ 28694-90 |
| 4 | Спиртовка | ГОСТ 28165-89 |
|  | 4.Посуда |  |
| 1 | Чашки Петри одноразовые, диаметр 90мм | ТУ 64-2-19-79 |
| 2 | Колбы качалочные 750мл | ГОСТ 822-81 |
| 3 | Пробирки 20мл | ГОСТ 1770-81 |
| 4 | Пипетки 2мл  5мл | ГОСТ 1770-81  ГОСТ 1770-81 |

**9.Охрана труда и окружающей среды**

Мероприятия, проводимые в разделе ’’Охрана труда и окружающей среды’’ очень важны, так как их выполнение обеспечивает безопасность проводимых экспериментов для человека и окружающей среды.

**9.1.Характеристика опасных и вредных производственных факторов**

Согласно /50/ ,опасные и вредные производственные факторы делятся на следующие группы: физические, химические, биологические и психофизические. К физическим опасным и вредным производственным факторам относят электричество, ультрафиолетовое излучение. Группа химических опасных и вредных производственных факторов и их воздействие на человека представлены в таблице 10, которая составлена в соответствии с /1,51,52,53/.

Биологические опасные и вредные производственные факторы отсутствуют, так как используемые микроорганизмы являются непатогенными.

**9.2.Пожаробезопасность**

Так как мы не можем рассчитать пожарную нагрузку, то нельзя определить категорию помещения по /54/. Согласно ПУЭ-85 /55/,класс взрывоопасной зоны лаборатории В-1б. На случай пожарной опасности в лаборатории имеются средства огнетушения: огнетушители марки ОХЛ-10, ОУ-2, ящик с песком, асбестовые одеяла. В целях электробезопасности все приборы в лаборатории заземлены.

Характеристика физико-химических, пожаровзрывоопасных и токсичных свойств сырья, готового продукта и отходов производства

таблица 10

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Физико-химические свойства вещества /51/ | | | | Пожаровзрывоопасные свойства /52/ | | | | | | | | Токсические свойства | | | | | | |
|  |  |  |  |  | | Температура, tо C | | Пределы распространения пламени | | | | |  | |  | |  | |
| Вещест-ва | Агрегат-ное состояние | Темпера-тура кипения, | Темпера-тура плавле- | Плот-ность,  кг/м3 | | Вспышки | Само-воспла- | | Температурные, tоС | | Концентрационные, об. % | | | Характер действия на | | Класс  опасности | | ПДКр.з  ­мг/м3 | | |
|  |  | tоС | ния, tоС |  | |  | менения | | нижний | верхний | нижний | верхний | | организм  человека / 2 / | | /53 / | | / 53/ | | |
| Этанол | ж | 78.5 | -114.6 | 785 | | 13 | 400 | | 11 | 41 | 3.6 | 17.7 | | Действует на ЦНС и печень | | IV | | 1000 | | |
| Нафталин | тв | 218 | 80.28 | 1140 | | 80 | 520 | | - | - | 0.9 | - | | Действует на ЦНС, желудок, почки. Лейкоцитоз | | IV | | 20 | | |
| Антрацен | тв | 351 | 216, 6 | 1132 | | 121 | 472 | | - | - | - | - | | Фотодерматит, эритема | | - | | - | | |
| Аценафтилен | тв | 270 | 92 | 1160 | | - | - | | - | - | - | - | | Действует на кожу, слизистую оболочку | | - | | - | | |
| Аценафтен | тв | 279 | 96 | 831 | | - | 359 | | - | - | 12 | - | | Действует на почки, печень | | III | | 10 | | |
| Пирен | тв | 392 | 149 | 1277 | | - | - | | - | - | - | - | | Лейкоцитоз, нарушения функции печени | | - | | - | | |

**9.3.Санитария и гигиена**

Обеспечение нормальных санитарно-гигиенических условий в лаборатории необходимо для нормальной работы персонала и уменьшения опасности профессиональных заболеваний и травм.

Для обеспечения нормальных метеорологических условий и чистоты воздуха в лаборатории установлена вытяжная вентиляция 2Ш-НЖ /56/ ,скорость движения воздуха 0,4 метра в секунду. Согласно /57/ необходимо соблюдать следующие правила работы с приточно-вытяжной вентиляцией:

1.Перед началом работы необходимо проверить, работает ли вытяжная система и есть ли тяга воздуха через дверцы шкафа.

2.При наличии в шкафу зазоров между шкафом и стенкой или других неисправностей работать в вытяжном шкафу нельзя.

3.Мотор вытяжного вентилятора необходимо включить за 15 минут до начала работы. Клапан открывают постепенно, газовую хлопушку на воздуховоде закрывают.

4.Во время работы дверцы шкафа не должны открываться больше чем на 1/3 рабочего сечения.

Запрещается:

Работать с полностью открытыми дверцами.

Просовывать голову внутрь шкафа.

Пользоваться неисправными вентиляционными установками

Для поддержания теплового равновессия между теплом человека и окружающей средой в лаборатории имеется система центрального отопления.

По задачам зрительной работы лаборатория относится к I-ой группе. Освещение совмещенное: естественное боковое одностороннее (одно окно) и искусственное освещение лампами дневного света. Разряд зрительных работ-IVв. Освещенность от источников общего искусственного освещения 200лк (три газоразрядных лампы) /58/.

Для предотвращения травм и оказания первой медицинской помощи при несчастных случаях, в лаборатории в доступном месте имеется аптечка В аптечке должны быть: перевязочные материалы, 5%-ый спиртовой раствор йода, 2%-ый раствор борной кислоты, 2%-ый раствор гидрокарбоната кальция , 2%-ый раствор перманганата калия, 2%-ый раствор уксусной кислоты, этиловый спирт, активированный уголь, сердечные препараты, пластырь, жгут, глазные пипетки, стеклянные палочки, ножницы. Весь персонал, работающий в лаборатории, должен быть обучен способам оказания первой медицинской помощи.

**9.4.Безопасная работа в лаборатории**

При выполнении работы некоторые операции обладали потенциальной опасностью. Перечень и характеристика этих операций сведены в таблице /11/.

В работеиспользовались ЛВЖ и горючие жидкости, токсичные вещества (смесь ПАУ) культуры грибов, а также электрооборудование (весы, ультрафиолетовая лампа, хромато-масс-спектрометрический прибор, холодильник, автоклав). Правила работы с выше названными веществами и приборами приведены ниже.

Правила работы с ЛВЖ и горючими жидкостями

1.Вся работа с ЛВЖ должна вестись только в вытяжном шкафу при отсутствии открытого источника огня.

2.Переливание ЛВЖ должно проводиться при отключении нагревательных приборов.

3.На рабочем месте разрешается держать горючие вещества в том количестве, которое необходимо в данный момент.

4.Хранить ЛВЖ в лаборатории разрешается в количестве не превышающем суточную потребность ( до 2-3 л на человека ).

5.ЛВЖ должны храниться в закрытых на замок металлических ящиках с песком на дне ( слой 4-5 см ).

6.Перед началом работы с ЛВЖ необходимо подготовить средства тушения пожара.

7.Работать только в перчатках и халате.

Анализ технологических операций с точки зрения опастностей и вредностей при их проведении

таблица 11

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование техно-логичес-кой опера-ции | Оборудо-вание для проведе-ния операции | Реактивы  необходи-мые для проведе-ния  операции | Возможные опасности и вреднос-ти | Причина  появления данной опасности и вреднос-ти | Меры по безопасному прове-дению данной операции |
| Подготов-ка посуды к стерилизаци | Стеклян-ные колбы, чашки Петри, пробирки | - | Порезы | Бой посуды | Предвари-тельный просмотр посуды |
| Взвешива-ние реактивов | Весы  ВЛР-200 | Компонен-ты пита-тельной среды | 1.Пораже-ние электро-током. | 1.Неисправность розетки, шнура, отсутствие заземле-ния. | 1.Проверка исправнос-ти прибора перед работой. |
| Работа с микроорга-низмами | Спиртовка, УФ-лампа | Этанол, УФ-излучение,  питатель-ная среда,  культуры  грибов | 1.Термический ожог  2.Ожог глаз  УФ-излу-  чением  3.Порезы | 1.Возгора-ние волос  2.Вход в бокс при  включенноной УФ- лампы  3.Использование би-  той посуды | 1.Волосы  убирать под косынку  2.Вход в помещениечерез 45 мин После  отключе-ния УФ-  ламп 3.Использование исправной  посуды |
| Мытье  посуды | Моечная  комната,  щетки | Моющие  средства  - | 1.Терми-ческий  ожог  2.Порез | 1.Попада-ние кипятка на руки  2.Разбитая  посуда | 1Соблю-  дать осторож-  ность при мытье  2.Исполь-зование  исправной  посуды |

Работа с токсичными веществами

При работе с этими веществами необходимо предварительно изучить их физико-химические свойства, характер действия на человека и соблюдать особые меры предосторожности:

1.Работа с токсичными веществами должна проводиться в вытяжном шкафу, мощность вытяжной вентиляции которой обеспечивает не менее 15-кратный обмен воздуха.

2.Все работы должны вестись в халате и резиновых перчатках.

3.Токсичные вещества хранятся в стальном ящике под замком, на каждой бутылке должна быть этикетка.

4.Стеклянные колбы, банки и другую тару с токсичными веществами нельзя оставлять на столе.

5.Наполнение сосудов следует проводить сифоном или пипеткой с грушей.

6.После проведения эксперимента приборы и посуда тщательно обезвреживаются исполнителем.

7.После окончания работы необходимо тщательно вымыть руки, остатки растворов токсичных веществ слить в специальные склянки.

Правила работы с микроорганизмами

Поскольку в работе использовались непатогенные микроорганизмы, при работе с ними нужно соблюдать обычные меры безопасности /59/:

Работать только в спецодежде, на рабочем месте не принимать пищу, не пить и не курить.

По окончании работы тщательно вымыть руки или принять душ. Посуду мыть 2%-ым раствором соды и горячей водой.

Рабочее место обрабатывать дезинфицирующими средствами, этиловым спиртом и стерилизовать бактерицидными лампами.

Работа с электроприборами.

Все электрооборудование лаборатории должно соответствовать ПУЭ-85 /55/.

При работе с электроприборами необходимо соблюдать следующие правила:

1.Нельзя работать с приборами одному человеку.

2.Следить за исправностью приборов, штепсельных вилок, розеток, проводов, за отсутствием на приборах оголенных токоведущих частей.

3.Убедиться перед работой, что на заземленных приборах подключено заземление.

4.Включать прибор разрешается только в ту сеть, напряжение которой соответствует напряжению, обозначенному на приборе.

Согласно/ / класс помещения по опасности поражения человека электрическим током - без повышенной опасности .

**9.5.Меры первой помощи при несчастных случаях в лаборатории**

Доврачебная помощь должна быть оказана пострадавшему товарищами по работе. Согласно/60/ необходимо принять следующие меры:

1.При порезах рану промывают 2%-ым раствором перманганата калия, смазывают края раны раствором 5%-ым йода и накладывают стерильную повязку. Рану нельзя промывать водой.

2. При ушибах пострадавшему нужно создать покой, к ушибленному месту прикладывать холодные примочки до прихода врача.

3. При венозном кровотечении накладывать давящую повязку и, если кровотечение не останавливается, накладывается жгут или закрутка.

4. При химических ожогах кожу промывают обильной струей воды, а затем обрабатывают:

-при ожогах кислотами - слабым раствором питьевой соды, или присыпают обожженное место мелом или окисью магния;

-при ожогах щелочами - слабыми растворами уксусной или лимонной кислоты.

5.При попадании химических веществ в глаза нужно немедленно обильно промыть глаза струей воды.

6.При поражении электротоком:

-нельзя брать пострадавшего голыми руками, чтобы освободить пораженного током, необходимо отключить электроприбор;

-проверить пульс и дыхание;

-сообщить о случившемся в ближайший медпункт;

-если дыхание и пульс есть, пострадавшего необходимо положить в удобное положение, дать понюхать нашатырный спирт, если пульса нет, пораженного положить на ровную поверхность и приступить к искусственному дыханию "рот в рот" с частотой 10-12 вдуваний в минуту. Второй человек может делать одновременно массаж сердца со скоростью 60-70 раз в минуту. Следует срочно вызвать врача.

7.При термических ожогах необходимо пораженный участок кожи закрыть сухой асептической повязкой, при этом нельзя как либо очищать кожу. Затем следует обратиться в медпункт.

8.При ингаляционных поражениях парами и аэрозолями токсичных веществ пострадавшего необходимо вывести (вынести) на свежий воздух, освободить то стягивающей одежды, создать ему абсолютный покой, положить на спину тепло укутать и вызвать врача.

**9.6.Охрана окружающей среды**

В ходе дипломной работы, в процессе экспериментов возникали производственные отходы. Их характеристика представлена в таблице 12.

Поскольку возможности повторного использования отходов нет, их необходимо утилизировать. Растворы реактивов после работы направлялись в зависимости от вида в органический или неорганический слив для дальнейшего их обезвреживания и утилизации. Все опасные отходы института утилизируются на специальном полигоне.

Характеристика производственных отходов

таблица 12

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наиме-нование отхода | Коли-чество м3/÷ | Агре-гатное состоя-ние | Т,  0С | Наименование вред-ных приме  сей | Содержание вред-ных примес-  ей, % | Приме-чание |
| Отработанные питательные среды | 0.05-0.1  кг/нед | Тв. | 25 | ПАУ | 0.025  (масс.) | На  свалку |
| Отработанные культуры микроорганиз-мов | 50 гр  в месяц | Тв. | 25 | Споры и вгетативн-ый мицелий | 0.1-  -1%  (масс.) | На  автокавир-ование и затем на свалку |

**10.Технико-экономическая оценка результатов исследования**

**10.1.Анализ рынка возможной реализации результатов исследования**

**10.1.1.Сегментация рынка**

Потенциальным потребителем идеи является промышленное производство- утилизация целлюлозного мусора. Проблема хранения и переработки изделий и конструкций из древесины, пропитанной целью консервации различными фунгицидными веществами, является одной из важнейших проблем утилизации отходов лигноцеллюлозного сырья. Подобные изделия в соответствии с жесткими требованиями экологической безопасности трудно утилизировать традиционными методами: сжиганием или захоронением в почве, так как это вызывает интенсивное загрязнение атмосферы или подпочвенных вод продуктами термического или химического разложения используемых фунгицидных добавок. Наиболее перспективными и экологически безопасными являются биотехнологические методы переработки данного вида отходов, основанные на ферментативной активности микроорганизмов

В настоящее время исследования процессов деградации ПАУ имеют большой интерес у ученых США, Японии, стран ЕЭС , России. Большинство работ финансируются химическими фирмами или фирмами, работающими в сфере защиты окружающей среды.

**10.1.2.Позиционирование товара**

Существуют несколько альтернативных подходов для решения данной проблемы - утилизации коммунальных (целлюлозных) отходов:

Вариант №1. Химическая .обработка-варка щепы- приготовление почвы или компоста.

Связан с использованием химических реагентов, вызывающих загрязнение объектов окружающей среды (кислоты, щелочи). Технологический процесс варки целлюлозы на заводах целлюлозно-бумажной промышленности предполагает большой расход технической воды и образование промышленных стоков. Образуются неутилизированные продукты- целлюлоза и лигнин

Вариант №2. Принудительное сжигание с избытком воздуха - зола - приготовление компостов.

Такой способ представляет экологическую опасность , связанную с образованием вторичных газообразных отходов, загрязняющих атмосферу. Метод будет требовать значительных расходов энергоносителей, дорогостоящего, оборудования по газоочистке продуктов термической обработки ПАУ.

Вариант №3. Измельчение до опилок - обработка - бактериями - органический субстрат - приготовление компостов

Данный метод относится к биотехнологическому и предполагает использование анаэробных бактерий Указанный процесс проходит только в отсутствии кислорода и требует определенных затрат на создание герметичного резервуара. Образуется значительное количество газов, таких как: метан, сероводород, углекислый газ. К отходящим газам будут добавляться продукты переработки ароматических углеводородов, что затрудняет использование метана в бытовых условиях качестве энергоносителя. Требуются затраты на очистку и разделение газов.

Предложенный нами метод переработки древоразрушающими грибами не требуют больших затрат энергоносителей, расхода химических реагентов. При проведении процесса отсутствует выделение токсичных газов, что снижает вопрос о создании систем газоочистки. Увеличивается скорость процесса и уменьшается число производственных стадий (выпадает стадия удаления ПАУ). Полученный продукт разложения после проверки на патогенность и токсичность для рыб и животных может быть направлен на приготовление почв и компостов.

На базе разработки нашей идеи существуют ряд проблем:

1.Технические: необходимо обеспечить надежную аэрацию, перемешивание, которое не оказывало бы сильного влияния на рост микроорганизмов. Необходимо обеспечить очистку отходящих от спор газов. Необходимо подобрать оптимальные температуру и влажность для роста микроорганизмов.

2.Социальные:так как производство вредное, необходимо разработать систему охраны труда.

**10.2.Расчет затрат на проведение исследовательской работы**

Затраты на проведение исследовательской работы могут состоять из текущих и капитальных. Текущие затраты возникают при выполнении любого исследования. В их состав входят: затраты на израсходованные в процессе работы сырье, материалы, реактивы, различные виды энергии, стеклянную посуду и приборы, амортизационные отчисления от стоимости лабораторного оборудования.

Капитальных затрат в ходе дипломной работы не было.

**10.2.1.Расчет текущих затрат**

Затраты на сырье, материалы и реактивы, израсходованные на проведение исследования, для каждого вида ресурсов:

n

Зм=ΣPi.Цi , i=1,2,...n, где

i=1

Pi- расход i-го вида материальных ресурсов (в натуральных еденицах измерения)

Цi- планово-заготовительная цена, т.руб.

Результаты расчета приведены в таблице 13.

Расчет затрат на стеклянную посуду представлен в таблице 14

Энергетические затраты включают в себя расходы на электроэнергию, пар, воду, холод, использованные на технологические нужды.

Затраты на электроэнергию:

Зэ=М.Кu.Т.Ц, где

М- мощность приборов, КВт;

Кu- коэффициент использования оборудования, Кu=0,8;

Т- время работы оборудования за весь период выполнения исследования, час;

Ц- цена 1КВт ч электроэнергии, т.руб., Ц=0,195 .

Результаты расчета приведены в таблице 15.

Затраты на другие виды энергии:

n

Зв=Σ Рi Цi ,i=1,2,...,n, где

i=1

Рi- ориентировочный расход воды (пара, холода), (в натуральных еденицах)

Цi- цена, т.руб., (цена 1м3 воды=4,16т.руб.).

Сумма амортизационных отчислений:

Ф На Т

А = \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ , где

100 12

Ф- стоимость оборудования и приборов, использованных для проведения исследований, т.руб. ;

На- годовая норма амортизации, На=10%;

Т-время использования приборов.

Результаты расчета приведены в таблице 16.

Расчет затрат на сырье, материалы и реактивы

таблица 13

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименован-ие | Ед. Изм. | Количество израсходованных материалов | Цена, т.руб. | Сумма, т.руб. |
| Этанол | л | 10 | 20 | 200 |
| Среда Чапека | л | 2 | 12 | 24 |
| Сахароза | кг | 0,2 | 48 | 9,6 |
| Агар-агар | кг | 0,04 | 360 | 14,4 |
| Дрожжевой экстракт | кг | 0,005 | 250 | 1,25 |
| Сусло пивное неохмеленное | л | 2 | 6 | 12 |
| Креозот | кг | 0,5 | 10 | 5 |
| Бумагафильтр-овальная | упаковка | 1 | 5 | 5 |
| Всего: |  |  |  | 271,25 |

Затраты на стеклянную посуду

таблица14

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Ед. Изм. | | Количес-тво | | Цена, т.руб. | | Сумма, т.руб. |
| Чашки Петри | шт | | 100 | | 1,125 | | 112,5 |
| Пипетки на: 2мл  5мл | шт | 5  5 | | 12  16 | | 60  80 | |
| Колбы качалочные на 750мл | шт | 12 | | 40 | | 480 | |
| Пробирки на 20 мл | шт | | 300 | | 1,6 | | 480 |
| Всего: |  | |  | |  | | 1192,5 |

Амортизационные отчисления на стеклянную посуду приняты в размере 30% от ее стоимости, что составляет 357750 рублей.

Расчет затрат на электроэнергию

таблица 15

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование обору-дования | М, кВт | Т, ч | Расход электроэнергии, кВт ч |
| Автоклав | 6 | 20 | 120 |
| Весы ВЛР-200 | 0,1 | 5 | 0,5 |
| Шкаф сушильный | 1,6 | 40 | 64 |
| Холодильник | 0,18 | 3600 | 648 |
| Газоразряд-ная лампа ПРК-7 | 0,6 | 24 | 14,4 |
| Вытяжной шкаф | 2.5 | 10 | 25 |
| Хромато-масс-спектро-метр LKB-2091 | 2 | 5 | 10 |
| Всего: |  |  | 881,9 |

Зэ= 0,8 195 881,9=13757 рублей

В состав энергетических затрат помимо затрат на электроэнергию входят затраты на воду. В ходе выполнения работы расходовалось ориентировочно 7 л воды в день, а за весь период работы около 0,84 м3. Таким образом затраты на воду составляют 3494 рублей.

Расчет амортизационных отчислений

таблица 16

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименова-ние оборудован-ия | Ф, т.руб. | На, % | Т, мес. | А, т.руб. |
| Автоклав | 3500 | 10 | 0,33 | 0,88 |
| Весы ВЛР-200 | 3000 | 10 | 0,007 | 0,18 |
| Шкаф сушильный | 4000 | 10 | 0,06 | 2 |
| Холодильник | 1500 | 10 | 5 | 62,5 |
| Газоразрядная лампа ПРК-7 | 1500 | 10 | 0,03 | 0,38 |
| Вытяжной шкаф | 8500 | 10 | 0,014 | 0,99 |
| Спиртовка | 30 | 10 | 0,5 | 0,13 |
| Хромато-масс-спектрометр | 1200000 | 10 | 0,007 | 70 |
| Всего: |  |  |  | 137,06 |

Смета затрат на проведение работы

таблица 17

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование статьи затрат | Сумма, руб. |
| Сырье, материалы и реактивы | 271250 |
| Энергетические затраты:  -электроэнергия  -вода | 137576  3494 |
| Стеклянная посуда | 1192500 |
| Амортизационные отчисления  -на стеклянную посуду  -на оборудование | 35750  137060 |
| Всего: | 2099630 |

**10.2.2.Расчет затрат на проведение дополнительных работ**

Для полного завершения исследований необходимо провести ряд дополнительных мероприятий:

1.Оптимизация питательной среды:

-по содержанию сахаров (дополнительного источника углерода)

-по содержанию дрожжевого экстракта (стимулятора роста)

2.Оптимизация параметров технической установки

Расчет затрат на сырье, материалы и реактивы представлен в табл.18:

Расчет затрат на сырье, материалы и реактивы.

таблица 18

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Ед. Изм. | Количество израсходованных материалов | Цена, т.руб. | Сумма, т.руб. |
| Среда Чапека | л | 400 | 12 | 4800 |
| Сахароза | кг | 12 | 48 | 576 |
| Дрожжевой экстракт | кг | 0,5 | 250 | 125 |
| Всего: |  |  |  | 5501 |

Расчет затрат на стеклянную посуду представлен в таблице 19

Затраты на стеклянную посуду

таблица 19

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Ед. Изм. | | Количес-тво | | Цена, т.руб. | | Сумма, т.руб. |
| Колбы качалочные на 750мл | шт | 15 | | 40 | | 600 | |
| Колба мерная на 500 мл. | шт | | 2 | | 20 | | 40 |
| Всего: |  | |  | |  | | 640 |

Амортизационные отчисления на стеклянную посуду составляют 192000 рублей.

Расчет затрат на электроэнергию представлен в таблице 20:

Расчет затрат на электроэнергию

таблица 20

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Наименование обору-дования | М, кВт | Т, ч | Расход электроэнергии, кВт ч |
| Насос-компрессор | 2,5 | 7200 | 18000 |
| Фильтр отходящих газов | 1,6 | 7200 | 11520 |
| Хромато-масс-спектрометр LKB-2091 | 1,6 | 40 | 64 |
| Всего: |  |  | 29530 |

Зэ=0,8 195 29530=4606680 рублей.

На весь период проведения дополнительных работ необходимо, ориентировочно, 500л воды, затраты на воду составят 2080 рублей.

Амортизационные отчисления на оборудование для дополнительных работ представлены в таблице 21:

Расчет амортизационных отчислений.

таблица 21

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименова-ние оборудования | Ф, т.руб. | На, % | Т, мес. | А, т.руб. |
| Фильтр отходящих газов | 200 | 10 | 10 | 16,67 |
| Насос компрессор | 1500 | 10 | 10 | 125 |
| Хромато-масс-спектрометр LKB-2091 | 1200000 | 10 | 0,007 | 70 |
| Ферментационный ангар | 2000 | 10 | 10 | 166,67 |
| Всего: |  |  |  | 378,34 |

Смета затрат на проведение дополнительных работ

таблица 22

|  |  |
| --- | --- |
| Наименование статьи затрат | Сумма, руб. |
| Сырье, материалы и реактивы | 550100 |
| Энергетические затраты:  -электроэнергия  -вода | 4606680  2080 |
| Стеклянная посуда | 640000 |
| Амортизационные отчисления:  -на стеклянную посуду  -на оборудование | 192000  378340 |
| Всего: | 6369200 |

**11.Выводы и предложения**

1.Предложена модифицированная среда Ван-Итерсона позволяющая селективно отбирать целлюлолитические грибы, резистентные к ПАУ.

2.Выделены и охарактеризованы пять штаммов ПАУ-резистентных микромицетов, эффективно разрушающие загрязненные ПАУ лигноцеллюлозные отходы.

3.Исследован процесс микробной деструкции 16-ти компонентной смеси ПАУ. Показано, что грибы *Phanerohaete chrysosporium* и *Trichoderma lignorum* эффективно разрушают все ее компоненты.

4.Исследован процесс фотолитической деструкции 16-ти компонентной смеси ПАУ. Показана эффективность использования УФ-облучения для предобработки ПАУ-содержащих субстратов.

5.Обнаружено явление перераспределения вещества между компонентами смеси ПАУ. Показано, что данный процесс протекает как при микробной, так и при фотолитической деструкции смеси. Предложен возможный механизм реакции, приводящей к накоплению в смеси многоядерных ПАУ.

**12.Список использованной литературы**

1.Decolourisaiation of an artificial textile effluent by Phanerochaete chrisosporium /Kirby Niamh, Mc Mullan Geoffrey, Marohant Roger// Biotechnol. Lett. -1995.-17, №7. - c.761-764. - Англ.

2.Вредные вещества в промышленности, Т.1, 2, 3. / Под ред. Лазарева Н.В. -М: Химия, 1976, 1977.

3.Деградация природных полимеров мицелиальными грибами- продуцентами биологически активных веществ./ В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба. // Прикл. Биохимия и микробиология. -1991. -27, №5. - с.687-694.

4.Микробиология, том 64, №2, 1995, с.197-200, Л.А. Головлева, З.И. Финкельштеин, Б.П. Баскунов.

5.Monitoring the biological treatment of antracene- contaminated soil in a rotating - drum bioreactor /Banerjee D.K., Fedorak P.M.., Hashuimoto A.K., Pickard M.A.. //Аррl. Microbiol. And Biotechnol. - 1995. - 43, - с.521-528. - Англ.

6.Naphthalene biosorption in soil /water system of low or hihg sorptive ceparty / Whitman B.E., Mihelcic J.K.,Lucking D.R.// Appl. Microbiol. and Biotechnol. -1995. - 43, №3. - с.539-544. - Англ.

7.Degradation of polycyclic aromatic hyidrocarbons by pyre strains and by defined strain associations: Inhibition phenomena and cometabolism / Bouchez M..T., Vandecastcele J.M., Blanchet D.S. // Appl. Microbiol. and Biotechnol. - 1995. - 43, №4. - с.156-164. - Англ.

8.Verbesserte Nahrstoffgemische fur die Bioremediation verschmutzter Boden und Gewasser / Holtwiesche Bettina, Weiss Albrichet. - 1992.

9.Phitochemically enhanced microbiol degradation of enviromental pollutants / Matsumura Fumio, Katayama Arata; The Rogents of the University of Califonia. -1991

10.Isolation and characterization of PAH - degrading soil bacteria. Abstr. Keystone Symp. Environ. Biotechnol., Lark Tahol, Calif March 16-22, 1995 / Loyd - Jones Gareth, Hunter David W // J.Cell. Biochem. - 1995. - Suppl. 21a. - с.49. - Англ.

11.Metabolism of benz[а]antracene by the filamentous fungus Canninghamella elegans / Cerninglia Care E., Gibson David. T., Dodage Robert H. // Appl. and Environ. Microbiol. - 1994. - 60, №11. - с.3931 - 3938. - Англ.

12.Sequence and expression of the tol DIH genes involved in the last three steps of toluene degradation by Pseudomonas putida F1 / Lau Peter C.K., Bergeron Helene, Lable Diane, Wang Ying, Broussea Roland, Gibson David T // Gene. - 1994. - 146, №1. - с.7-13. - Англ.

13.Сarbon source-dependet ihibition of xyl operan expression of the Pseudomonas putida TOL plasmid/ Holtel Andreas Marques Silvia, Mohler Isabel, Jakubzik Ute // J. Bacteriol. - 1994. - 176, №6. - с.1773-17776. - Англ.

14The oxidation of pyrene and benzo[а]purene by nonbasidiomycete soil fungi/ Launen Loren, Pinto Linda, Wiebe Christine, Moore Margo // Can. J. Microbiol. -1995.-41, №6 - с.477-448. Англ.

15.Древесина (химия, ультраструктура, реакции): Пер. с англ. / Д. Фенгел, Г. Вегенер; Предисл. А.А. Леоновича // Под. ред. д-ра. техн. наук, проф. А.А. Леоновича - М.: пром-сть, 1988. - 512 с.

16.Роговин З.А. Химия целлюлозы.- М.: Химия, 1972.- 519 с.

17.Тарчевский И.А., Марченко Г.Н. Биосинтез и структура целлюлозы.- М.: Наука, 1985.- 279 с.

18.Эриньш П.П. Строение и свойства древесины как лигнокомпонентной целлюлозной системы// Химия древесины.- 1977.- №.- С. 8-25.

19.Preston R.D. Cellulose-microbril-orienting mechanisms in plant cells walls//Planta.-1988.-V.174, №1.-P. 67-74.

20.Билай Т. И. Биотехнологические основы трансформации целлюлозы в белково-ферментные препараты// Биохимия животных и человека: Респ. Мевжвед. сб. научных трудов/ АН УССР.- Киев, 1988. Вып. 12.- С. 42-54.

21.Mullings R. Measurement of sacharification by cellulases//Enzyme and Microb. Technol.-1985.-V.7, №12.-P. 586.

22.Schurz J.Cellulose solutions of the networt type: characterization and properties// Cell. Chem. and Tecnol.-1977.-V.11, P.3-28.

23.Эриньш П. П. Строение и свойства древесины как лигнокомпонентной полимерной системы// Химия древесины.-1977.-N1.-С. 8-25.

24.Огарков В. И., Киселев О. М., Быков В. А. Биотехнологические направления использования растительного сырья// Биотехнология.- 1985.-№З.- С. 1-15.

25. Sricscen M., Larsson S. and Miksche G. E. Gaschromatographische Analuse von Ligninoxydationsprodukten. VIII. Zur Struktur des Lignins der Fichte// Acta Chem. Scand.-V.27, P. 903-914.

26.Yang H. H., Effland M. J., Kirk T. K. Factors influencing fundal degradation of lignin in a representative lignocellulosic thermomechanical pulp// Biotechnol. Bioeng.- 1980.-V.22, №1. P. 65-77.

27.Khan A. W., Guiliano C., Ascher M. Comparative degradation of cellulose and sugar formation by three new isolated mesophilic aerobes// Biotechnol. Lett.-1983.-V.5, №6.-P. 395-399.

28. Israelidies C. J., Grant G. A., Han Y. W. Sugar level, fermentability and acceptability of straw treated with differnt acisd// Appl. Environ. Microbiol.-1978.-V.36, №1.-P. 43-46.

29. Агабекян Э.Л. Влияние дисперсности соломы на целлюлолитическую активность гриба Asp. terreus 17 p // Микробиол. пром. - 1982.- № 3.- С. 10-11.

30. Градова Н. Б., Касим-заде И. Э., Винаров А. Ю. Сравнительная оценка эффективности способов биоконверсии гребней винограда// Биотехнология.- 1991.- №1.- С. 85-88.

31. Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism/ S. B. Lee, I. H. Kim, D. D. Ryn, H. Taguchi// Biotechnol. Bioeng.-1983.-V.25, №1.-P. 33-51.

32. Влияние механохимической обработки соломы на качество получаемых кормовых гранул/ Ю.Ю.Каткевич, А.Соммер, З.Чернякова и др. // Химия древесины.- 1990.- №5.- С.72-78.

33.Механизмы реакции в органической химии. Пер. с англ. / П.Сайкс. // Под ред. д-ра хим. наук В.Ф.Травеня - М.:Химия, 1991. - с.448.

34.Микология. Э.Мюллер, В.Лефлер: Пер.с нем. - М.: Мир, 1995

35.Determination of accesibity of lignocellulosic substrates to enzymatic degradation by microscopy / Srebotnik Enald, Messner Kurt // EUREM 88: Proc. 9 th Eur. Congr Electron Microsc., York, 4-9 Sept., 1988. Vol. 3. - Bristol; Philadelphia, 1988. - с.107-110. - Англ.

36.Anaerobic oxidarion of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole celles and by cell extracts of a denitrifying Thanera sp. / Biegert Thomas, Fachs Georg // Arch. Microbiol. - 1995 - 163, №6. - с.407-417. - Англ.

37.Плазмиды биодеградации нафталина в ризосферных бактериях рода Pseudomonas / В.В.Кочетков, В.В.Балашина, Е.А.Мордухова // Микробиология том 66, №2 1997 стр.211-216, март- апрель.

38.Wite-rot fungus may degrade aromatic pollutants // Bioprocess. Technol. - 1990. - 12, - с.2-3. -Англ.

39.Aromatic compounds as model substances for enviromental pollutions. Energetic and kinetic calorimetric investigation of mineralization by microorganisms: [Рар.] IUPAC Conf. Chem.Thermodin., Clermont - Frrant, 17-22 Jully, 1994 //Pure and Appl. Chem. - 1995. -67, - с.947-954. - Англ.

40.Бороним А.М., Цой Т.В.Организация и регуляция экспрессии. Генетика . Т.4. - «Наука», 1989. - с.581-594.

Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов/ Р.А. Жукова, А.Д. Коммунарская, М.И. Прошина и др. - Л.: Медицина 1978.- 160 с.

42.Выделение из природных биоценозов микроорганизмов целлюлозодеструкторов, резистентных к биоцидным веществам / Козлов Г.В., Марьяновская Ю.В., Калей Я.А., Соколов В.Н., Гарабаджиу А.В. // Тез. докл. Научн.-техн. конф-ции. СПбГТИ (ТУ) им. М.М.Сычева- СПб.:Изд.СПбГТИ(ТУ), 1997, с.126.

43.Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С./ Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и имунологии: Учеб. Пособие. - М.: Медицина, 1993. - 240 с.: ил.

44.Выделение и характеристика микроорганизмов- деструкторов полициклических ароматических углеводородов / Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Кошелева И.А., Гаязов Р.Р., Карпов А.В., Боронин А.М. // Мкробиология Т.66, №2, 1997 с.269-272.

45.Funginal oxidotion makes large waste molecules manageable// Bioprocess. Technol.- 1991.-13, №4.-p. 7.

46.Деструкцiя моно-I полiциклiчних ароматичних вуглеводнiв культурами Pseudomonas fluorescens 1-D биовар II и Bacillus subtilis 2-D/ Думаньська Т.У.// Мiкробiол. Ж.-1995.-57, №1.-с.95-101.

47.Rontani J.F., Rambeioarisoa E., Jinsti J. Favourable interaction bettween photooxidation and bacterial degradation of antrhacene in sea Water. Chemosphere, 1985, 14, №11-12, р.1909-1912.

48.Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: В3-х т. Т.1.: Пер. с англ./ Под. ред. Р.Сопера.- М.: Мир, 1993.- 368 с., ил.

49.Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in biomass emission by liguid chromatography with fluorescence and chemiluminescensendetection / Gachanjana Anthony N., Worsfold Paul J. // Anal. Proc.- 1992.-29.-p.63-65.

50.ГОСТ 12.0.003-74 Система стандартов безопасности труда. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация

51.Справочник химика. Основные свойства неорганических и органических соединений. -Л:, Лен. отд. ГХИ, 1963. Т.2, с. 1168.

52.Пожаровзрывобезопасность веществ и материалов и средства их тушения: справ. изд. в 2-х томах. /Под ред. А.Н. Баратова, А. Я. Корольченко. -М: Химия, 1990-496 с.

53.Беспамятнов Г.П.,Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Справочник.-Л.: Химия, 1985.- 528 с.

54.НПБ-ОБ-95. Определение категорий помещений и зданий по взрывопожарной и пожарной опасности.

55.Правила устройства электроустановок. -М: Энергоатомиздат, 1985 - 640 с.

56.ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

57.ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные. Общие требования.

58.СНиП II-4-79 Естественное и искусственное освещение. Нормы проектирования. -М: Стройиздат, 1980.

59.ГОСТ 12.1.008-76 ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования безопасности.

60.Сборник общих правил и инструкций по технике безопасности при работе в химической лаборатории и мастерской. -Л: изд. ЛТИ им. Ленсовета, 1989.