საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

*ხელნაწერის უფლებით*

**ტერეზა წულუკიძე**

# ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაცია და დეგრადაცია მიკროსკოპული სოკოების მიერ

03.00.23 – ბიოტექნოლოგია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო
ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი

## დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

**ედიშერ კვესიტაძე**
ბიოლ. მეცნ. დოქტორი

**ლალი ქუთათელაძე**
ბიოლ. მეცნ. კანდიდატი

თბილისი
2006

# სარჩევი

**შესავალი.**

**თავი 1. ლიტერატურული მიმოხილვა.**

1.1. გარემოს ქიმიური დამაბუნძურებლები და ეკოლოგიური პრობლემები.

1.2. მიკროორგანიზმების როლი ბიორემედიაციაში და ბიორემედიაციის მეთოდები.

1.3. ტნტ-ს დეგრადაცია მიკროორგანიზმების საშუალებით.

**თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი.**

2.1 კვლევის ობიექტები.

2.2. საქართველოს სხვადასხვა რეგიონების ნიადაგებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

2.3. მიკროორგანიზმების საკვები არეები და კულტივირების პირობები.

2.4. ნიადაგებში ტნტ-ს შემცველობის განსაზღვრა.

2.5. მიკროორგანიზმების მიერ ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაციის უნარის დადგენა.

2.6. მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა.

2.7. ტნტ-ს განსაზღვრა სპექტროფოტომეტრული მეთოდით;

2.8. მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს გარდაქმნის პროდუქტების განსაზღვრა.

2.9. დესტრუქტორი შტამების გამოყენება დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციისათვის.

2.10. მონაცემების მათემატიკური დამუშავება.

**თავი 3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.**

3.1. ორგანული ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი.

3.2. ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამების შერჩევა.

3.3. მიკროსკოპული სოკოების ზრდა არომატული ბირთვის მქონე ორგანულ ტოქსიკანტებზე.

3.4. ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილირების უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა.

3.5. შერჩეული კულტურების მიერ ასიმილირებული და დეგრადირებული ტნტ-ს რაოდენობრივი შეფასება.

3.6. ტნტ-ს დესტრუქტორი შტამების კულტივირების პირობების დადგენა.

3.7. მიკროსკოპული სოკოების კულტივირების ხანგრძლივობის შესწავლა.

3.8 ტნტ-ს დეტოქსიკაციის შედეგად წარმოქმნილი პროდუქტების შესწავლა.

3.9. დესტრუქტორი შტამების გამოყენება დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციისათვის.

**დაკვნები.**

**გამოყენებული ლიტერატურის სია.**

# შესავალი

**პრობლემის აქტუალობა** გარემოს დაბინძურება მდგრადი ორგანული ტოქსიკანტებით გლობალურ ეკოლოგიურ პრობლემას წარმოადგენს.

ორგანულ დამბინძურებლებს შორის განსაკუთრებული ტოქსიკურობით გამოირჩევიან ნიტროარომატული, პოლიციკლური და პოლიქლორირებული დიბენზო-დიოქსინის ჯგუფის ნივთიერებები [183].

ნიტროარომატული ნაერთებიდან აღსანიშნავია 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლი (ტნტ), რომელიც სამხედრო არსენალში არსებულ ამაფეთქებელს წარმოადგენს. ამ ნაერთს ახასიათებს აშკარად გამოხატული ტოქსიკური ზემოქმედება ყველა ბიოლოგიურ ობიექტზე და ხანგრძლივი მდგრადობა ბუნებრივ პირობებში. ცნობილია, რომ ამ ნივთიერებებთან კონტაქტი იწვევს სხვადასხვა ფორმის პროფესიულ დაავადებებსა და მოწამვლას. ტნტ ადამიანის ორგანიზმში აღწევს კუჭ-ნაწლავის ტრაქტიდან, კანიდან და ფილტვებიდან, შემდეგ კი გროვდება ღვიძლში, თირკმელებსა და ცხიმოვან ქსოვილებში [56]. კლასიფიკაციით ტნტ მიეკუთვნება კანცეროგენურ ტოქსიკანტს. წყალში დაბალი ხსნადობის გამო იგი ნიადაგში ძირითადად არსებობს კრისტალური ფორმით, საიდანაც თანდათან ჩაირეცხება მიწისქვეშა წყლებში. გამონაკლისი ამ მხრივ

არც საქართველოა, სადაც სამხედრო პოლიგონების ტერიტორიაზე (და არა მარტო აქ) საკმაოდაა ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგები.

პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადები (პან-ები) არან შედუღებული არომატული ბირთვების მქონე რთული ნაერთები, ობიქინონის დამაბინძურებლები ატმოსფეროში და მიეკუთვნებიან ბიოდეგრადაციისადმი გამძლე ნივთიერებებს. ამის გამო პან-ები გროვდებიან გამძლე ფენებად გარემოში და აღმოჩენილნი არიან ნიადაგების და დანალექი ქანების ფართო დიაპაზონში, მათ შორის ანტიკური ხანის დანალექ ქანებშიც კი [62, 94]. 70-ზე მეტ ნაერთს, რომლებიც კლასიფიცირებულია როგორც პან-ები, აქვთ 2-დან 7-მდე ბირთვი. იმის გათვალისწინებით, რომ უფრო დიდი ნაერთები კანცეროგენურია, ისინი წარმოადგენენ დიდ საფრთხეს ადამიანის ჯანმრთელობისათვის. პან-ები დიდი რაოდენობით წარმოიქმნება საკვების დამზადების და გაზიფიკაციის პროცესში ქვანახშირის გამოყენებისას, ასევე გარემოში ხვდება მანქანების გამონაბოლქვის, სიმძლავრეების გენერაციის საწარმოებში, წვის პროდუქტების და წარმოების ნარჩენების სახით [33, 46]. მნიშვნელოვანი რაოდენობით წარმოიქმნება როგორც საწარმოო, ასევე საყოფაცხოვრებო პირობებში, რაც ქმნის სიძნელეებს ჩამდინარე წყლების გაწმენდის დროს.

მაღალი კანცეროგენურობით გამოირჩევიან პოლიქლორი-რებული არომატული ნაერთები. განსაკუთრებით ტოქსიკურია პოლიქლორირებული დიბენზო-დიოქსინის ჯგუფის ნივთიერებები. მათი უმრავლესობა, ინერტულობის გამო, დიდხანს რჩება ნიადაგში უცვლელი ფორმით და ინარჩუნებს ტოქსიკურობას. დიოქსინის ჯგუფის ქლორირებული ნაერთები წარმოიქმნებიან მიკრომინარევების სახით, ქლორის გამოყენებით მიმდინარე ტექნოლოგიური

პროცესებისა და წვის დროს. [180]. მათი უმნიშვნელო რაოდენობაც კი ადამიანის ორგანიზმში მოხვედრისას იწვევს ღვიძლის მონოოქსიგენაზური და სხვა ოქსიდაზური ფერმენტების ინდუქციას, წარმოიქმნება უამრავი ნაერთი, რაც განაპირობებს მეტაბოლიტურ ქაოსს ადამიანის ორგანიზმში. [26, 170].

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ წყალში ძალიან დაბალი ხსნადობისა და მაღალი სორბციული თვისებების გამო დიოქსინის მსგავს ნაერთებს არ შესწევთ უნარი მოახდინონ ვერტიკალური მიგრაცია ქვიშნარ ნიადაგებშიც კი, თუმცა, მკვლევართა მრავალ-წლიანი მუშაობის შედეგად დადგენილია, რომ დიოქსინებს შეუძლიათ შეაღწიონ ნიადაგის გარკვეულ ფენებში და საკმაოდ დიდხანს შეინარჩუნონ ტოქსიკური თვისებები [67, 182].

უკანასკნელ წლებში მთელ მსოფლიოში დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ორგანული ტოქსიკანტებით დაბინძურებული ნიადაგებისა და წყლების რემედიაციას სხვადასხვა საშუალებებით. ასეთი ნიადაგების გასუფთავებაში მნიშვნელოვან როლს აკუთვნებენ მიკროორგანიზმებს. გარემოს გასუფთავების არაბიოლოგიური ტექნო-ლოგიებისაგან განსხვავებით ბიორემედიაცია იაფ და ამომწურავ ტექნოლოგიად არის აღიარებული. მისი საშუალებით მიიღწევა გარემოს მაქსიმალური გასუფთავება და ხანგრძლივი დაცვა, ეკოლოგიური წონასწორობის დარღვევის გარეშე. დღეისათვის შესწავლილი და დახასიათებულია ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამები, რომლებიც ძირითადად ბაქტერიებსა და ბაზიდიალურ ანუ თეთრი ლპობის სოკოებს მიეკუთვნებიან.

სხვა ტაქსონომიური ჯგუფის მიკროორგანიზმებთან შედარებით მიკროსკოპული სოკოების დეტოქსიკაციის უნარი

ნაკლებადაა შეწავლილი, თუმცა ბოლო წლების მონაცემებით მიკროსკოპული სოკოების ზოგოერთი კლასის, კერძოდ, ზიგო- და დეიტერომიცეტების წარმომადგენლებს აღმოაჩნდათ 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის, პოლიციკლუტი ნახშირწყალბადების და სხვა ტოქსიკური ნივთიერებების ტრანსფორმაციის უნარი [177, 15, 9].

<u>კვლევის მიზანი და ამოცანები</u>. ჩატარებული სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა მიკროსკოპულ სოკოებს შორის ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაციის უნარის მქონე მაღალ აქტიური კულტურების შერჩევა და მათი გამოყენება ტნტ-თი და სხვა ტოქსიკური ნივთიერებებით დაბინძურებული ნიადაგების რემედიაციისათვის. ამ მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები:

- ორგანული ტოქსიკანტების მაღალი ბიოდეგრადაციული უნარის მქონე მიკროორგანიზმების შერჩევა როგორც დაბინძურებული ნიადაგებიდან გამოყოფილ, ასევე საქართველოს დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის მიკროორგანიზმების კოლექციაში დაცულ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის.

- შერჩეული მიკროორგანიზმების კულტურულ-მორფოლოგიური მახასიათებლების შესწავლა და ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა.

- ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამებისთვის კულტივირების პირობების შერჩევა და საკვები არეების ოპტიმიზაცია.

- მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს დეგრადაციის პროდუქტების დადგენა ნიშანდებული [1-$^{14}$C]-ტნტ-ს გამოყენებით.

- ტნტ-ს დესტრუქტორი შტამების მიერ ტნტ-ს დეგრადაციის უნარის დადგენა როგორც ლაბორატორიულ, ასევე საველე პირობებში.

<u>ნაშრომის მეცნიერული სიახლე.</u> ჩატარებული სამუშაოს შედეგად დადგენილია ორგანული ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარის მქონე კულტურები: *Mucor* sp.T1-1*; Trichoderma* sp. N2-6*; Aspergilus niger* K3-5*; Aspergilus niger* N2-2. შესწავლილია ამ შტამების კულტურალურ-მორფოლოგიური თვისებები და დადგენილია მათი ექსტრემოფილობის ხარისხი. ასევე დადგენილია მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტრინიტროტოლუოლის ბიოდეგრადაციის ხარისხი და მისი ბიოქიმიური გარდაქმნის შედეგად წარმოქმნილი პროდუქტები. შერჩეული შტამებისათვის შესწავლილია ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგების რემედიაციის უნარი როგორც ლაბორატორიულ, ასევე საველე პირობებში.

<u>ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა.</u> სელექციის შედეგად გამოვლენილია ორგანული ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოები *Mucor* sp. T1-1*; Trichoderma* sp. N2-6*; Aspergilus niger* K3-5*; Aspergilus niger* N2-2. დადგენილია, რომ ეს შტამები სხვადასხვა ექსტრემალურ პირობებში წარმატებით შეიძლება იქნას გამოყენებული სხვადასხვა ორგანული ტოქსიკანტებით დაბინძურებული ნიადაგების რემედიაციისათვის.

# თავი 1. ლიტერატურული მიმოხილვა

## 1.1. გარემოს ქიმიური დამაბინძურებლები და ეკოლოგიური პრობლემები

დღეისათვის, გარემოს დაბინძურება მდგრადი ორგანული ნაერთებით, თანამედროვე მსოფლიოს ერთ-ერთ ყველაზე მწვავე და გლობალურ პრობლემას წარმოადგენს. ეს ძირითადად გამოწვეულია, უკანასკნელი წლების განმავლობაში, სასარგებლო წიაღისეულის მასიური მოპოვებითა და დიდი რაოდენობით ქიმიური ნივთიერებების სინთეზით. ყოველივე ამან წარმოშვა დისბალანსი ბუნებაში, რაც უწყვეტ ბიოლოგიურ ციკლებში ბუნებრივი და სინთეზური მოლეკულების შეზღუდული შერწყმის შედეგია [6]. ქსენობიოტიკური რთული ნაერთების უმეტესობა ანთროპოგენული წარმოშობისაა, ქიმიური სინთეზის შედეგს წარმოადგენს და ნორმალური ბიოსფეროსათვის სრულიად მიუღებელია. ბუნებრივ ნივთიერებებთან შედარებით მათი «უცხოობის ხარისხი" განსხვავებულია: მოლეკულური აღნაგობით ისინი შეიძლება ბუნებრივთან ძალიან ახლოს იდგნენ ან მათგან სტრუქტურულად მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდნენ, მაგრამ მიუხედავად ამისა, მათი დიდი რაოდენობით უკონტროლოდ გავრცელება, გარემოს მატერიალური შემადგენლობის ცვლილებას და მის დაბინძურებას იწვევს [2]. ქსენობიოტიკების ქიმიური თვისებებიდან გამომდინარე აღსანიშნავია მათი ტოქსიკურობა, გარემო პირობებში მდგრადობა და მიკროორგანიზმების მიერ მათი დეგრადაციის თავისებურებები [6].

ბოლო წლებში განსაკუთრებით გაიზარდა მინერალური რესურსების გადამუშავების მასშტაბები, რამაც ბუნებაში დიდი როადენობით მძიმე მეტალების გაბნევა გამოიწვია. მათ შორის განსაკუთრებული ტოქსიკურობით გამოირჩევა ვერცხლისწყალი, კადმიუმი, ქრომი, ტყვია, სპილენძი, ბერილიუმი, თუთია და სხვ. მათი ორგანული შენაერთები ძლიერი ტოქსიკური თვისებებით ხასიათდებიან და დიდ ეკოლოგიურ საფრთხეს წარმოადგენენ [2].

ერთ-ერთ მწვავე ეკოლოგიურ პრობლემას წარმოადგენს ჰაერის დაბინძურება აზოტისა და გოგირდის ოქსიდებით, გოგირდწყალბადით, ნახშირბადის მონო- და დიოქსიდებით და ა.შ. ისინი ჰაერში განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით ხვდება წვის, მეტალურგიული ქარხნების გამონაბოლქვის, სატრანსპორტო საშუალებების ექსპლუატაციისას, ასევე საკვების მომზადებისა და საყოფაცხოვრებო ტექნიკის მოხმარების დროს [3, 193].

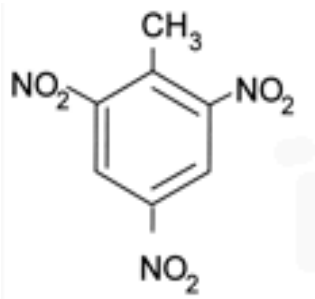
ანთროპოგენული დამაბინძურებლებიდან განსაკუთრებული მდგრადობით გამოირჩევიან ნიტროარომატული რთული ნაერთები. ამ დრომდე აღწერილია მხოლოდ ოთხი ბუნებრივი ნიტროარომატული ნაერთი (127, 84, 162]. ეს ფაქტი სავარაუდოდ ხსნის, თუ რატომ არიან ნიტროარომატული ნაერთები მდგრადი ბიოლოგიური დეგრადაციის მიმართ და რატომ არ ერთვებიან ადვილად ელემენტარულ ბიოგენურ ციკლებში [6].

მრავალი ნიტროარომატული ნაერთი, ისეთები, როგორიცაა ნიტრობენზინი, ო- და პ-ნიტროტოლუოლი, და ნიტრობენზოატები მიკროორგანიზმების საშუალებით შედარებით ნელა მინერალიზდება. ეს ქიმიკატები ფართოდ გამოიყენება პოლიურეთანული ქაფების, პესტიციდების, ფარმაცევტული პრეპარატების და ფეთქებადი

ნივთიერებების წარმოებაში [82], რომლებიც უფრო მდგრადია, ვიდრე ის საწყისი მასალა, საიდანაც ისინი არიან სინთეზირებული. დღეისათვის ხელმისაწვდომია მრავალმხრივი ამომწურავი კატაბოლიზმის გზების ნიმუშები, რომელსაც მივყავართ ნიტროარომატული რთული ნაერთების დეგრადაციამდე [20, 40, 41, 69, 75, 76, 87, 97, 98, 114, 131, 144-156, 175].

მსოფლიოში ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ნიტროარომატული ნაერთა – 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლი (ტნტ) [52]. ის ტრადიციული ასაფეთქებელი ნივთიერებაა, რომელიც ფართოდ გამოიყენება სამხედრო ძალების მიერ [34].

2,4,6-ტრინიტროტოლუოლი (ტნტ), იგივე ტოლი, ან ტროტილი არის უფერო ან მოყვითალო, უსუნო კრისტალური ნივთიერება. მისი ლღობის ტემპერატურაა 80,8°C, 50°C-ის ზევით ხდება პლასტიური, თერმომედეგია 215 °C-მდე, აფეთქების ტემპერატურაა 290 °C, სიმკვრივე 1,66გ/სმ$^3$, აფეთქების სითბო 4,19მჯ/კგ. გარემოში ბუნებრივად არ გვხვდება, მისი ქიმიური ფორმულაა $CH_3C_6H_2(NO)_3$ (სურ. 1.).




**სურ.1. ტნტ-ს სტრუქტურული ფორმულა**

ტნტ წყალში თითქმის არ იხსნება, კარგად იხსნება პირიდინში, აცეტონში, აცეტონიტრილში, ბენზოლში, ტოლუოლში, ქლორბენზოლში, დიქლორეთანში, შედარებით ცუდად ეთილის

სპირტში, მეთილის სპირტში, დიეთილეთერში, ტრიქლორეთილენში, ტეტრაქლორმეთანში, გოგირდნახშირბადში. ტნტ ადვილად აალებადი ნივთიერებაა, იწვის მკვეთრი, ჭვარტლიანი ალით, დიდი რაოდენობით აალებისას ფეთქდება. მექანიკური ზემოქმედების მიმართ ნაკლებად მგრძნობიარეა, ტემპერატურის მომატებისას დარტყმის მიმართ მგრძნობელობა იზრდება. ტნტ-ს ასაფეთქებლად იყენებენ დეტონატორებს: ტყვიის აზიდს და მგვრგვინავ ვერცხლისწყალს.

ტნტ-ს სინთეზი პირველად განხორციელდა 1863 წელს, გერმანელი მეცნიერის ვალბრანდის მიერ. სამრეწველო მაშტაბით 1891 წელს ის პირველად იყო წარმოებული გერმანიაში, 1901 წლიდან კი მიღებული იყო ყველა სამხედრო ძალების მიერ [100]. პირველი მსოფლიო ომის განმავლობაში ტნტ-ს წარმოება შემოიფარგლებოდა მხოლოდ ტოლუოლის იმ რაოდენობით, რომელიც იყო კოქსის წარმოების მეორადი პროდუქტი [100]. ტოლუოლი გახდა ადვილად ხელმისაწვდომი 1940 წლის შემდეგ, როგორც, ნავთობის მრეწველობის მეორადი პროდუქტი და მეორე მსოფლიო ომის დროს დაიწყო ტნტ-ს დიდი რაოდენობით წარმოება [100, 101]. ტნტ-ს ასეთმა ფართომასშტაბიანმა წარმოებამ, გამოიწვია სამხედრო ქარხნების ტერიტორიების დაბინძურება 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლით და მისი მეტაბოლიტებით [66].

აშშ-ში და ევროპაში, ტნტ-ს წარმოების დროს წარმოქმნილი ნარჩენებისა და ჩამდინარე წყლების არასწორი მოცილების გამო, ასევე წვის, დეტონაციისა და საბრძოლო მასალების დემონტაჟის დროს, ადგილი ჰქონდა სერიოზულ დაბინძურებას [34, 72]. დაბინძურებული იყო ის დანადგარებიც, სადაც ხდებოდა

ასაფეთქებელი ნივთიერებების გამოშვება და რეგულირება, რადგან იმ დროისათვის მოქმედი სტანდარტი არ პასუხობდა უსაფრთხოების მოთხოვნებს [165].

ცნობილია, რომ ტნტ-ს აქვს როგორც ტოქსიკური, ასევე მუტაგენური მოქმედება ცოცხალ ორგანიზმებზე, მათ შორის ადამიანებზეც [34, 72]. ტნტ-სთან შეხება იწვევს გამონაყარს, კანის და ლორწოვანის გაღიზიანებას, სისხლის ფორმულის ცვლილებას (პანციტოპენია), სისხლბადი ორგანოების დაზიანებას და ა.შ. [34, 101]. მუშა-მოსამსახურეებს შორის, რომლებიც მინაწილეობას იღებდნენ ტნტ-ს დამზადებასა და რეგულირებაში, შეიმჩნეოდა ტოქსიკური მოქმედება ღვიძლის მოწამვლით (ტოქსიკური ჰეპატიტი) და სისხლნაკლულობა [34, 101]. ეიმსის  საანალიზო ნიმუშების გამოცდის შედეგად ნაჩვენები იყო ტნტ-ს პოტენციური მუტაგენურობა [171]. აშშ-ს გარემოს დაცვის სააგენტოს [56,57] და სისმსივნის კვლევის საერთაშორისო სააგენტოს (IARC) კლასიფიკაციით ტნტ წარმოადგენს C-ჯგუფის კანცეროგენურ ტოქსიკანტს [94].

კანადის ბიოტექნოლოგიური ინსტიტუტეს მიერ კომპლექსური ბიოქიმიური და ციტოქრომული მეთოდებით დადგენილია ნიადაგში ტნტ-ს ეკოლოგიურად უსაფრთხო ზღვარი – 2 მგ/კგ [159].

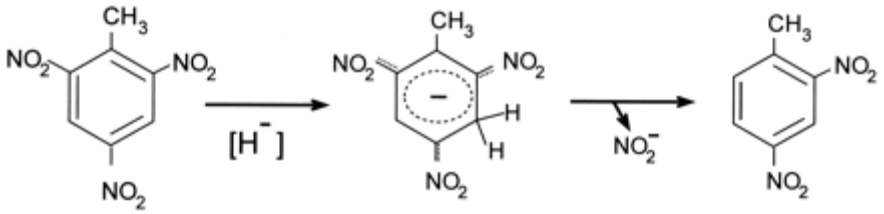
მრავალ  ცოცხალ ორგანიზმზე უარყოფითად მოქმედებს ასევე 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის გარდაქმნის პროდუქტები – (ამინონიტროტოლუოლები და დიამინონიტროტოლუოლები), რომლებიც შესაძლოა, გარემოსა და ადამიანებისთვის, იყვნენ ქიმიურად უფრო აქტიური და საშიში [74].

ქიმიურად ტნტ უფრო მდგრადია, ვიდრე მონო- და დინიტროტოლუოლები, ნაწილობრივ  იმის გამო, რომ

ნიტროჯგუფები არომატულ რგოლში სიმეტრიულად არიან განლაგებული, რაც ზღუდავს იმ კლასიკური დიოქსიგენაზების შეტევას, რომლებიც ჩართულია არომატული რთული ნაერთების მიკრობულ მეტაბოლიზმში [135]. აქედან გამომდინარე, ტნტ-ს ქიმიური სტრუქტურა გავლენას ახდენს მის ბიოდეგრადაციაზე და ბევრად უფრო ართულებს ამ მოლეკულის ბიოდეგრადაციის მექანიზმის დეტალურ ანალიზს.

ტნტ-ს ნიტროჯგუფების აღდგენისას, პირველი ნიტრო ჯგუფის აღდგენა ხდება გაცილებით უფრო სწრაფად, ვიდრე დანარჩენების. ეს გამოწვეულია იმით, რომ ნიტროჯგუფის ამინოჯგუფში გადასვლა ამცირებს ნიტროარომატული რგოლის ელექტროუარყოფითობას და შესაბამისად, მოლეკულის დარჩენილი ნიტროჯგუფების აღდგენისათვის, საჭირო ხდება უფრო დაბალი აღდგენითი პოტენციალი. ამის გამო ტრიამინოტოლუოლის წარმოქმნა მოითხოვს 200 mV-ზე დაბალ მნიშვნელობას, რომელიც აღმოჩენილია მხოლოდ უჟანგბადო გარემოში [71, 90]. ამერიკელმა მეცნიერმა აივერილმა აღნიშნა, რომ «ბაქტერიების მიერ ნიტროარომატულ ნაერთებში ($ArNO_2$) ნიტროჯგუფების აღდგენა ჩვეულებრივ მიმდინარეობს ორ-ელექტრონული პროცესით, როგორიცაა ნიტრატების აღდგენა დენიტრიფიკაციის მიმდინარეობისას” [11]. მოსალოდნელია, რომ $NO_2^-$ და ($ArNO_2$)–ის აღდგენის ქიმიური პროცესი იქნება ანალოგიური, რადგან როგორც ორგანული, ასევე არაორგანული სახეობები შეიცავენ აზოტს ერთნაირ ჟანგვით მდგომარეობაში (+3) და ორ N-O ბმას; თუმცა, აზოტის ატომში ელექტრონული ვალენტობის განლაგება, განსაკუთრებით ატომების წყვილების არარსებობა, ამსგავსებს ($ArNO_2$)–ს უფრო ნიტრატს ($NO_3^-$), ვიდრე ნიტრიტს ($NO_2^-$).

ტნტ-ს არომატულ ბირთვში ელექტრონების უკმარისობა შესაძლებელს ხდის ბირთვზე ნუკლეოფილურ შეტევას. შედეგად შეიძლება ჩამოყალიბდეს არაარომატული სტრუქტურა, როგორიცაა მეისენჰეიმერის π-კომპლექსი [60, 106, 160]. ეს რთული ნაერთები არიან მოწითალო-ყვითელი და აქვთ უარყოფითი მუხტი (სურ 2). ეს კომპლექსები შეიძლება ჩამოყალიბდეს *in vivo* აღდგენილი პირიდინის ნუკლეოტიდიდან ჰიდრიდების შეტევით. მეისენჰეიმერის π-კომპლექსი შეიძლება იყოს რეარომატიზირებული ნიტრიტის აღდგენის შემდეგ დინიტროტოლუოლის ფორმირებით. ამ ტიპის რთული ნაერთების წარმოქმნისათვის ჟანგბადი არ არის აუცილებელი, ასე რომ ეს პროცესები არის ალტერნატივა ნიტროარომატული მეტაბოლიზმისათვის, როდესაც, ტნტ-ს მსგავსად, ნიტროჯგუფების ჟანგბადით მოცილება შეუძლებელია.




**სურ. 2. ტნტ-მეისენჰეიმერის π-კომპლექსის წარმოქმნა.**

**(წყალბადის იონი შესაძლოა გაცემული იქნას ნადფ(H)-ის მიერ, რაც აძლევს საწყისს მეისენჰეიმერის π-კომპლექსს. არომატულობა აღდგება ნიტრო ჯგუფის მოცილებით).**

ნიტროჯგუფების აბიოტურ რეაქციებს შესაბამის ამინებთან ასევე ადგილი აქვს ნალექებში, ნიადაგში და წყალგაუმტარ ფენებში. ბუნებრივ სისტემებში არსებობს მრავალი პოტენციური ელექტრონული დონორი (მაგ. აღდგენილი რკინის სახეობები, აღდგენილი გოგირდის სახეობები და ბუნებრივი ორგანული მასალა), რომლებსაც შეუძლიათ აღადგინონ ნიტროარომატული ნაერთები აბიოტურ რეაქციებში [73, 90, 117]. ტნტ ასევე შედის რეაქციაში თიხის სილოქსანის ზედაპირთან და წარმოქმნის კოვალენტურ კომპლექსებს [78]. ამ ბიოგეოქიმიურ პროცესებში ცოცხალი ორგანიზმების როლი ძალიან საინტერესოა, მაგრამ ეს სამეცნიერო სფერო ჯერ კიდევ ნაკლებად არის შესწავლილი [89, 90].

ტნტ-ს გარდა ცოცხალ ორგანიზმებზე უარყოფითად მოქმედებს მისი გარდაქმნის პროდუქტები – ამინოდინიტროტოლუოლები და დიამინონიტროტოლუოლები, რომლებიც არიან ქიმიურად აქტიურნი და წარმოადგენენ საფრთხეს ადამიანისა და სხვა ცოცხალი ორგანიზმებისათვის [74]. 2,4- და 2,6-დინიტროტოლუოლი ღია ყვითელი ფერის მყარი ნივთიერებებია. ისინი წყალში ხსნადია, ნაპოვნია წყლის ზედაპირზე, გრუნტის წყლებში და ნიადაგში, საიდანაც შეიძლება მოხვდეს ცოცხალი ორგანიზმების ქსოვილებში. ისინი არ არიან აქროლადი ნივთიერებები და ჰაერში ნაპოვნია მხოლოდ მწარმოებელი ქარხნების ტერიტორიებზე. ცხოველებზე ჩატარებული ექსპერიმენტების საშუალებით და ქარხნებში მომუშავე პერსონალზე დაკვირვებით დადგინდა, რომ ამ ნივთიერებების ორგანიზმში დიდი რაოდენობით რეგულარული მოხვედრა იწვევს ნაყოფიერების დაქვეითებას, ნერვული სისტემის, ღვიძლისა და თირკმელების დაზიანებებს, სისხლის წითელი უჯრედების

რაოდენობის შემცირებას. სიმსივნის კვლევის საერთაშორისო სააგენტოს განსაზღვრებითთ 2,4- და 2,6-დინიტროტოლუოლი წარმოადგენენ კანცეროგენულ ნივთიერებებს [143].

ორგანული დამაბინძურებლების დახასიათებისას, მათი გარემოსა და ადამიანის ჯანმრთელობაზე განსაკუთრებული ტოქსიკური მოქმედების გამო, USEPA-ს მიერ განსაკუთრებულად პრიორიტეტულად მიჩნეული იყო ქიმიკატების რამოდენიმე კლასი, 6 მათგანი არის – პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადები (პან), ფენილციტრიდინი, პოლიქლორირებული ბიფენოლები (პქბ), დიქლოროდიფენილტრიქლორეთანი (დდტ), BTEX (ბენზოლი, ტოლუოლი, ეთილბენზოლი, ქსილოლი), და ტრინიტროტოლუოლი (ტნტ) [58, 81].

პან-ები არიან გარემოს განსაკუთრებით მდგრადი დამაბინძურებლები, რომლებიც წარმოიქმნებიან წიაღისეული საწვავის დაწვის, ქვანახშირის გამოყენების, ნავთობისა და ხის წვის შედეგად [110, 172]. მათი წარმოქნის სხვა წყაროები შეიძლება იყოს ნახშირწყალბადების ნარჩენები [16, 96] და ბუნებრივი წარმოშობის ქვანახშირის საბადოები. ისეთი ბუნებრივი არომატული ნაერთები, როგორებიცაა ტერპენები, სტეროლები და ქინონები ქროლდება ქარხნებიდან და გარდაიქმნება პან-ებად. ქარხნების ლიგნინიც ასევე შესაძლოა გარდაიქმნას დაშლად ჰუმისის ნივთიერებებად და საბოლოოდ მიხდეს პან-ების წარმოქმნა [33]. პან-ები არიან წყალში უხსნადი, აქვთ ნიადაგის ორგანულ ნაწილთან სორბციის უნარი, რის გამოც შეუძლიათ ბუნებრივ სისტემებში აკუმულაცია. ისინი შედგებიან ორი ან მეტი ხაზურად, კუთხურად ან დატოტვილად შეერთებული არომატული ბირთვებისაგან. დატოტვილად და

კუთხურად შეერთებული ბირთვების სტრუქტურები უფრო სტაბილურია, ვიდრე ხაზოვანი, რაც ხდის მათ ნაკლებად დეგრადირებადს [133]. რთული ნაერთები, რომლებსაც აქვთ 3 ბირთზე მეტი, ჩვეულებრივ მიკროორგანიზმებისათვის არიან ექსტრემალურად ტოქსიკური, რის გამოც ძნელად იშლებიან სამინერალიზაციო სუბსტრატებში [110].

პესტიციდების გამოყენებამ დიდ სარგებლობა მოუტანა კაცობრიობას, მაგრამ იმთავითვე გამოვლინდა მათი გამოყენების მავნე შედეგები [4]. მავნე ორგანიზმების გასანადგურებლად, სასოფლო-სამეურნეო სავარგულებს შეგნებულად ამუშავებენ პესტიციდებით, მაგრამ მათი უმრავლესობისთვის სელექტიური მოქმედება არ არის აბსოლიტური, რის გამოც ისინი მეტ-ნაკლებად საფრთხეს წარმოადგენს გარემოსა და ადამიანისათვის [1]. პენტაქლორფენოლები გამოიყენებოდა, როგორც ფართო სპექტრის პესტიციდები და ტყის დამცავი საშუალება მსოფლიოს მაშტაბით. სასუქების არასწორმა გამოყენებამ, შეიძლება ასევე გამოიწვიოს ნიადაგის, წყლისა და ატმოსფეროს დაბინძურება [2]. დღეისათვის პენტაქლორფენოლები აკრძალულია ბევრ ქვეყანაში, თუმცა ისინი მაინც წარმოადგენენ პრობლემას, როგორც ნიადაგის დამაბინძურებლები. პენტაქლორფენოლიები არან ტოქსიკური უმეტესი ორგანიზმებისათვის 50 ppm კონცენტრაციის ზემოთ, მაგრამ ზოგიერთ დაბინძურებულ ადგილას მისი კონცენტრაცია იყო 1600 ppm-ზე მეტი. რაც ძალიან ართულებს მათ ბიოდეგრადაციას [10]. პენტაქლორფენოლები არიან ძალიან ჰიდროფობულები, რაც ზრდის მათ მდგრადობას ბიოდეგრადაციის მიმართ. UNEP-ის 1997 წლის 7 თებერვლის გადაწყვეტილების თანახმად ზოგიერთი მაღალ-

ტოქსიკური ქიმიური ნივთიერების წარმოების აკრძალვის შესახებ მდგრად ორგანულ დამაბინძურებლებს (მოდ) მიაკუთვნეს 8 პესტიციდი – ალდრინი, დდტ, დილდრინი, ენდრინი, ჰეპტაქლორი, მირექსი, ტოკსაფენი და ჰექსაქლორბენზოლის და პოლიქლორირებული ბიფენოლების (პქბ) შემცველი ტექნოლოგიური სითხეები [164].

დდტ არის ორგანოქლორიდი, მწერების საწინააღმდეგო საშუალება, რომელიც მიღებული იყო აშშ-ში 30 წლის წინ. ეს ქიმიკატი არის  მდგრადი გარემოში, თუმცა, მიუხედავად ამისა კარგად ერთვება კვების ჯაჭვში. დდტ-სგან გამოწვეული მაღალი დონის ტოქსიკური ეფექტი და პოპულაციების შეცმცირება, რეგისტრირებული იყო ზიგიერთი კვლევების შედეგად თევზებსა და ჩიტებში, 10 წლის შემდეგაც კი, რაც ის აღმოაჩინეს სტაბილური ნარჩენების სახით ჰაერში, წყალში, ნიადაგში და დანალექ ქანებში [25].

პოლიქლორირებული ბიფენოლები, 1993 წლიდან, ინტენსიურად გამოიყენებოდა დიელექტრიკულ და ჰიდრავლიკურ სითხეებში, ცეცხლის ჩამქრობ საშუალებებში, პლასტიფიკატორებში, გამხსნელებით ექსტრაქციისას, ქსოვილების წარმოებაში და ა. შ. [133]. სავარაუდოდ, ამ აქროლადი ბიოაკუმულირებადი ტოქსინის წარმოება მსოფლიო მასშტაბით მერყეობს 1,3-2 მილიონ ტონამდე [25]. BTEX-ები არიან გაზოლინის და საავიაციო საწვავის შემადგენლობაში შემავალი კომპონენტები, რომლებიც ტოქსიკურია უმეტესი ორგანიზმებისათვის [113]. მიწისქვეშა შესანახი ავზებიდან, ან მილსადენებიდან გაჟონვის შედეგად ისინი პირდაპირ ხვდებიან გარემოში – ნიადაგში, დანალექ ქანებში და წყალში. [81].

განსაკუთრებით ძლიერ ტოქსიკანტებს წარმოადგენენ დიოქსინები.

ორგანულ ქიმიაში დიოქსინები ეწოდება ექსვსწევრიან ჰეტეროციკლებს, რომლებშიც ორი ატომი ჟანგბადი დაკავშირებულია ორი ეთილენური ხიდით. ტოქსიკოლოგიაში ტერმინი "დიოქსინის" ქვეშ გულისხმობენ 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-ნ-დიოქსინს (2,3,7,8-ტქდდ), რომელიც წარმოადგენს ძალიან საშიში ქსენობიოტიკების ფართო ჯგუფის ყველაზე ტოქსიკურ წარმომადგენელს პოლიქლორირებულ პოლიციკლურ ნაერთებს შორის, რომლებსაც მიეკუთვნება დიბენზო-პ-დიოქსინები (პქდდ), დიბენზოფურინები (პქდფ) და ბიფენილები (პქბ). ამ ნაერთების ყველაზე საშიში წარმომადგენლები არიან 2,3,7,8-ტეტრადიბენზო-პ-დიოქსინი, 2,3,7,8-ტერტაქლლორდიბენზოფურანი, 3,3,4,4,5,-პენტაქლორბიფენილი [202].

დიოქსინი – ეს არის კაცობრიორისათვის ცნობილი ერთ-ერთი ყველაზე ვერაგი შხამი. ის არის ძალიან ძლიერი ანთროპოგენული ტოქსინი, გამოირჩევა მაღალი სტაბილურობით, დიდხანს რჩება გარემოში და ორგანიზმში, გადაიტანება კვებითი ჯაჭვის საშუალებით. ცოცხალ ორგანიზმებში, დიოქსინის ტოქსიკურ დოზასთან შედარებით ძალიან მცირე რაოდენობით მოხვედრაც კი (ადამიანისათვის მინიმალური ტოქსიკური დოზა შეადგენს 0,5-1 მკგ/კგ [199], ხელს უწყობს მრავალი სინთეზური და ბუნებრივი წარმოშობის ნივთიერების გარდაქმნას ორგანიზმისათვის საშიშ შხამებად. დღეისათვის ცნობილია, რომ ყველაზე მნიშვნელოვანი მომენტს 2,3,7,8-ტქდდ-ით ინტოქსიკაციის პათოგენოზში წარმოადგენს მისი შეღწევა უჯრედის ციტოპლაზმაში და დაკავშირება სპეციფიკურ ცილასთან – ციტოზოლ-AH-რეცეპტორთან. ტქდდ-AH–რეცეპტორის

კომპლექსი აღწევს ბირთვში, უკავშირდება დნმ-ის განსაზღვრულ უბანს და იწვევს იმ გენების ექსპრესიის სტიმულირებას, რომლებიც კოდირებენ P450-დამოკიდებულ მიკროსომული მონოოქსიგენაზების სტრუქტურას. 2,3,7,8-ტქდდ-ით მოწამვლის დროს მოვლენების ეს თანამიმდევრობა განსაზღვრავს ძუძუმწოვრების ორგანიზმში მთელი რიგი ფერმენტების ინდუქციას. ასევე დადგენილია დიოქსინისმსგავსი ნაერთების მონაწილეობა უჯრედულ დონეზე მიმდინარე სხვა ბიოქიმიურ პროცესებში [19].

გარემოში პქდდ და პქდფ-ების მოხვედრის ძირითად მუდმივ წყაროს წარმოადგენს ქიმიური და მეტალურგიული წარმოებები, საყოფაცხოვრებო და წარმოების ნარჩენების დასაწვავი მოწყობილობები, ავტომობილების გამონაბოლქვი აირები და სხვა. პრაქტიკულად, ნებისმიერ ინდუსტრიულ ქვეყანაში არის დაბინძურებული ტერიტორიები, რომლებიც საჭიროებენ გაწმენდას. დიოქსინების ისტორიაში განსაკუთრებულ მოვლენად იქცა ომი ვიეტნამში, რომლის მიმდინარეობის დროსაც 1962-1971 წლებში ფართოდ გამოიყენებოდა დეფოლიანტები, რომლებიც მინარევების სახით შეიცავდნენ დიოქსინის მნიშვნელოვან რაოდენობას. გარემოში მოხვდა დაახლოვებით 170კგ 2,3,7,8-ტქდდ [187], და დაზარალდა დაახლოვებით 2 მილიონი ადამიანი [185]. სამხრეთ ვიეტნამის ტერიტორიაზე დღემდე შემორჩენილია უბნები, ნიადაგში 2,3,7,8-ტქდდ-ის ძალიან მაღალი კონცენტრაციებით (რამოდენიმე მკგ/1გ ნიადაგზე). ეს არის ადგილები, სადაც ინახებოდა ჰერბიციდებიანი კასრები და ხდებოდა ამ ნივთიერებებით თვითმფრინავების დატვირთვა.

გარემოში და ცოცხალ ორგანიზმებში დიოქსინების განსაზღვრა წარმოადგენს ერთ-ერთ ურთულეს პრობლემას. პირველ რიგში ეს დაკავშირებულია დიოქსინების მაღალ ტოქსიკურობასთან, რის გამოც მათი აღმოჩენის ზღვრები სხვადასხვა მატრიცებში უნდა იყოს მნიშვნელოვნად მცირე, ბევრი სხვა ორგანული ნივთიერების ანალიზთან შედარებით. 80-იან წლებში საზღვარგარეთის ქვეყნებში დაიწყო დიოქსინისმსგავსი ნივთიერებების ინტენსიური შესწავლა, რამაც ბიძგი მისცა მაღალი მგრძნობელობის იზომერსპეციფიური ანალიზების მეთოდების გაჩენას. დიოქსინების განსაზღვრა წარმოდგენს ერთ-ერთ ყველაზე ძვირ ანალიზს, რომლებიც სრულ-დება სერიულად – ერთი სინჯის ანალიზის ფასი ხშირად აღემატება 1000$z$-ს [202].

ამრიგად, ყველა ზემოთ განხილული ორგანული დამაბინძურებელი, გამოირჩევა ძლიერი ტოქსიკურობით და გარემოში მდგრადობით. ისინი ნელა მინერალიზდება, რის გამოც მათი მოცილების ეფექტური და სწრაფი მეთოდების შემუშავება წარმოადგენს მსოფლიოს მრავალი ქვეყნის პრიორიტეტულ ამოცანას.

## 1.2 მიკროორგანიზმების როლი ბიორემედიაციაში და ბიორემედიაციის მეთოდები

ნიადაგიდან სხვადასხვა მდგრადი ორგანული დამაბინძურებლების მოშორება ეკოლოგიურად საიმედო, უსაფრთხო და ეკონომიურად ეფექტური გზებით, ნიადაგის მენეჯმენტის სააგენტოების მთავარი კონცეფციაა. ერთ-ერთი გზა ამ მიზნის

მისაღწევად, არის ბიორემედიაცია სხვადასხვა მიკროორგანიზმების გამოყენებით [81].

სწორედ, მიკროორგანიზმების მიერ ქსენობიოტიკების გარდაქმნა გარემოში არის ბიორემედიაცია [158].

გარემოს გაწმენდა მავნე ნივთიერებებისაგან არსებული მექანიკური, თერმული და ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდებით ერთის მხრივ ძვირია, ხოლო მეორეს მხრივ დაბინძურების მხოლოდ განსაზღვრულ დონეზეა ეფექტური. ბიორემედიაციული მეთოდი ავსებს არსებულ ტექნოლოგიებს, ხოლო გარკვეულ პირობებში მას საერთოდ არ გააჩნია ალტერნატივა [197].

ამჟამად არსებობს ნიადაგის ბიოლოგიურად გაწმენდის სამი მთავარი მიმართულება:

- მყარი ფაზის ბიოდამუშავება, რომელიც მოიცავს საკუთარი მიკროფლორის განვითარებისთვის ოპტიმალური პირობების შექმნას.
- ბიოდამუშავება რეაქტორში, რაც ითვალისწინებს დაბინძურებული ნიადაგის დამუშავებას ბიორეაქტორში, რომელიც უზრუნველყოფილია მიკროორგანიზმების კონტაქტით წყალში უხსნად დამბინძურებლებთან და იქმნება ხელსაყრელი პირობები მიკრობული დეგრადაციის პროცესის განხორციელებისათვის.
- ბიოდამუშავება *in situ*, რომელიც დაფუძნებულია ნიადაგში დესტრუქტორი მიკროორგანიზმის შეტანაზე.

ნიადაგის აღდგენისათვის მიკროორგანიზმების გამოყენება ხდება როგორც *ex situ*, ასევე *in situ* ტექნოლოგიებში. ტოქსიკანტის მაღალი კონცენტრაციების შემთხვევაში იყენებენ *ex situ* ტექნოლოგიებს, როდესაც მოჭრილი დაბინძურებული ნიადაგი გადააქვთ სპეციალურ ნაკვეთებზე (კომპოსტირება ბიომოდულებში),

ან ბიორეაქტორებში, სადაც ხდება მათი გასუფთავება მიკროორგანიზმების საშუალებით (ბიოკონვერსია) [59].

*in situ*, ანუ უშუალოდ დაბინძურების ადგილზე ჩატარებული ბიორემედიაციის პროცესები გამოიყენება ტოქსიკანტის მაღალი კონცენტრაციების დროს დიდი ფართობების გასასუფთავებლად.

დაბინძურებული ნიადაგების აღდგენისას ყოველი კონკრეტული შემთხვევისათვის, ამა თუ იმ მეთოდის შერჩევა და გამოყენება ხდება გარემოს დამაბინძურებლის ტიპისა და კონცენტრაციის, ნიადაგის ტიპის, კლიმატის, გრუნტის წყლების მდებარეობის და დასახლებული ადგილების სიახლოვის გათვალისწინებით [95].

*in situ* ტექნოლოგიებით ნიადაგების გასუფთავებისას სამუშაოები ტარდება რამდენიმე ეტაპად: პირველ რიგში დგინდება დაბინძურების ხარისხი და ხასიათი, დაბინძურების დრო და სიღრმე, შემდეგ დგინდება ნიადაგების ტიპი, იქმნება ტერიტორიის ჰიდროლოგიური რუქა, დგინდება გრუნტის წყლების დონე და მიმართულება, წყალსატევების ადგილმდებარეობა; გარდა ამისა ობიექტზე ისაზღვრება ისეთი ტოქსიკური ნაერთების არსებობა, რომლებმაც შეიძლება ხელი შეუშალონ დამაბინძურებლის ბიოქიმიურ გარდაქმნას. ხდება მიკრობიოლოგიური ტესტების ჩატარება დამაბინძურებლის ბიოდეგრადაციის უნარის მქონე მიკროორგანიზმების გამოსავლენად.

ტერმინები – ბიოდეგრადაცია, მინერალიზაცია, ბიორემედიაცია, ბიოტრანსფორმაცია, ბიოაკუმულაცია და ბიოსორბცია, მცირედ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან, მაგრამ ხშირად თანამიმდევრულად გამოიყენება. ბიოდეგრადაცია არის

საერთო ტერმინი, რომელიც იხმარება ყველა ქიმიური ნაერთების ბიოლოგიური დაშლის დამაკავშირებლად, ხოლო სრულ ბიოდეგრადაციას მივყავართ მინერალიზაციამდე. ბიორემედიაცია ეყრდნობა ბიოლოგიური სისტემების გამოყენებას გარემოში, ტოქსიკური ნაერთების დეგრადაციისათვის. ბიოაკუმულაცია ან ბიოსორბცია არის ტოქსიკური ნაერთების აკუმულაცია უჯრედის შიგნით, ტოქსიკური მოლეკულის დეგრადაციის გარეშე. ეს მეთოდი შეიძლება იყოს ეფექტური წყლის გარემოში, საიდანაც ორგანიზმები შეიძლება მოვაცილოთ მას შემდეგ, რაც ისინი იქნებიან გაჯერებული ტოქსიკური ნივთიერებებით [83].

ბიორემედიაციის სახეები შეიძლება დაიყოს რამდენიმე სტრატეგიულ კატეგორიად: კომპოსტირება, ბიოხსნარები, და ფიტორემედიაცია. კომპოსტირებისა და ბიოხსნარების სტრატეგიებში ადგილი აქვს მიკროორგანიზმების წარმოუდგენელ მრავალფეროვნებას და აერობულ/ანაერობულ პროცესებს. ასევე, კომპოსტირებისა და ფიტორემედიაციის დროს განასხვავებენ *in situ* (ადგილზე დამუშავების) და *ex situ* (დამუშავება ადგილიდან გადატანით) სტრატეგიებს (ბიოხსნარების საშუალებით დამუშავების შემთხვევაში ნიადაგი ყოველთვის გადაიტანება). დღეისათავის *ex situ* ბიორემედიაციის მეთოდი უფრო პოპულარულია, იმიტომ, რომ დაბინძურებული ნიადაგების ადგილიდან მოშორება საშუალებას იძლევა თავიდან ავიცილოთ მიწისქვეშა წყლების დაბინძურება [121]. ასევე *ex situ* დამუშავება საშუალებას გვაძლევს უფრო დაწვრილებით ვაკონტროლოთ დეგრადაციის პროცესი [39], თუმცა, *in situ* მეთოდების საშუალებით, შესაძლებელი გახდა, საფუძვლიანად და

კარგი გამოსავლით, უფრო ადვილად წარემართათ პროცესები და აღედგინათ დაზიანებული რაიონების მნიშვნელოვანი რაოდენობა.

კომპოსტირება არის საუკუნის ასაკის ტექნოლოგია, რომელიც იყო შემუშავებული ისეთი საშიში ნივთიერებების დეგრადა-ციისათვის, როგორიცაა ტნტ. კომპოსტირების დროს დაბინძურებული ნიადაგი შერეულია დიდი რაოდენობით სხვადასხვა ნივთიერებებთან, ფოროვნობისა და ჰაერის ცვლის გასაუმჯობესებლად [72]. კომპოსტირების ყველაზე გავრცელებული ტიპია, როდესაც ტნტ-ით დაბინძურებული ნიადაგები მუშავდება ბორცვოვანი კომპოსტირებით. ასეთი კომპოსტირებისას ნიადაგს ურევენ კომპოსტს და შლიან მინდვრის მთელ ზედაპირზე ან ვიწრო რიგებად. მიკროორგანიზმების ზრდის სტიმულაციისათვის ნიადაგს უმატებენ ისეთ კომპოსტის მასალას, როგორიცაა ნახერხი, ჩალა, იონჯა, ნაკელი და სხვა აგროსამრეწველო პროდუქტები [72]. აერაციას ბორცვებში ინარჩუნებენ პერიოდული გადაადგილებით და ნაკელის შემცველობით, კონტროლდება ჟანგბადის შემცველობა და ტემპერატურა [136, 72]. დადგენილია, რომ ბორცვოვან კომპოსტირებას აქვს დეგრადაციის მაღალი დონე და დაბალი ღირებულება [72].

კომპოსტირება გამოყენებული იყო სუპერრეზერვის ადგილას უმატილას სამხედრო სწავლების ადგილზე, ორიგონაში [165, 55]. უმატილა ბინძურდებოდა 15 წლის განმავლობაში, როდესაც მუშები იყენებდნენ წყალს და ორთქლს რომ ექსპლუატაციისათვის გამოუსადეგარი ბომბები გაეწმინდათ ტნტ-სა და სხვა ასაფეთქებელი ნივთიერებებისაგან. ამ «გაწმენდამ” გამოიწვია 80 მილიონ გალონზე მეტი ვარდისფერი წყლის წარმოქმნა ორ 10000 კვ. ფტ. მოცულობის

წყალსაცავში [179]. ამ ცალკეულმა ტბებმა წარმოქმნეს დაბინ-ძურებული ნიადაგების გიგანტური რაიონები, 4800 ppm-ზე მაღალი ტნტ-ს კონცენტრაციით [179, 55]. დაბინძურებულ ნიადაგთან ბორცვოვანი კომპოსტირებისათვის შერეული იყო კარტოფილის ნარჩენები და ნაკელი [179]. კომპოსტაციის ოპტიმალური პირობების ხანგრძლივი დროის განმავლობაში უზრუნველყოფისათვის, ბორცვებთან განთავსებული იყო მოძრავი ნაგებობები [55]. 40-დღიანი დამუშავების შემდეგ ტნტ შემცირდა 99,7%-ით. კომპოსტირების საშუალებით ტნტ-თი საშუალოდ დაბინძურებული უბნები 40 დღიანი დამუშავების შემდეგ შემცირდა 1574 ppm-დან 4 ppm-მდე [38, 55]. თვითღირებულების შემცირებამ დაფერფვლის ტრადიციულ მეთოდთან შედარებით უმატილას რაიონისათვის შეადგინა 2,6 მილიონი დოლარი [54, 165].

ა.შ.შ.-ის წყალქვეშა საზღვაო ბაზა ბანგორში (ვაშინგტონი) ბინძურდებოდა ღია წვითა და საბრძოლო მასალების დეტონაციით 19 წლის განმავლობაში. აქაც გამოყენებული იყო იგივე კომპოსტირების მეთოდი, რაც უმატილას რაიონში. 30 დღის შემდეგ ტნტ-ს დონეები შემცირდა 96,7-99,43%-ით.

მაგრამ, ზოგჯერ კომპოსტირება შეიძლება იყოს პრობლემური, რადგან შეუძლებელია ასაფეთქებელი ნივთიერებების ზუსტი გარდაქმნების განსაზღვრა. თუ ტნტ ან მისი დეგრადაციის პროდუქტები დაკავშირებულია კომპოსტის ნარევთან, ისინი შეიძლება გამოირეცხოს უკან ნიადაგში. ასევე დიდი რაოდენობით საკვები ნივთიერებების დამატების გამო ნიადაგის მოცულობა იზრდება 5-30-ჯერ მის საწყის მოცულობასთან შედარებით.

ბიოხსნარების მეთოდით დაბინძურებული ნიადაგების რემედიაციის დროს იყენებენ დიდი მოცულობის ტანკებს, იმისათვის, რომ მოახდინონ ნიადაგის, მიკროორგანიზმების და ბიოდანამატების სუსპენზიების გამოყენება ტნტ-ს დეგრადაციისათვის. ბიოხსნარების რეაქტორებს უპირატესობა ენიჭებათ იმ შემთხვევაში, თუ ტნტ-ს დეგრადაციის გარკვეული დონის მისაღწევად აუცილებელია მორევის, აერაციის ან ნიადაგის წინასწარი დამუშავება მაღალი ინტენსივობით [38]. ამ მეთოდის გამოყენება უზრუნველყოფს კონტროლირებად გარემოს ტნტ-ს დეგრადაციის ოპტიმალური დონის მისაღწევად და საშუალებას იძლევა თავიდან ავიცილოთ მისი შემდგომი დაკავშირება გარემომცველ ნიადაგებთან [39]. იმ ფაქტორების განსაზღვრა, რომლებიც გავლენას ახდენენ ტოქსიკანტების დეგრადაციაზე (pH, ტემპერატურა და საკვები ნივთიერებების რაოდენობა), ბევრად უფრო ადვილია კონტროლირებად გარემოში [72, 54].

აშშ-ში (illiniosi) სამხედრო საბრძოლო იარაღების ქარხანაში ბიოხსნარის მეთოდი გამოიცადა ასაფეთქებელი ნივთიერებებით დაბინძურებული ზონის ბიორემედიაციისათვის. ბიოხსნარების მეთოდი იყენებს ალტერნატიულ ციკლებს აერობულ და ანაერობულ პირობებს შორის და აღწევს ტნტ-სა და შუალედური დამაბინძურებლების 99%-ით მოცილებას. ასევე ორ-ფაზიანმა აერობულ-ანაერობულმა დამუშავებამ აჩვენა ტნტ-ს ფაქტიურად სრული დაშლა $CO_2$-მდე, მარტივ ორგანულ მჟავებამდე და ნახშირბადის ფრაგმენტებამდე [165].

ჯ.რ. სიმფლოტის კომპანიამ განავითარა და გამოცადა ეფექტური ბიოხსნარის პროცესი, რომელსაც უწოდა ჯ. რ.

სომფლოტის ანაერობული ბიორემედიაცია (SABRE) [54]. დაბინძურებული ნიადაგი ითხრება ექსკავატორით, გადაირჩევა, შეერევა ნახშირბადის წყაროს (კარტოფილს, სახამებელს), ბუფერირდება ფოსფატით და ჩამოყალიბდება ხსნარად [54, 44]. SABRE-ს მეთოდის დროს შერჩეული ტნტ-ს მადეგრადირებელი მიკროორგანიზმები, თუ ისინი ბუნებრივად არ არიან ნიადაგში, ემატება ხსნარს მას შემდეგ, რაც ნარევი იქნება ანაერობული [54]. ტნტ-ს დეგრადაციის შუალედური ტოქსიკური პროდუქტები წარმოიქმნება ანაერობული ფაზის განმავლობაში, მაგრამ საბოლოოდ იშლება პროცესის  დროს [54, 44]. SABRE-ს პროცესის გამოყენებისას დადგენილი იყო, რომ ტნტ-ს აღდგენის ეფექტურობა არის 99,4% [54].

გაწმენდის ყველაზე პერსპექტიულ მეთოდად განსაკუთრებით დიდი ფართობების დაბინძურებისას, მიიჩნევენ *in situ* ბიოდამუშავებას, რომლის დროსაც არ არის საჭირო დაბინძურებული ნიადაგის ტრანსპორტირება, გაწმენდის პროცესის ეფექტურობა ამ შემთხვევაში დამოკიდებულია რიგ ფაქტორებზე, მათ შორის უმნიშვნელოვანესია მიკროორგანიზმ-დესტრუქტორის სწორი შერჩევა [198].

ქსერნობიოტიკ-ტოქსიკანტთა ბიოტრანსფორმაციაში და ბიოსფეროში მათ განაწილებაში განსაკუთრებით დიდი წვლილი ერთუჯრედიან მიკროორგანიზმებს – პროკარიოტებს (ბაქტერიებს) მიუძღვით. ბიოტრანსფორმაციულ პროცესებში აგრეთვე დიდ როლს ასრულებენ მორფოლოგიურად უფრო რთული ეუკარიოტული ორგანიზმები – მიკროსკოპული სოკოები. თანამედროვე შეფასებით, ბუნებრივად მიმდინარე ქიმიურ გარდაქმნებში (ნიადაგი, წყალი, ჰაერი), მიკროორგანიზმების წვლილი 70%-ს აღემატება. აქედან

გამომდინარე, ცხადია, თუ რა დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მიკროორგანიზმების მეტაბოლური პოტენციალის შესწავლას, მათი «ქიმიური მოღვაწეობის" ანალიზს და შესაბამისად, რეგულირებას [5].

მრავალფეროვანი უჯრედგარეთა ფერმენტების სეკრეციის გამო სოკოები მიკროორგანიზმებს შორის უნიკალური არიან [158]. სოკოების მიერ საშიში ქიმიურ ნაერთების ფართო მრავალფეროვნების გარდაქმნის უნარმა გაზარდა ბიორემედიაციაში მათი გამოყენებს მიმართ ინტერესი [7].

არასასურველი ქიმიკატებისგან საწარმოო ჩამდინარე წყლების გაწმენდისათვის, ბიორემედიაციაში გამოყენებულ სოკოებს შორის მნიშვნელოვანია საფუვრები, მაგ: *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae, S. carlbergensis* და *Candida utilis*. *Agaricus bisporus* და ბაზიდიალური სოკო *Lentinus oloides*, რომლებიც ახდენენ ლიგნინოცელულოზის დაშლას. შტამი *Corius versicolor*-ი არის მნიშვნელოვანი პულპასა და ქაღალდის მრეწველობის ჩამდინარე წყლების გაწმენდისათვის. სოკოების და ბაქტერიების კონსორციუმი გამოიყენება კომპოსტირებისას, რომელიც არის ყველაზე მეტად გავრცელებული დეტოქსიკაციის გზა პრაქტიკაში. ნაჩვენები იყო *Pyricularia oryzae*-ს მიერ წარმოებული ფერმენტ ლაკაზით ფენოლური აზო- საღებავების გაუფერულება [35].

ლიგნინოცელულოზის დეკომპოსტირება მოჩნეულია, როგორც მსოფლიოს ნახშირბადის ცვლის ციკლში ყველაზე მნიშვნელოვანი დეგრადაციის შემთხვევა [18]. არსებობს უამრავი ლიტერატურა, ბუნებაში ნახშირბადისა და აზოტის ციკლებში სოკოების როლის შესახებ [31, 36, 65].

ეუკარიოტებს შორის თეთრი ლპობის სოკოები არიან უნიკალური ლიგნინის დაშლის არასპეციფიკური მეთოდების განვითარებისათვის. საინტერესოა, რომ ისინი ზრდისათვის არ გამოიყენებენ ლიგნინს ნახშირბადის წყაროდ [102], ამის გამო ლიგნინის დეგრადაცია წარმოადგენს მეორადი მეტაბოლიზმის პროცესს და არ არის აუცილებელი ზრდის ძირითადი პროცესისათვის. ლამარმა [109] შეადარა სამი ლიგნინის დამშლელი სოკოს *Phanerochaete chrysosporium*-ს, *P. sordida*-ს და *Tramates hirsuta*-ს მიერ პენტაქლოროფენილისა და ქრიოზოტის დეგრადაციის უნარი ნიადაგში. *Phanerochaete sordida*-ს 10%-ის (წონით) ნიადაგის ინოკულაციამ გამოიწვია პენტაქლორფენოლისა და ქრიოზოტის მკვეთრი შემცირება. *Phanerochaete sordida* ასევე საუკეთესოა ნიადაგში პან-ების დეგრადაციისათვის გამოსაყენებლად. დევისმა [43] გვიჩვენა, რომ *Phanerochaete sordida* უფრო ეფექტურად ახდენდა სამბირთვიანი პან-ების დეგრადაციას, ვიდრე ოთხბირთვიანისას.

აღსანიშნავია *Phanerochaete chrysosporium*-ის მიერ ზოგიერთი ტოქსიკური არომატული ნაერთის დეტოქსიკაციის უნარი, ისეთების როგორიცაა: ბენზ(*α*)პირინი, ფენანტრენი, პირინი, ქლორირებული ორგანული ნაერთების (ქლოროანილინი, დდტ, პენტაქლორო-ფენოლები, ტრიქლოროფენოლი, პოლიქლორირებული ბიფენოლები, ტრიქლოროფენოქსიაცეტატის მჟავა), ნიტროარომატული ნაერთების (2,4-დინიტროტოლუოლი, ტნტ) და ზოგიერთი შერეული რთული ნაერთების, როგორიცაა სულფირებული აზო- საღებავები. ზოგიერთი გამოყოფილი ფერმენტი, როგორებიცაა ლაკაზა, პოლიფენო-ლოქსიდაზა, ლიგნინპეროქსიდაზა და ა.შ. იღებენ მონაწილეობას დეგრადაციის პროცესში. გარდა ამისა, ცნობილია, რომ ბევრი

უჯრედგარეშე ფერმენტი – რედუქტაზები, მეთილ-ტრანსფერაზები და ციტოქრომოქსიგენაზები მონაწილეობას იღებენ ქსენობიოტიკების დეგრადაციაში [14].

*Phanerochaete chrysosporium*-ი ახდენს ორგანული საღებავების ბიოგამორეცხვას [122]. პაულმა და სხვებმა [130] ასევე გვიჩვენეს აზო-ტრიფენილ მეთანის საღებავის გაუფერულება *Phanerochaete chrysosporium*-ის მიერ წარმოებული ლიგნინპეროქსიდაზას მიერ. სემიმ და რედჰაუმ [139] წარმოადგინეს *Phanerochaete chrysosporium*-იდან მიღებული ლიგნინპეროქსიდაზას და მანგანუმპეროქსიდაზას როლი ზეითუნის ზეთის სახდელი ქარხნის ჩამდინარე წყლების გაუფერულებაში. დადგენილია, რომ *Phanerochaete chrysosporium*-ი და მიკრობული კონსორციუმები არიან ეფექტური ტექსტილის საღებავებით დაბინძურებული ჩამდინარე წყლების გაუფერულებაში.

სოკოების სისტემებს შორის *Phanerochaete chrysosporium*-ი წარმოდგენილია როგორც ბიორემედიაციის საჩვენებელი სისტემა. ნაჩვენება, რომ ბაზიდიალური სიკო *Pleurotus ostreatus*-ი წარმოქმნის უჯრედგარეშე წყალბადის პეროქსიდაზაზე დამოკიდებულ ლიგნინისდამშლელ ფერმენტებს, რომლებიც აუფერულებენ საღებავ რემოზოლის ბრილიანტის ლურჯს. მჟანგავი ფერმენტები თამაშობენ ძალიან მნიშვნელოვან როლს ბიორემედიაციაში.

ბიორემედიაციაში განსაკუთრებით წარმატებით გამოიყენება თეთრი ლპობის სოკოები, მათ ლიგნინოლიზურ ფერმენტებს აქვთ ფართო სპეციფიურობა და ჩართული არიან სტრუქტურულად ლიგნინის მსგავსი ორგანული დამბინძურებლების ბიოტრანსფორმა-ციისა და მინერალიზაციის პროცესში [132].

ისინი წარმოადგენენ ხის სოკოებს, რომლებიც ათეთრებენ სუბსტრატს ლიგნინის დაშლის დროს. თეთრი ლპობის სოკოებს მიეკუთვნება ბაზიდიომიცეტების კლასის წარმომადგენელები, თუმცა ზოგიერთი ასკომიცეტების კლასის წარმომადგენელ სოკოებს, როგორიცაა *Xylariaceae*, აგრეთვე აღმოაჩნდათ თეთრი ლპობის სოკოების მსგავსი თვისებები [49].

ლიგნინის დაშლა თეთრი ლპობის სოკოების მიერ მიმდინარეობს რამდენიმე ფერმენტის მონაწილეობით, მათ შორის უმთავრესია: ლიგნინ პეროქსიდაზა, მანგანუმდამოკიდებული პეროქსიდაზა, სპილენძის შემცველი ფენოლოქსიდაზა, ლაკაზა [161]. აგრეთვე, სხვადასხვა ინტრაცელულარული ფერმენტები, როგორიცაა რედუქტაზები, მეთილ ტრანსფერაზები და ციტოქრომ ოქსიგენაზები [14]. ზოგიერთი ავტორი აღნიშნავს მანგანუმდამოუკიდებელი მანგანუმ პეროქსიდაზას აქტიურ როლს თეთრი ლპობის სოკოებში [50].

თეთრი ლპობის სოკოებს აქვთ მრავალი ორგანული დამბინძურებლის დეგრადაციისა და მინერალიზაციის უნარი.

მათ მიერ დეგრადირებული ორგანული ტოქსიკანტებიდან აღსანიშნავია პოლიციკლური ნახშირწყალბადები, როგორც ცალკე, ასევე ნარევების სახით, რომლებიც წარმოადგენენ ნავთობის ან ქვანახშირის ფისის პროდუქტებს. აღსანიშნავია, რომ ლაბორატორიულ პირობებში თეთრი ლპობის სოკოების დაშლის მაღალი უნარი არ ნიშნავს ნიადაგში იგივე შედეგს. მაგ. *Trametes versicolor* ახდენს ანტრაცენის, ბენზ-ანტრაცენის და დიბენზ-ანტრაცენის მინერალიზაციას ნიადაგში, ხოლო *Phanerochaete Chrysosporium* და *Pleurotus sajor* კი შეზღუდულად ახორციელებენ ამ

პოლიციკლური ნახშირწყალბადების ბიოტრანსფორმაციას [8]. მონაცემები, რომლებიც ეხება თეთრი ლპობის სოკოების მიერ პოლიციკლური ნახშირწყალბადების დეგრადაციას, საკმაოდ მრავალფეროვანია. მაგალითად, სამთვიანი ინკუბაციის შემდეგ, 49%-ზე მეტი ბენზ(α)პირენი იქნა მოცილებული ნიადაგიდან *Pleurotus ostreatus*-ის მიერ [50]. აღსანიშნავია, რომ 5-7 ციკლიანი პოლიციკლური ნახშირწყალბადები, რომლებიც ვერ შეითვისა ადგილობრივმა ბაქტერიამ, მოცილებული იქნა 29-42%-ით *Pleurotus sp.*-ს მიერ [77]. სხვა მონაცემების [43] მიხედვით *Phanerochaete sordida* ახდენს 3-ციკლიანი (85-95%) და 4-ციკლიანი (24-72%) პოლიციკლური ნახშირწყალბადების მინერალიზაციას ნიადაგში, ხოლო *Pleurotus ostreatus*-ი გარდა იმისა, რომ 87-89%-ით ახდენს 3 და 4-ციკლიანი პოლიციკლური ნახშირწყალბადების მოცილებას, ის ასევე 48%-ით აცილებს 5-ციკლიან პოლიარომატულ ნაერთებს კრეოზოტით დაბინძურებული ნიადაგიდან [77]. ზოგიერთი ავტორის დაკვირვებით [183], 12 თვის მანძილზე ნიადაგში *Coriolus (Trametes) versicolor*-ის გამოყენებით, ნავთობპროდუქტების რაოდენობა შემცირდა 32გ/კგ-დან 7გ/კგ-მდე. პოლიციკლური ნაერთების დეგრადაციის პროცესში ლიგნინოლიზური ფერმენტების მონაწილეობა მრავალი ექსპერიმენტით იქნა დადასტურებული, რადგან ამ ნაერთების მინერალიზაციას თან ახლავს აღნიშნული ფერმენტების წარმოქმნა [138].

თეთრი ლპობის სოკოებს, ასევე, აქვთ პენტაქლორფენოლის დეგრადაციის უნარი, რისთვისაც ძირითადად ადგილობრივი მიკროფლორა გამოიყენება. *Trametes versicolor*-ი, ნიადაგში ზრდისას, ახდენს 29% პენტაქლორფენოლის მინერალიზაციას 42 დღის

განმავლობაში [163]. მსგავსი მაღალი დეგრადაციის ხარისხით ხასიათდება *Phanerochaete spp., Phanerochaete Chrysosporium* და *Lentinula edodes*. ამ პროცესში ლიგნინოლიზური ფერმენტების მონაწილეობა არ დასტურდება. პენტაქლორფენოლის სრული დეგრადაციის უნარი გააჩნიათ შემდეგ ბაქტერიულ შტამებს: *Arthrobacter sp*., *Pseudomonas sp*., *Flavobaqterium sp*., *Rhodococcus sp*., ამიტომ ეს შტამები, ამ მიზნით წარმატებით გამოიყენება ბიორემედიაციაში [115].

თეთრი ლპობის სოკოებს გააჩნიათ პესტიციდების, კერძოდ დდტ-ს მინერალიზაციის უნარი. შემდეგი სოკოები: *Phanerochaete Chrysosporium, Pleurotus ostreatus, Phellinus weirii* და *Polyporus versicolor* 30 დღის განმავლობაში, ლიგნინოლიზური ზრდის პირობებში ახდენენ 5,3-13,5% $^{14}C$-ის შემცველი დდტ-ს, დიხლოფოსისა და მეთილ-ოქსიქლორის მინერალიზაციას [28, 29]. ავტორების მონაცემების მიხედვით *Phanerochaete Chrysosporium*-ს შეუძლია დდტ-ს ძლიერ ტოქსიკური დაშლის პროდუქტის (დდე) მინერალიზაცია $CO_2$-მდე. აღსანიშნავია, რომ თეთრი ლპობის სოკოების გამოყენებით ქლორორგანული პესტიციდების მინერალიზაციაში არ მონაწილეობს ლიგნინოლიზური ფერმენტები, სავარაუდოდ, ამ რეაქციებში მონაწილეობენ ჰიდროლიზური და დამჟანგველი ფერმენტები [107].

განხორციელებულია ქლორორგანული ჰერბიციდების 2,4,5-T და 2,4-D ბიოდეგრადაცია *Phanerochaete Chrysosporium*-ის მიერ, თუმცა ლიგნინოლიზური ფერმენტების როლი ამ პროცესში არ დასტურდება. მიკროსკოპული სოკოს *Aspergillus niger*-ის მიერ ქლორორგანული ჰერბიციდის 2,4-D და MCPA-ს მეტაბოლიზმის პროცესის გამოკვლევით აღმოჩნდა, რომ ამ ჰერბიციდის

კატაბოლიზმის დროს მიმდინარეობს რთულ-ეთერული ჰიდროლიზისა და ჰიდროქსილირების რეაქციები [61].

სხვა სახის პესტიციდებიდან აღსანიშნავია ფოსფორორგანული ინსექტიციდები, რომლებიც 12,2-27,5%-ით იქნა მინერალიზებული *Phanerochaete Chrysosporium*-ით. მიკროსკოპული სოკო *Trichoderma viridae*, რომელიც არ შეიცავს ლიგნინოლიტურ ფერმენტებს, ახორციელებს ფოსფორორგანული ინსექტიციდების დეგრადაციას, რითაც მტკიცდება, რომ ეს პროცესი მიმდინარეობს ლიგნინოლიზური ფერმენტების მონაწილეობის გარეშე [12].

მრავალი გამოკვლევაა ჩატარებული სხვადასხვა სოკოების: *Phanerochaete Chrysosporium, Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor, Coriolopsis polyzona* მიერ პოლიქლორირებული (1-6 Cl-ის შემცველი) ბიფენილების *in vivo* მინერალიზაციის უნარზე [125]. ამ პროცესში დასტურდება ლიგნინოლიზური ფერმენტების მონაწილეობა, თუმცა, სხვა ნაშრომის [105] მიხედვით, პროცესი ამ ფერმენტებისაგან დამოუკიდებლად მიმდინარეობს. პოლიქლორირებული ბიფენილების მინერალიზაციას ასევე წარმატებით ახორციელებენ არალიგნი-ნოლიზური მიკროსკოპული სოკოები [47].

ისეთი სინთეზური პოლიმერების სოკოვანი დეგრადაცია, როგორიცაა პოლიურეთანები, მიმდინარეობს ექსტრაცელულარული რთულ-ეთერული სეკრეციის გზით, ამ პროცესს ახორციელებს მიკროსკოპული სოკო *Curvularia senegaleus* [37], რაც შეეხება თეთრი ლპობის სოკოებს, მათ პოლიურეთანების დეგრადაციის უნარი არ აღმოაჩნდათ. პოლიეთილენის, რომელიც ფართოდ გამოიყენება პლასტიკური პროდუქტების წარმოებაში, დეგრადაციის შესაძ-ლებლობა გამოკვლეული იქნა *Phanerochaete Chrysosporium*-სა და

ბაქტერიულ შტამში *Streptomyces sp.,* აქედან მხოლოდ ბაქტერიულ შტამს აღმოაჩნდა მნიშვნელოვანი დეგრადაციის უნარი [112]. თხევად კულტურაში ვინილის სპირტის ჟანგვით დეგრადაციას ადგილი აქვს თეთრი ლპობის სოკოს *Pycnoporus cinnabarinus*-ის მიერ. *Phanerochaete Chrysosporium*-ი და, *Trametes versicolor*-ი ახდენენ ნეილონის მნიშვნელოვან დეგრადაციას [45]. შემდგომში აღმოჩენილი და დახასიათებული იქნა ნეილონის დამშლელი ფერმენტები, რომლებიც გამოყოფილი იქნა უსახელო თეთრი ლპობის სოკოებიდან (IZU-154) [45].

ლაბორატორიულ კვლევებთან შედარებით, სადაც გამოიყენება ნახევრად თხევადი კულტურები, ბუნებრივ ნიადაგში თეთრი ლპობის სოკოების დეგრადაციის ხარისხი ჩვეულებრივ მცირეა [24], რასაც განაპირობებს ორგანული ტოქსიკანტის ბიოსარგებლიანობა და სოკოების ზრდის უნარი. ნიადაგში ორგანო-დამბინძურებლის ბიოსარგებლიანობა, მათი წყალში მცირედ ხსნადობისა და ნიადაგში სუსტად ადსორბციის გამო, ძირითადად მცირეა, თუმცა ნაწილობრივ დაჟანგული პოლიციკლური ნახშირწყალბადები ავლენენ ბიოდეგრადაციის მაღალ უნარს. ასევე მაღალია დეგრადაციის უნარი, ნიადაგში არა-იონური რეაგენტების დამატებისას [21]. ნიადაგის პირობები უნდა შეესაბამებოდეს თეთრი ლპობის სოკოების ზრდას. მათ ზრდაზე გავლენას ახდენს ისეთი ფაქტორები, როგორიცაა ტენიანობა, ნახშირბად/აზოტის თანაფარდობა და ტემპერატურა [50]. მათზე, ასევე მოქმედებს, ადგილობრივ მიკროფლორასთან კონკურენცია. მაგალითად, ლაბორატორიულ პირობებში, ნიადაგის ბაქტერიამ მოახდინა *Phanerochaete Chrysosporium*-ის ფუნქციის ინჰიბირება [139], თუმცა სხვა მონაცემებით, ნიადაგში თეთრი

ლპობის სოკოს – *Pleurotus sp.*-ს შეტანამ გამოიწვია ნიადაგის ადგილობრივი ბაქტერიის ფუნქციის ინჰიბირება [77]. ნიადაგის მიკროფლორაში სასურველია თეთრი ლპობის სოკოების თანაარსებობაც, რადგან ისინი ადგილობრივ მიკროორგანიზმებთან ერთად კონსორციულად მოახდენენ ორგანული ტოქსიკანტის მინერალიზაციას [104].

იმ სოკოებს შორის, რომელთა გამოყენებაც შესაძლებელია ბიორემედიაციაში, აღსანიშნავია *Zygomycetes* წარმომადგენლები, მაგ: მუკორალური სოკოები და დატოტვილი მუკორალური სოკოები. ბიორემედიაციის სხვა კანდიდატები არიან ასევე წყლის სოკოები და ანაერობული სოკოები [158].

საინტერესოა ბრაზილიელი მკვლევარების მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგები. მათ მიერ შესწავლილი იყო 13 ლიგნინის დამშლელი ფერმენტების შემცველი დეიტერომიცეტის შტამი, რომ-ლებიც გაზრდილი იყო პოლიციკლური არომატული ნახშირ-წყალბადების შემცველ არეზე. მათ მიერ შესწავლილმა ყველა შტამმა აჩვენა ლიგნინოლიზური ფერმენტების, კერძოდ კი მანგანუმპეროქსიდაზას, ლიგნინპეროქსიდაზას და ლაკაზას აქტივობები [9].

ამ ნაშრომში შესწავლილი ყველა შტამებისათვის, კულტურალურ სითხეებში აღმოჩენილი ლიგნინოლიზური აქტივო-ბებიდან, უპირატესი იყო მანგანუმპეროქსიდაზა. ეს შედეგები ეთანხმება გონგის და ლამარის იმ მონაცემებს [21, 22], როდესაც სოკო *Phanerochaete laevis* HHB-1625 ახდენდა პან-ების დეგრადაციას (ანტრაცენი, ფენენტრენი, და ბენზო(α)პირინი) თხევად არეში, მანგანუმპეროქსიდაზული აქტივობის წარმოქმნით.

ლაუმენი და სხვები [111] აცხადებენ, რომ მიკროორგანიზმები უფრო ეფექტურად შლიან არომატული ბირთვების მცირე რაოდენობის მქონე პან-ებს. შტამი 984 იწვევს ანტრაცენის დეგრადაციას (64%+-10%), რომელიც შეიცავს 3 არომატულ ბირთვს, ისევე ეფექტურად, როგორც ნაფტალინს, რომელსაც აქვს ორი არომატული ბირთვი (69+-10), თუმცა შტამი 870 გვიჩვენებს ანტრაცენის უფრო ეფექტურ დეგრადაციას (53%), ვიდრე ნაფტალინის (17%).

ამ დეიტორიომიცეტების შტამებს შორის ნაჩვენები იყო მნიშვნელოვანი განსხვავება პან-ების გარდაქმნის უნართან დაკავშირებით, ისივე როგორც ლიგნინოლიზური ფერმენტების წარმოქმნის დროს. სავარაუდოდ, საკმაოდ ცვალებადია თეთრი ლპობის სოკოების სხვადასხვა წარმომადგენლების მიერ პან-ების და სხვა დამაბინძურებლების გარდაქმნის უნარიც. ეს ცვალებადობა გამოწვეულია როგორც თეთრი ლპობის სოკოების სხვადასხვა წარმომადგენლების განსხვავებული ენზიმოლოგიით, ასევე სხვადასხვა კულტურალურ არეებში ზრდისა და საპასუხო ენზიმების წარმოქმნის მრავალფეროვნებით [21, 22, 109]. პან-ების დეგრადაცია ამ დეიტერიომიცეტების სოკოების შტამების გამოყენებით განაპირობებს მათი ლიგნინოლიზური ფერმენტების გამოკვლევის და თეთრი ლპობის სოკოების მიმართ შედარების ინტერესს.

ამჟამად, მსოფლიოს ყველა განვითარებულ ქვეყანაში ეკოტოქსიკანტების მიკრობული დესტრუქცია გახდა ინტენსიური კვლევების ობიექტი. პროცესის ეფექტურობა, უპირველეს ყოვლისა, ეფუძნება აქტიური დესტრუქტორი შტამების გამოვლენას.

## 1.3. ტნტ-ს დეგრადაცია მიკროორგანიზმების საშუალებით

2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის ბიოგარდაქმნაში განსაკუთრებული წვლილი მიუძღვით ბაქტერიებს.

[195] ავტორების მიერ გამოკვლეული იქნა 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის პირველადი გარდაქმნა ბაქტერიული შტამის *Pseudomonas denitrificans* მიერ. ამისთვის აღებული შტამი გაზარდეს სინთეზურ არეში, სადაც ტნტ-ს კონცენტრაცია იყო 200 მგ/ლ. ტნტ-ს გარდაქმნის პირველადი ეტაპი მიმდინარეობს აღდგენის მექანიზმით. ამ დროს აღმოჩენილი აზოქსინაერთების იზომერების ხასიათი ადასტურებს ჰიდროქსილამინების წარმოქმნას აღდგენის პროცესში. 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის გარდაქმნის დინამიკის შესწავლით დადგინდა, რომ ტნტ-ს სრული გარდაქმნა აღდგენითი მეტაბოლიტების წარმოქმნით მიმდინარეობს 4 დღე-ღამის განმავლობაში. ამ პერიოდის მანძილზე აღდგენის პროდუქტების დაგროვება, ტნტ-ს გარდაქმნასთან შედარებით, უფრო ხანგრძლივად მიმდინარეობდა. მიღებული შედეგები ამტკიცებს 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის მე-2 მდგომარეობაში მყოფი ნიტროჯგუფის აღდგენის უპირატესობას.

[118] ნაშრომში ნაჩვენებია 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის აეროობული დეგრადაცია ბაქტერიების მიერ, რომელიც ჩვეულებრივ იწყება ერთი ნიტროჯგუფის აღდგენით. ფერმენტები, რომლებიც აკატალიზებენ ამ აღდგენით რეაქციას არიან არასპეციფიურები, ნადფ(H) დამოკიდებული ნიტრორედუქტაზები და უფრო ხშირად არ არის დახასიათებული. გამონაკლისია ბაქტერიული შტამიდან *P.*

*pseudoalcaligenes* JS52 გამოყოფილი ნიტრობენზენნიტრორედუქტაზა, რომელსაც შეუძლია ტნტ-ს ტრანსფორმაცია შუალედურ პროდუქ-ტებამდე მონო და დიჰიდროქსილამინამდე. ეს ფერმენტები, მათი სახელიდან გამომდინარე, პირველად ნაპოვნი იყო ნიტრობენზენის აღდგენის დროს. დადგინდა, რომ აერობულ ბაქტერიებს აქვთ ტნტ-ს 3 ნიტროჯგუფიდან ორის რედუქციის უნარი, მესამე ჯგუფის აღდგენა მოითხოვს ანაერობულ პირობებს.

ამერიკელი ავტორების მიერ [173] დადგენილი იქნა, რომ 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის პირველადი მიკრობული გარდაქმნა, ელექტრონების ნაკლებობის გამო, მიმდინარეობს აღდგენის მექანიზმით, კერძოდ, ამ დროს ადგილი აქვს ტნტ-ს ნიტროჯგუფების აღდგენას. მაგ. აერობულ პირობებში ტნტ-თი, გამდიდრებულ ორ ბაქტერიულ შტამში: გრამ-უარყოფითი შტამი სახელწოდებით ტნტ-8 და გრამ-დადებითი შტამი ტნტ-32, განხორციელდა 2,4,6-ტრინიტრო-ტოლუოლის ნიტროჯგუფების აღდგენა. ამის საპირისპიროდ ბაქტერიული შტამი *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1, რომელიც ახდენს 2,4-დინიტოფენოლის უტილიზაციას და 4-ნიტროტოლუოლის მადეგრადირებელი შტამი *Mycobacterium* sp.HL 4-NT-1 შეიცავენ აღმდგენელ ფერმენტთა სისტემას, რომელიც აკატალიზებს არომატული ბირთვის ჰიდროგენიზაციის რეაქციას. ამ დროს ადგილი აქვს ნუკლეოფილური წყალბადის იონის არომატულ ბირთვზე შეტევას. ჰიდრიდული კომპლექსის წარმოქმნა არ იდენტიფიცირდება ტნტ-თი გამდიდრებულ შტამებში ტნტ-8 და ტნტ-32, აგრეთვე ცოტა ხნის წინ გამოყოფილ ბაქტერიულ შტამში *Pseudomonas* sp.A (2NT-). ამ შტამებში დენიტრირებას ადგილი არა აქვს. მათ შეუძლიათ ტნტ-ს ნიტროჯგუფების აღდგენა.

ბაქტერიების საშუალებით 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის ბიოგარდაქმნის პროცესის შესწავლას ეძღვნება მრავალი გამოკვლევა [118, 173]. მიუხედავად ამისა, ტნტ-ს მეტაბოლიზმის აღიარებული სქემა და ამ ნივთიერების ბაქტერიული დესტრუქციისას ძირითადი ფერმენტაციული ეტაპების შესახებ მონაცემები დღეისთვის არ არსებობს.

ტნტ-ს ქიმიური თვისებების გამო, ბაქტერიების მიერ ტნტ-ს ნიტროჯგუფის აერობული მეტაბოლიზმი ძნელად ხორციელდება, რის გამოც ჟანგბადის არსებობის პირობებშიც კი, ეს ნივთიერება აღდგენითი მეტაბოლიზმით უნდა გარდაიქმნას [27, 86].

დღემდე არსებული მონაცემებით, აერობული ბაქტერიები, უმრავლეს შემთხვევაში, მიისწრაფიან გარდაქმნან ტნტ-ს მოლეკულა ერთი ან ორი ნიტროჯგუფის აღდგენით, ჰიდროქსილამინო ან ამინოჯგუფებად და წარმოქმნიან ამინონიტროარომატული ნაერთების სხვადასხვა იზომერებს. ეს იზომერები, თავის მხრივ, ჩვეულებრივ შემდგომი მეტაბოლიზმის გარეშე გროვდებიან კულტურალურ არეში. ჟანგბადის თანაობისას ტნტ-ს აღდგენილი ფორმები ურთიერთ-ქმედებს ერთმანეთთან მდგრადი აზოქსიტეტრანიტროტოლუოლების წარმოქმნით [79], რომლებიც ტნტ-ზე სწრაფად იწვევენ მუტაციებს. ამ ტრანსფორმაციული რეაქციების საშუალებით ხდება ტნტ-ს მოცილება, მაგრამ იძლევა ძლიერ მდგრად პროდუქტებს, რომლებსაც ვერ გარდაქმნიან მათი წარმომქმნელი მიკროორგანიზმების უმრავლესობა [92].

ფეთქებადი ნივთიერებების მწარმოებელი ქარხნების ტერიტორიების ნიადაგებიდან გამოყოფილი და აღწერილია *Pseudomonas*-ის შტამი, რომელსაც ჰქონდა ტნტ-ზე, როგორც აზოტის

ერთადერთ წყაროზე, ზრდის უნარი [49]. კულტურის სუპერნატანტში ნიტრიტის დაგროვება და სამივე ნიტროჯგუფის თანმიმდევრული მოცილება დადგენილი იყო კულტურის სუპერნატანტში დინიტრო-ტოლუოლების, მონონიტროტოლუოლებისა და ტოლუოლის იდენტიფიცირებაზე დაყრდნობით. ვარაუდობდნენ, რომ *Pseudomonas*-ის შტამის მიერ ტნტ-ს გაუვნებელყოფა მეისენჰეიმერის კომპლექსის წარმოქმნის გზით ხდება [79]. ეს კომპლექსი აღწერილია ბევრი ავტორის მიერ, როგორც ბაქტერიების პოლიციკლური მეტაბოლიზმის პროდუქტი. სასურველია მოხდეს ტნტ-ს 2,4-დნტ-დ დაგროვება, ვინაიდან ნაჩვენებია, რომ *Pseudomonas*-ის სხვა შტამების დეჰიდროგენაზების ზემოქმედების შედეგად ხდება ამ არომატული ნაერთის მეტაბოლიზმი 4-მეთილ-5-ნიტროკატექოლის წარმოქმნით, რასაც თან სდევს ჟანგვა, ნიტრიტის მოხლეჩვა და მინერალიზაცია [80, 123].

ტნტ-ს უფრო სწრაფი და ეფექტური დეგრადაციისათვის შესწავლილი იქნა ანაერობული სისტემები [78, 79].

ტნტ-ს ანაერობული მეტაბოლიზმის მონაცემები აღწერილია ნაშრომში [117], სადაც ნაჩვენებია, რომ *Veillonella alkalescens*-ის უჯრედულ სუსპენზიას ან გაუწმენდავ ექსტრაქტს წყალბადის თანაობისას (როგორც ელექტრონების დონორი) შეუძლია ტნტ-ს ტრიამინოტოლუოლად (ტატ) აღდგენა. უკანასკნელი 10 წლის განმავლობაში მრავალ პუბლიკაციაშია აღნიშნული, რომ ეს აღდგენა მხოლოდ ანაერობულ პირობებშია შესაძლებელი, რადგან ტნტ-ს წარმოქმნისათვის საჭირო დაბალი პოტენციალი შეუძლებელს ხდის ამ რეაქციას აერობულ მიკროორგანიზმებში [73].

ლიგნინის დამშლელი სოკო *Phanerochaete Chrysosporium* სოკოვან სისტემებს შორის წარმოადგენს ბიორემედიაციის მოდელს. მას აღმოაჩნდა ტნტ-ს სრული დეგრადაციისა და მინერალიზაციის უნარი $CO_2$-მდე [91, 85]. ამდენად, ხის თეთრი ლპობის სოკო – *Phanerochaete chrisosporium*-ი არის ინტენსიური შესწავლის საგანი, ბოლო დროს კი გამოკვლეული იქნა სხვა თეთრი ლპობის სოკოების და ნაყარის დამშლელი სოკოების მიერ ტნტ-ს გარდაქმნის უნარი [6].

თეთრი ლპობის სოკოების მიმართ ინტერესი გაჩნდა იმის გამო, რომ მათ აქვთ მდგრადი და ტოქსიკური ქიმიური ნაერთების მრავალფეროვანი ჯგუფების დაშლის უნარი. გამოკვლევების შედეგად აღმოჩენილ იქნა ტნტ-ს მეტაბოლიზმი *Phanerochaete chrisosporium*-ით ზღვრული აზოტის პირობების ქვეშ (30, 63, 85]. დადგენილია, რომ საკვები ნივთიერებების ნაკლებობა (ნახშირბადის, აზოტის ან გოგირდის შეზღუდული რაოდენობები), ხელს უწყობდა ტნტ-სა და სხვა ქსენობიოტიკებზე შეტევას. ეს რეაქციები ხორციელდება ლიგნინის დამშლელი ფერმენტების სისტემით, რომლის შემადგენლობაში შედის ლიგნინპეროქსიდაზა, მანგანუმპეროქსიდაზა (MnP), რედუქტაზები, ჰიდროგენპეროქსიდაზა, ვერეთრილის სპირტი, ოქსილატი და ფენოლოქსიდაზა [156].

ისევე როგორც სხვა ორგანიზმებში, ტნტ-ს სოკოებით დაშლისას პირველი საფეხურია ნიტროჯგუფების აღდგენა მისი რეაქციაში ჩართვით [128], *Phanerochaete chrisosporium*-ის მიცელიუმი შლის ტნტ-ს და მიიღება შემდეგი ნარევი: 4-ადნტ, 2-ადნტ, 4-ჰიდროქსილამინო-2,6-დინიტროტოლუოლი. არომატული რთული ნაერთები და აზოქსიტეტრანიტროტოლუოლი ქრება ლიგნინო-

ლიზური პირობების ქვეშ და მინერალიზაცია შეიძლება იყოს საკმაოდ ფართო.

სტელმა და ოუსთმა [154-156] გაითვალისწინეს მონაცემები, რომ *Phanerochaete chrisosporium*-ში ტნტ აღდგება პლაზმური მემბრანის ჟანგვა-აღდგენითი სისტემით, რაც მოითხოვს ცოცხალ და ხელუხლებელ მიცელიუმს. ნებისმიერი პირობები, რომელიც შლის პლაზმური მემბრანის მთლიანობას, სპობს რედუქტაზას აქტივობას. ცნობილია, რომ მემბრანის ჟანგვა-აღდგენითი სისტემების მაინჰიბირებელი რთული კომპონენტების არსებობა, ასევე აინჰიბირებს ტნტ-ს რედუქტაზას. ავტორები მიგვანიშნებენ, რომ აღდგენა ორმაგდება პროტონის გამტანი სისტემით, რომელიც გამოიყენება სოკოების მიერ უჯრედგარეთა ფიზიოლოგიური pH-ის შესანარჩუნებლად, დაახლოებით 4,5-მდე. ამის საწინააღმდეგოდ რაიბლმა [134] წარმოგვიდგინა მემბრანასთან დაკავშირებული ტნტ-ს რედუქტაზას აქტივობა, რომელიც მოითხოვს მოლეკულური ჟანგბადის არარსებობას და ნადფ(H)-ს, როგორც კოსუბტრატს. ასევე იყო აღწერილი ნადფ(H)-ზე დამოკიდებული შიდა უჯრედული ტნტ-ს რედუქტაზას აქტივობა. *Phanerochaete chrisosporium*-ით ამ რთული ნაერთების სწრაფი დეგრადაცია და მინერალიზაცია ხდება მხოლოდ მაშინ, როდესაც კულტურა არის ლიგნინოლიზური. იგულისხმება, რომ ლიგნინპეროქსიდაზა, მანგანუმპეროქსიდაზა და/ან სხვა ლიგნინოლიზური სისტემის ფერმენტები სწრაფად გარდაქმნის ტნტ-ს აღდგენის პროდუქტებს. მიკროსკოპული სოკოების მიერ ფეთქებადი ნივთიერებების მინერალიზაციის მექანიზმი არ არის ცნობილი, მაგრამ წარმოდგენილი იყო წინასწარი ინფორმაცია ამ პროცესების შესახებ [88, 120]. როდესაც *Phanerochaete chrisosporium*-ის

ლიგნინოლიზური კულტურები ინკუბირდებოდა 4-ადნტ-სთან ერთად, აღმოჩენილ 4-ფორმამიდ-2,6-დნტ. ეს შუალედური რგოლი გარდაიქმნებოდა 2-ამინო-4-ფორამიდ-6-ნიტროტოლუოლში. ეს ნაერთი სწრაფად უჩინარდებოდა ლიგნინოლიზურ პირობებში, მაგრამ არა არალიგნინოლიზურის დროს. არალიგნინოლიზურ გარემოში ადნტ-ს მეტაბოლიტები ნელა აღდგებოდა დანტ-მდე და აზოქსინიტროტოლუოლის კონცენტრაცია იზრდებოდა.

ტნტ-ს აღდგენის ჰიდროქსილამინოდინიტროტოლუოლის პროდუცენტები აინჰიბირებს ვერატრილის სპირტის დამჟანგველ მოქმედებას ლიგნინპეროქსიდაზაზე [28, 119]. ეს მოქმედება იცავს ლიგნინპეროქსიდაზას $H_2O_2$-ით ინაქტივიზაციისაგან და განმარტავს, თუ რატომ ხდის ჰიდროქსილამინოდინიტროტოლუოლის არსებობა ადნტ-ს უფრო ადვილად მინერალიზებადს, ვიდრე ტნტ-ს [156], ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგების *Phanerochaete chrisosporium*-ის საშუალებით ბიორემედიაციის სქემა, იმთავითვე მოითხოვს ისეთ პირობებს, რომ თავიდან ავიცილოთ ჰიდროქსილამინო-დინიტრო-ტოლუოლის დაგროვება.

აზოქსიტეტრანიტროტოლუოლის დეგრადაცია *Phanerochaete chrisosporium*-ის საშუალებით არ არის მოულოდნელი, რადგან აზოქსის- რთული ნაერთების აზო- რთულ ნაერთებამდე აღდგენა ქიმიურად ადვილია და ამ სოკოებით მინერალიზაცია სხვადასხვა აზო- საღებავებში უკვე იყო აღწერილი [129]. *Phanerochaete chrisosporium*-ის დამშლელი პოტენციალი ტნტ-ს მინერალიზა-ციისათვის შეზღუდულია, რადგან სოკოების ზრდა ითრგუნება ტნტ-ს შედარებით დაბალ კონცენტრაციაზე და ამ პოლინიტროარომატული რთული ნაერთის *Phanerochaete chrisosporium*-

ის მიცელიუმით ფიქსირებული აღდგენა ინჰიბირდება 20 ppm-ის ზემოთ. *Phanerochaete chrisosporium*-ის ტნტ-ს მიმართ დაბალი ამტანობა ხელს უშლის მათ გამოყენებას ბიორემედიაციისათვის დაბინძურებული ნიადაგების ისეთ უბნებზე, სადაც არის ამ ნიტროარომატული ნაერთის მაღალი კონცენტრაციაა.

ტნტ-ს პოტენციურ დამშლელებად გვევლინებიან სხვა სოკოებიც [99]. ამის დასადასტურებლად წარმოდგენილი იყო ტნტ-ზე ცალკეული თეთრი ლპობის სოკოების მანგანუმპეროქსიდაზას ზემოქმედება [140, 141]. შეიბერმა და ჰოფრიჩერმა [140] გვიჩვენეს, რომ თეთრი ლპობის ბაზიდიომიცეტის *Nematoloma frovardii*-ს და ნაყარის დამშლელი ბაზიდიომიცეტის *Stropharia rugosoannulata*-ს უჯრედებისაგან განთავისუფლებულ MnP-ს პრეპარატს ისევე შეუძლია მოახდინოს [$^{14}$C]ტნტ-ს აღდგენის პროდუქტების ნარევის მინერალიზაცია, როგორც 2-ამინო-4,6-[$^{14}$C]-დინიტროტოლუოლის 141, 142]. მოგვიანებით ვენ ეიკენმა [166, 167] წარმოგვიდგინა სხვა თეთრი ლპობის სოკოდან – *Phlebia radiat*-დან გამოყოფილი MnP-ას პრეპარატი, რომელსაც ჰქონდა უნარი სრულად გარდაექმნა ტნტ (22% მინერალიზაცია) და 2-ამინო-4-6-დინიტროტოლუოლი (76% მინერალიზაცია). ამ *in vitro* საანალიზო ნიმუშში აღდგენილი გლუტათიონი და ცისტეინი მცირე რაოდენობით იყვნენ წარმოდ-გენილი. MnP-ას ფერმენტული სისტემის აქტივობა იყო ბევრად უფრო მაღალი, ვიდრე ლიგნინოლიზურ უჯრედგარეშე სითხეში [168, 169]. ამ ფერმენტს შეუძლია შეასრულოს მნიშვნელოვანი როლი ტნტ-ს დეგრადაციაში, რადგან ეს *in vitro* პროდუქტი არ რეგულირდება ნახშირბადის წყაროებით [68].

თეთრი ლპობის სოკოების გარდა, სხვა სოკოვან შტამებს, რომლებიც მიეკუთვნებიან ხის და ნაყარის ლპობის ბაზიდიომიცეტებს, ჩაუტარდათ კვლევები ტნტ-ს მეტაბოლიზმის და მინერალიზაციის უნარზე [140]. მნიშვნელოვანი მინერალიზაცია განხორციელდა შტამების *Clitocybula dusenii* TMB12(42%) და *Stropharia rugosoanulata* DSM11372(36%) მიერ, ლიგნინის დამშლელი პირობების დროს. ეს ფაქტი მიგვანიშნებს ამ სოკოებით მინერალიზაციის პროცესში ლიგნინის დამშლელი ფერმენტების მნიშვნელოვან როლზე.

როგორც აღვნიშნეთ, ბაზიდიალური სოკოები არის ხის სოკოები და არა ნიადაგის, ამიტომ შესაძლოა კარგი კონკურენცია ვერ გაუწიონ ადგილობრივ, ნიადაგის სოკოებს [64].

ნიადაგის სოკოებს მიეკუთვნება მიკროსკოპული სოკოები, თუმცა მათი დეტოქსიკაციის უნარი ნაკლებადაა შესწავლილი. ცოტა ხნის წინ წარმოდგენილი იყო მოხსენება [15]. მიკროსკოპული სოკოების რამდენიმე სახეობის მიერ ტნტ-ს მაღალი კონცენტრაციის ამტანობის შესახებ. მიკროსკოპული სოკოს შტამები *Cladosporium resinae* და *Cunninghamella echinulata* var.*elegans* ახდენენ ტნტ-ს ბიოტრანსფორმაციას აღდგენის პროდუქტებად. მიუხედავად იმისა, რომ ეს სოკოები [$^{14}$C]ტნტ-ს მნიშვნელოვან რაოდენობას გარდაქმნიან პოლარულ მეტაბოლიტებად, მინერალიზაცია არ აღინიშნება.

ბეიმანის და რადკარის მიერ [15] თხევად არეში გამოკვლეული იქნა რვა სოკოს კულტურა ტნტ-ს გარდაქმნის და გამძლეობის უნარის მიხედვით. უახლესი კვლევების საპირისპიროდ, გამოყენებული იქნა ტნტ-ს მაღალი კონცენტრაცია, მცირე ინკუბაციის დრო, არალიგნინოლიზური ფერმენტები და ტაქსონომიურად

დაშლის უნარის მქონე სოკოები. ფაქტიურად, სამდღიანი ზრდის შემდეგ კულტურებში *Cladosporium resinae* და *Cunninghamella echinulata var. elegans* კულტურალურ სითხეში ტნტ არ იქნა აღმოჩენილი. ყველა სოკომ წარმოქმნა შემდეგი მეტაბოლიტები: აზოქსიტეტრანიტროტოლუოლი, ამინოდინიტროტოლუოლი და ჰიდროქსილამინოდინიტროტოლუოლი.

მიკროსკოპული სოკოს კულტურები: *Cunninghamella echinulata* var. *elegans, Trichoderma viridae, Schizophyllium commune* და *Cladosporium resinae* [$^{14}$C]-ის შემცველ ტნტ-ს მნიშვნელოვანი რაოდენობით 27%, 19%, 18% და 8% შესაბამისად, გარდაქმნიან წყალში ხსნად მეტაბოლიტებად. არც ერთმა სოკომ არ წარმოქმნა $^{14}CO_2$ და $^{14}$C-აქროლადი მეტაბოლიტები. ყველაზე მეტად ტნტ-ს მიმართ გამძლე აღმოჩნდა მიკროსკოპული სოკოს კულტურები – *Trichoderma viridae* და *Cladosporium resinae,* რაც განისაზღვრა აგარის არეზე განმეორებადი ზრდის ინჰიბირებით. ამიტომ ეს ავტორები გვთავაზობენ თანმიმდევრულად ორსაფეხურიან პროცესს, საწყის ეტაპზე ზემოთ აღნიშნული ნიადაგის სოკოების საშვალებით ტნტ ჯერ აღდგება ამინოდინიტროტოლუოლამდე, და შემდეგ მინერალიზდება *Phanerochaete Chrysosporium*-ის საშუალებით. ამ ორივე პროცესს შეუძლია დააჩქაროს ტნტ-ს მინერალიზაცია, დაიცვას *Phanerochaete Chrysosporium* ტნტ-ს ტოქსიკურობისგან, რომელიც გამოწვეულია ჰიდროქსილამინოდინიტროტოლუოლის წარმოქმნით [15].

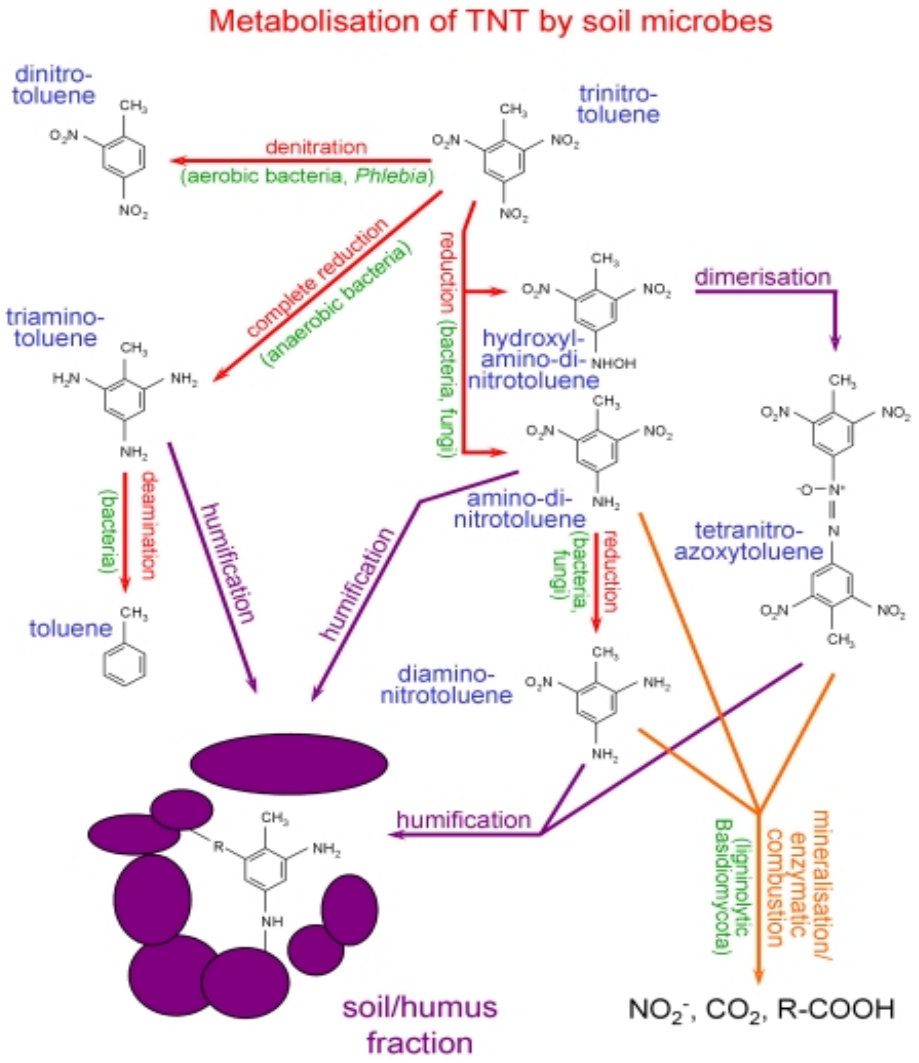
ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგებიდან გამოყოფილი იქნა მიკროსკოპული სოკოს ზოგიერთი კლასის, კერძოდ ზიგო- და

დეიტერომიცეტების წარმომადგენელი 73 შტამი. განხორციელდა ტნტ-ს მიმართ გამძლე და ამ ქსენობიოტიკის ბიოგარდაქმნის უნარის მქონე სოკოების სკრინინგი. ამ კლასის წარმომადგენლებს აღმოაჩნდათ 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის უნარი. მათ უმეტესობას შეუძლიათ ტნტ-ს კრისტალების გახსნა მათი გარდაქმნით ამინოდინიტროტოლუოლში და აზოქსი ფორმაში. მნიშვნელოვანი ბიოგარდაქმნელები არიან ზიგომიცეტებიდან: *Absida, Montrierella* და *Cunnibnghamella,* ხოლო დეიტერომიცეტებიდან: *Trichoderma, Acremonium Cylindrocarpon* და *Cliocladium* [177].

ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგებიდან და კომპოსტიდან იდენტიფიცირებული იქნა შემდეგი გვარის: *Alternaria, Aspergillus, Penicillium* და *Trichoderma* წარმომადგენელი მიკროსკოპული სოკოები. მყარ და თხევად არეებზე მათ გააჩნდათ განსხვავებული გამძლეობა ტნტ-სადმი [17].

ბევრ სოკოებს, რომლებსაც აქვთ ტნტ-ს ბიოტრანსფორმაციის უნარი ასევე შეუძლიათ ჰექსოგენის მინერალიზაცია. ნიტრორედუქტაზას, რომელიც მონაწილეობს ორივე პროცესში, შესაძლოა აქვს სხვადასხვა მოქმედება, აღადგენს ტნტ-ს, მაგრამ ახდენს ჰექსოგენის მინერალიზაციას. ეს დამოკიდებულია ამ ორ სუბსტრატში ციკლური რგოლების განსხვავებულ მდგრადობაზე [53].

მე-3-ე სურათზე ნაჩვენებია ტნტ-ს მეტაბოლიზმი ნიადაგის მიკროორგანიზმების საშუალებით.




სურ. 3. ტნტ-ს მეტაბოლიზმი ნიადაგის მიკროორგანიზმების საშუალებით

როგორც ლიტერატურაში არსებული მონაცემებიდან ჩანს, მრავალი მკვლევრის მიერ შესწავლილი და აღწერილია დესტრუქტორი შტამები, რომლებიც ძირითადად ბაქტერიებსა და ბაზიდიალურ ანუ თეთრი ლპობის სოკოებს მიეკუთვნებიან [49, 197, 198].

მიკროსკოპული სოკოების დეტოქსიკაციის უნარი ნაკლებადაა შეწავლილი, თუმცა ბოლო წლების მონაცემებით მიკროსკოპული სოკოების ზოგიერთი კლასის, კერძოდ – ზიგო- და დეიტერო-მიცეტების წარმომადგენლებს აღმოაჩნდათ 2,4,6-ტრინიტრო-ტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის უნარი [7, 14, 161].

ამდენად, ძალიან მნიშვნელოვანია საქართველოს სხვადასხვა რეგიონებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის დესტრუქტორი-შტამების გამოვლენა.

# თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი

## 2.1. კვლევის ობიექტები

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონების ნიადაგებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები და დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში არსებული მიკროსკოპული სოკოების კოლექციიდან აღებული სხვადასხვა გვარის – *Aspergillus, Penicillium, Mucor, Fusarium, Trichoderma, Rhizopus, Botrytis., Altenaria, Cladosporium* და *Trichothecium*–ის მიკროსკოპული სოკოების შტამები. სულ შესწავლილია 77 კულტურა.

## 2.2. საქართველოს სხვადასხვა რეგიონების ნიადაგებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა.

მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოსაყოფად თავდაპირველად აღნიშნული ზონებიდან ავიღეთ 10-10 გასაშუალებული ნიმუში. (ნიადაგების ნიმუშები აღებულია 50სმ რადიუსში - ხუთი სხვადასხვა ადგილიდან, 15სმ სიღრმიდან) [200].

მიკრობიოლოგიური ჩათესვის წინ ვახდენდით ნიადაგის ნიმუშების წინასწარ დამუშავებას, რათა მიგვეღო სუსპენზია, რომელშიც მიკროორგანიზმები იქნებოდნენ ცალკეულ, თავისუფლად მოცურავე უჯრედების სახით. ეს მიღწეულ იქნა ნიადაგის აგრეგატების დისპერგირების, მიკროორგანიზმთა უჯრედების დესორბციის და მიკროკოლონიების ცალკეულ შემადგენელ

უჯრედებად დაყოფის გზით [191]. დამუშავებული ნიადაგის ნიმუშების ჩათესვას ვახორციელებდით ვაკსმანის ნიადაგების განზავების მეთოდითა [174] და ნიადაგის პირდაპირი ჩათესვის მეთოდით [176]. ვიღებდით შემდეგ განზავებებს - 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 - იმისათვის რომ სუსპენზიის თითოეულ თავისუფლად მოცურავე უჯრედს საკვებ არეზე მოხვედრისას მოეცა კოლონია.

## 2.3. მიკროორგანიზმების საკვები არეები და კულტივირების პირობები

მიკროსკოპული სოკოების კულტივირებისათვის ვიყენებდით შემდეგ საკვებ არეებს:

1. ჩაპეკის არე (გ/ლ): გლუკოზა – 30; $NaNO_3$–2; $K_2HPO_4$–1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.5; KCl–0.5; $FeSO_4 \times 7H_2O$–0.01. (pH 7,0);
2. უნივერსალური არე, შემდეგი შემადგენლობის 1ლ-ზე: ლუდის ბადაგი - 0,5 ლ ($7^0$ B); ონკანის წყალი - 0,5 ლ; აგარ-აგარი - 20გ. (pH 5,5-6,0).
3. ჩაპეკის მყარი მოდიფიცირებული არე, (გ/ლ): გლუკოზა - 30; NaNO3 – 9,1; $KH_2PO_4$ - 1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5; KCl - 0,5; $FeSO_4 \times H_2O$ - 0,002; აგარ-აგარი – 20; (pH 3,5-4,2)
4. ჩაპეკის თხიერი მოდიფიცირებული არე (გ/ლ); $NaNO_3$ – 9,1; $KH_2PO_4$ - 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; KCl - 0,5; $FeSO_4 \times H_2O$ - 0,002; გლუკოზა – 30; ალაოს ღივები – 2გ/100მლ, (pH 5,0).

სტერილიზაციის რეჟიმი იყი 0,7 ატმ, 40წთ. კულტივირებას ვაწარმოებდით $28^0$-$30^0$C-ზე.

ნიადაგებიდან მიკოფლორის პირველადი გამოყოფის შემდეგ, პირველადი ჩანათესებიდან, ვყოფდით სუფთა კულტურებს, რომელთა იდენტიფიცირებისათვის ვიყენებდით საკვლევებს [116, 186, 194, 196].

გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კოლონიების წარმომქმნელ ერთეულს (კწე) ვსაზღვრავდით 1 გრ. მშრალ ნიადაგზე გადაანგარიშებით, შემდეგი ფორმულით: A=abv/g, [190]. გამოყოფილი სუფთა კულტურები გადაგვქონდა მყარ აგარიზირებულ საკვებ არიან სინჯარებში.

ცალკეული გვარის შეხვედრის სიხშირეს ვსაზღვრავდით ფორმულით:

$$\text{გვარის შეხვედრის სიხშირე} = \frac{\text{ნიმუშების რაოდენობა, სადაც გამოვლენილია მოცემული გვარი}}{\text{ნიმუშების საერთო რაოდენობა}}$$

## 2.4. ნიადაგებში ტნტ-ს შემცველობის განსაზღვრა

თავდაპირველად ორგანული ტოქსიკანტების კონცენტრაციების შერჩევის მიზნით, ნიადაგებში, საიდანაც აღებული იყო ნიმუშები, განისაზღვრა ტნტ-ს შემცველობა.

ნიადაგის ნიმუშებიდან ორგანული ნივთიერებების ექსტრაქცია ხდებოდა ეთანოლით. ექსტრაქტში ტნტ-ს შემცველობა ისაზღვრებოდა შექცევად-ფაზური მაღალეფექტური თხევადი ქრომატოგრაფიით, სვეტზე BondaPac$C_{18}$ (15სმ 4.6 მმ, ნაწილაკების ზომა 5მკმ), შემდეგ პირობებში: გამხსნელთა სისტემა – ეთანოლი: წყალი, მოცულობითი თანაფარდობით 90 : 10, ნაკადის სიჩქარე – 1.0 მლ/წთ. დეტექტირება

ხდებოდა 254 ნმ-ზე, ტნტ-ს გამოსვლის დრო 12,5 წთ-ს შეადგენდა. აღმოჩნდა რომ, ნიადაგებში ტნტ-ს შემცველობა ბევრად აღემატებოდა დასაშვებ ზღვარს და შეადგენდა 5მგ/კგ-ზე, მაშინ როდესაც ტნტ-ს ეკოტოქსიკოლოგიური მაჩვენებელია 2მგ/კგ, რისი მეშვეობითაც შესაძლებელია დაბინძურებული ნიადაგის ეკოტოქსიკოლოგიური რისკის რაოდენობრივი შეფასება [150].

## 2.5. მიკროორგანიზმების მიერ ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაციის უნარის დადგენა

მიკროორგანიზმების მიერ ორგანული ტოქსიკანტების ბიოდეგრადაციის უნარის დასადგენად კულტურებს ვზრდიდით ტოქსიკანტების სხვადასხვა კონცენტრაციის შემცველ მყარ, აგარიზებულ საკვებ არეზე. საკვებ არეში შეგვქონდა ორგანული ტოქსიკანტები: ბენზ(α)პირენი (200მგ/ლ), ტრინიტროტოლუოლი (100 მგ/ლ, 200 მგ/ლ, 300 მგ/ლ, 400 მგ/ლ) და ორთოდიქლორბენზოლი (0.01M და 0.1M).

ჩასათეს მასალად ვიყენებდით მყარ საკვებ არეზე 10 დღის განმავლობაში $30^0$C ტემპერატურაზე გაზრდილი კულტურების კონიდიების სუსპენზიას. სტერილიზაციის რეჟიმი 0,5 ატმ, 30წთ. კულტივირებას ვაწარმოებდით $28^0$-$30^0$C-ზე 10 დღის განმავლობაში.

გაზრდილი მიკროსკოპული სოკოების აღწერას ვაწარმოებდით მე-3, მე-5, მე-7 და მე-10 დღეს. მიკროსკოპული სოკოების მიერ ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაციაზე ვმსჯელობდით ვიზუალურად, კულტურალურ–მორფოლოგიური თვისებების მიხედვით.

ასევე, შეფასების კრიტერიუმი იყო ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური თვისებები (ნახშირბადის, აზოტის, ფოსფორის წყაროები, ფერმენტებისა და მეორეული მეტაბოლიტების წარმოქმნა).

## 2.6. მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

გამოყოფილი კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის (ტემპერატურა და pH) დადგენის მიზნით კულტურებს ვზრდიდით 5 - $55^0$ C-მდე, $5^0$C-ის და pH-2,0 დან pH-10,0 მდე 0,5 ინტერვალით, საწყის საკვებ არეში. ტემპერატურისა და pH-ის ოპტიმუმად მიღებული იყო სოკოების კულტურების მაქსიმალური ნაზრდი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზომითა და ზრდის სიჩქარით. ჰალოფილური კულტურების გამოსავლენად საწყის საკვებ არეში NaCl შეტანილი იყო სხვადასხვა კონცენტრაციით 0,5M დან – 4,0M-მდე (შესაბამისად 2,93% – 23,2%).

შევისწავლეთ მიკროსკოპული სოკოების მიერ საკვებ არეში ტნტ-ს როგორც აზოტისა და ნახშირბადის, ასევე ორივე ელემენტის ერთდროულ წყაროდ გამოყენების შესაძლებლობა. შეგვქონდა ტნტ 200მგ/ლ-ზე კონცენტრაციით. კულტურების ზრდის ინტენსივობას მყარ საკვებ არეებზე ვაფასებით ვიზუალურად სამბალიანი სისტემით

+ ძალიან სუსტი ზრდა,

++ საშუალო ზრდა,

+++ კარგი ზრდა.

## 2.7. ტნტ-ს განსაზღვრა სპექტროფოტომეტრული მეთოდით

მიკროსკოპული სოკოების მიერ ასიმილირებული და დეგრადირებული 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის რაოდენობის დასადგენად მიმდინარეობდა შერჩეული შტამების სიღრმული კულტივირება ჩაპეკის თხიერ მოდიფიცირებულ არეში [14], 750 მლ-იან ერლენმეიერის კოლბებში. ინკუბაციას ვაწარმოებდით სანჯღრეველაზე 200 ბრ/წთ, $30^0$C ტემპერატურაზე, 72სთ-ის განმავლობაში. ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობის განსაზღვრისათვის კულტურალურ სითხეს ვაცენტრიფუგირებდით (4000 ბრ/წთ) 10 წთ-ის განმავლობაში.

ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრული მეთოდით [226].

2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის რაოდენობის 100%-ად ვიღებდით შესაბამის საკვებ არეს ტნტ-თი, სადაც არ იყო ჩათესილი კულტურა, ხოლო კონტროლად ვიღებდით სუფთა საკვებ არეს. 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლიანი საკვები არის შემცველი კოლბიდან სინჯარებში გადაგვქონდა ხსნარი შემდეგი რაოდენობით, მლ: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 10 და ვავსებდით 2 მლ-მდე გამოხდილი წყლით. შემდეგ ვუმატებდით 1 მლ 1M KOH -ის ხსნარს, რომ შეგვექმნა ტუტე არე და მაშინვე (3 წთ-ში) ვზომავდით სპექტროფოტომეტრზე 447 ნმ-ზე თითოეულის ოპტიკურ სიმკვრივეს. მიღებული შედეგების მიხედვით ვაგებდით საკალიბრო მრუდს. დანარჩენი კოლბებიდან, რომლებშიც ჩათესილი იყო შერჩეული მიკროსკოპული სოკოები, ვიღებდით კულტურალურ ხსნარს, თითოეულიდან 1 მლ-ის ოდენობით, გადაგვქონდა სინჯარებში და ვავსებდით 2 მლ-მდე. მათაც ვუმატებდით 1 მლ 1M KOH-ის ხსნარს და ვსაზღვრავდით

თითოეულის ოპტიკურ სიმკვრივეს, საკალიბრო მრუდზე მონაცემების შეტანით ვადგენდით კულტურალურ ხსნარში დარჩენილი 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის რაოდენობას და ამით ვაფასებდით შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს ბიოგარდაქმნის უნარს.

## 2.8. მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს გარდაქმნის პროდუქტების განსაზღვრა

მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს გარდაქმნის პროდუქტების განსაზღვრას ვახდენდით საკვებ არეში (1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის შეტანის საშუალებით.

ტნტ-ს გარდაქმნის პროდუქტების დასადგენად ჩვენს მიერ შერჩეული მაღალაქტიური მიკროსკოპული სოკოების *Mucor* sp. T1-1, *Trichoderma* sp. N2-6, *Aspergillus niger* N2-2 შტამები შეგვქონდა თხიერ არეში, სადაც ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ შეტანილი გვქონდა [1-$^{14}$C]-ტრინიტროტოლუოლი. რადიოაქტიური პრეპარატი შეგვქონდა ჩაპეკის თხიერ მოდიფიცირებულ არეში ¹4, სტერილურ პირობებში (კონცენტრაცია 200 მგ/ლ; ხვედრითი აქტივობა 500 ბკ/წთ). კულტივირება მიმდინარეობდა თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე (180 ბრ/წთ) 5 დღე-ღამის განმავლობაში, 30-40$^0$C ტემპერატურაზე, 750 მლ-იან ერლენ-მეიერის კოლბებში. კულტივირების დამთავრების შემდეგ ბიომასას ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით (5000 ბრ/წთ). ნალექს ვრეცხავდით გამოხდილი წყლით ადსორბირებული (1-$^{14}$C)-ტნტ-ს მოსაცილებლად, ვაშრობდით 60$^0$C-ზე და ვწონიდით.

ტნტ-ს მეტაბოლიზმის პროდუქტების ფრაქციებად დაყოფას ვაწარმოებდით ქაღალდის ქრომატოგრაფიის მეთოდის გამოყენებით [203]. ამისათვის მოვახდინეთ კულტურალური სითხის აორთქლება ვაკუუმ-როტაციულ ამაორთქლებელში და დავიყვანეთ მინიმალურ მოცულობამდე. ამის შემდეგ კულტურალურ სითხეს ვაწვეთებდით ქრომატოგრაფიულ ქაღალდზე, ქაღალდს ვაშრობდით და ქრომატოგრამას ვატარებდით გამხსნელ სისტემაში – გოგირდის დიეთილის ეთერი : ჭიანჭველამჟავა : წყალი, თანაფარდობით – 140 : 2 : 18, რომელსაც ვამზადებდით შემდეგნაირად: გამხნელს ვასხავდით გამყოფ ძაბრში და ვაყოვნებდით 24 სთ-ის განმავლობაში, შემდეგ ვაცილებდით ზედა ფენას. ქვედა ფენას ვასხამდით ქრომატოგრაფიულ ქილაში, თითოეულში 120 მლ-ის რაოდენობით და ვუშვებდით ქრომატოგრაფიულ ქაღალდს. გამხსნელის რამდენჯერმე გატარების შემდეგ ქრომატოგრამას ვიღებდით ქილიდან და ვაშრობდით ამწოვ კარადაში 24 სთ-ის განმავლობაში. ქაღალდს ვჭრიდით წვრილად და ვუკეთებდით ექსტრაქციას 80%-იანი სპირტხსნარით. ამის შემდეგ ექსტრაქტს ისევ ვაკონცენტრირებდით. ორგანული მჟავების იდენტიფიკაციისათვის ექსტრაქტს ვაწვეთებდით ქრომატოგრაფიულ ქაღალდზე წერტილებში. იმავე ქაღალდზე მარჯვენა მხარეს ვაწვეთებდით აუდიენტურ, ანუ ინდივიდუალურ მოწმეებს, რომლებიც წინასწარ გვქონდა მომზადებული და ვიცოდით მათი დასაწვეთებელი კონცენტრაცია. ამის შემდეგ ქრომატოგრაფიულ ქაღალდს ვატარებდით შემდეგ გამხსნელში: ბუთილის სპირტი : ჭიანჭველამჟავა : წყალი, თანაფარდობით – 18 : 3 : 15. გამხსნელის მომზადების წესი იგივეა, რაც წინა გამხსნელისა-

თვის. გამხსნელის რამდენჯერმე გატარების შემდეგ ქრომატოგრა-ფიულ ქაღალდს ვაშრობდით და ვამჟღავნებდით.

ორგანული მჟავების გამჟღავნებისათვის ვიყენებდით შემდეგ გამხსნელს – 20გ ბრომ-მეთილის ლურჯს ვხსნიდით 50 მლ 50%-იან სპირტში და წვეთ-წვეთობით ვამატებდით NaOH-ს ლურჯი ხსნარის მიღებამდე. მიღებულ ხსნარს პულვირიზატორით ვასხურებდით კარგად გამშრალ ქრომატოგრამას. მიიღებოდა ყვითელი ფერის ლაქები. მათ იდენტიფიკაციას ვახდენდით აუდიენტური მოწმეების საშუალებით, შემდეგ თითეულის რადიოაქტიურობას ვსაზღვრავდით სცინტილაციურ მთვლელზე LKB 1211 Rackbeta, ეფექტურობით 95%.

ორგანული მჟავების მოცილების შემდეგ სტარტზე დარჩა ჩვენთვის საინტერესო ამინომჟავები და შაქრები. სტარტზე დარჩენილ მასალას ვუკეთებდით სამჯერად ექსტრაქციას 80%-იანი სპირტით. ექსტრაქტს ვაკონცენტრირებდით და ვაწვეთებდით ქრომატოგ-რაფიულ ქაღალდზე. მარჯვენა მხარეს ვაწვეთებდით აუდიენტურ მოწმეებს. ამინომჟავების გასამჟღავნებლად ვიყენებდით შემდეგ ხსნარს – 95მლ აცეტონს ვამატებდით 4მლ გამოხდილ წყალს და 1მლ ყინულოვან ძმარმჟავას. ამ ხსნარს ვუმატებდით 0,5გ ნინჰიდრინს და ვასხურებდით კარგად გამშრალ ქრომატოგრამას. გაშრობის შემდეგ ნიმუშებს ვათავსებდით საშრობ კარადაში $60^0$C–ზე 30 წთ-ის განმავლობაში. მიიღებოდა მოწითალო იისფერი ლაქები. ინდივიდუალური კომპონენტების გაშიფვრის შემდეგ მათ ვჭრიდით ქრომატოგრამიდან და ვსაზღვრავდით თითოეული ინდივიდუალური კომპონენტის რადიოაქტიურობას.

## 2.9. დესტრუქტორი შტამების გამოყენება დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციისათვის

ტნტ-ს აქტიური დეგრადაციის უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოების მიერ შავმიწა და წითელმიწა ნიადაგებში ტნტ-ს დეგრადაციის დონეს ვსწავლობდით ლაბორატორიულ სტერილურ და მოდელურ პირობებში. ნიადაგებში ხელოვნურად შეგვქონდა 200მგ ტნტ 1კგ ნიადაგზე. ლაბორატორიულ პირობებში სოკოების ინკუბაციას ვახდენდით 25გ სტერილური ნიადაგის შემცველ პეტრის ჯამებში 35-40$^0$C–ზე 30 დღის განმავლობაში. ბუნებრივ პირობებში მოდელური ცდები ტარდებოდა 0,3 მ$^2$ ფართობის არასტერილურ ნიადაგებზე მარტის ბოლოდან ივლისამდე.

ნიადაგიდან ნარჩენი ტნტ-ს გამოტანა ხდებოდა ეთანოლით სამჯერადი ექსტრაქციით და, მისი რაოდენობის მიხედვით, ვმსჯელობდით ბიოდეგრადაციის ხარისხზე.

## 2.10. მონაცემების მათემატიკური დამუშავება

ნაშრომში წარმოდგენილი სიდიდეები წარმოადგენენ სამი გაზომვის საშუალო არითმეტიკულს; ფარდობითი ცდომილების მაქსიმალური მნიშვნელობაა 5%. მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა ფრიტცისა და შენკის მიხედვით [201].

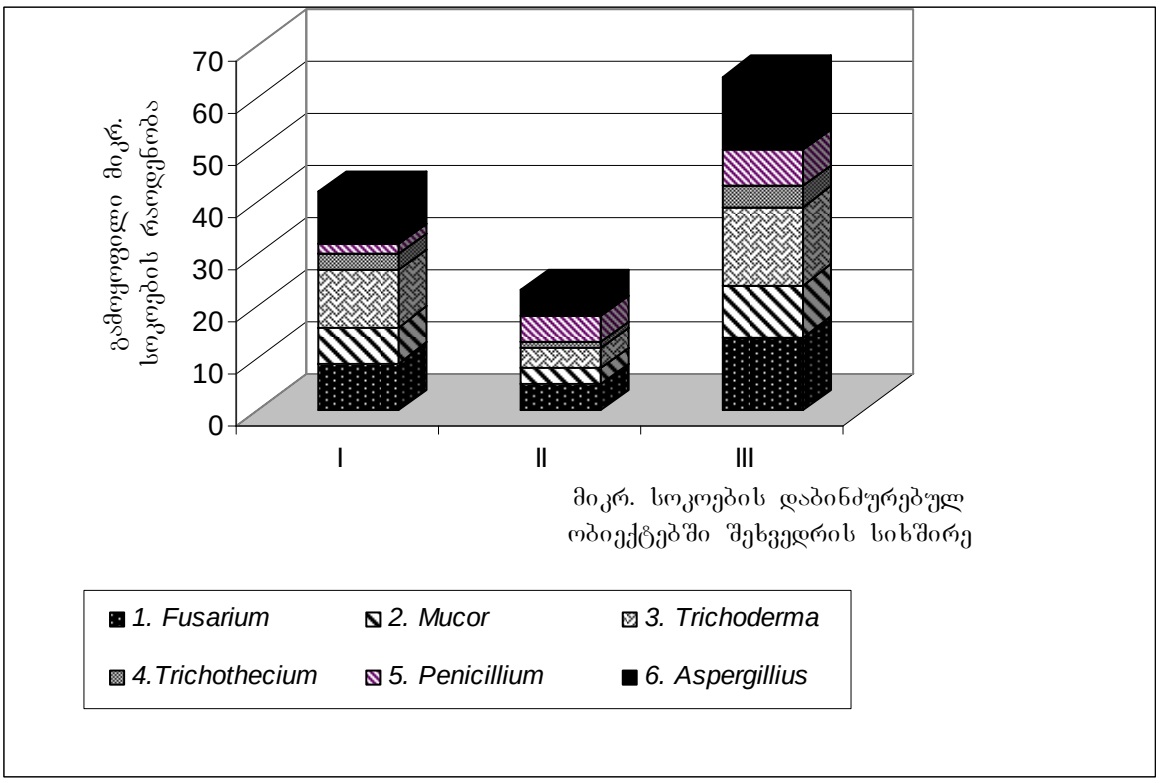
# თავი 3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

## 3.1. ორგანული ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი

ორგანული ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარის მქონე შტამების შერჩევის მიზნით საქართველოს სხვადასხვა რეგიონებიდან, ძირითადად სამხედრო პოლიგონების მიმდებარე ტერიტორიებიდან, და წარმოების ნარჩენი წყლებიდან – გამოვყავით მიკროსკოპული სოკოების 65 კულტურა.

გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებში დადგენილია დომი-ნანტური გვარები. კვლევების შედეგად მიღებული მონაცემები დაემთხვა ლიტერატურულ მონაცემებს [189]. კერძოდ, ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევებმა გვიჩვენა, რომ ამ ნიადაგებიდან და წარმოების ნარჩენი წყლებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის დომინირებს გვარები: *Fusarium, Mucor Aspergillus, Trichoderma*. შედარებით იშვიათად გვხვდებოდა *Penicillium* *და* *Trichothecium*-ის გვარები (ნახ. 1).

ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამების შერჩევის მიზნით, ვაწარმოეთ სოკოების ახლადგამოყოფილი 65 კულტურისა და დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული მიკროსკოპული სოკოების 22 შტამის სკრინინგი.




ნახ. 1. დაბინძურებული წყაროებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობა:

I. – პოლიგონების მიმდებარე ტერიტორიები

II. – საწარმოო ჩამდინარე წყლები

III. – გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების გვარების შეხვედრის სიხშირე

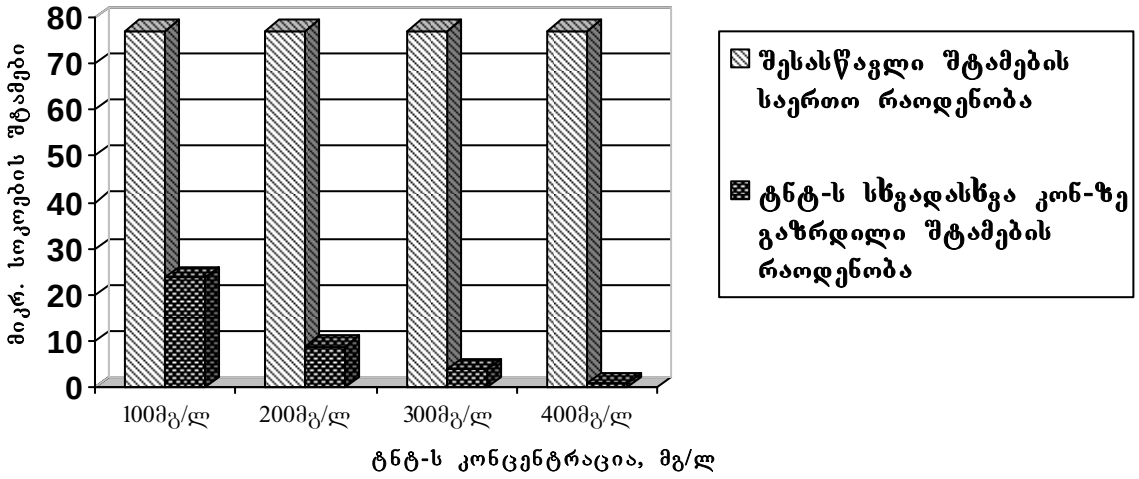
## 3.2. ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამების შერჩევა

აღსანიშნავია რომ ორივე შემთხვევაში (ახლად გამოყოფილი და კოლექციის კულტურები) დეტოქსიკაციის მაღალი უნარით გამო-ირჩეოდნენ *Aspergillus, Trichoderma, Mucor*-ის გვარის წარმო-მადგენლები.

თავდაპირველად სკრინინგი მიმდინარეობდა ჩაპეკის მყარ მოდიფიცირებულ არეზე [13], სადაც ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ შეტანილი იყო ტნტ სხვადასხვა კონცენტრაციებით [100 მგ/ლ; 200

მგ/ლ; 300 მგ/ლ, 400 მგ/ლ. (ეს არის ნიადაგში არსებულ დასაშვებ კონცენტრაციაზე მეტი). ჩასათეს მასალად აღებული იყო მყარ საკვებ არეზე 10 დღის განმავლობაში $30^0$C ტემპერატურაზე გაზრდილი კულტურების კონიდიების სუსპენზია. პეტრის თასები თავსდებოდა თერმოსტატში 25-$30^0$C ტემპერატურაზე 10 დღის განმავლობაში. გაზრდილი მიკროსკოპული სოკოების აღწერა წარმოებდა მე-3, 5, 7 და მე-10 დღეს. მიკროსკოპული სოკოების მიერ 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის უტილიზაციის უნარი ფასდებოდა კულტურების ზრდის ინტენსივობის მიხედვით ვიზუალურად სამბალიანი სისტემით.

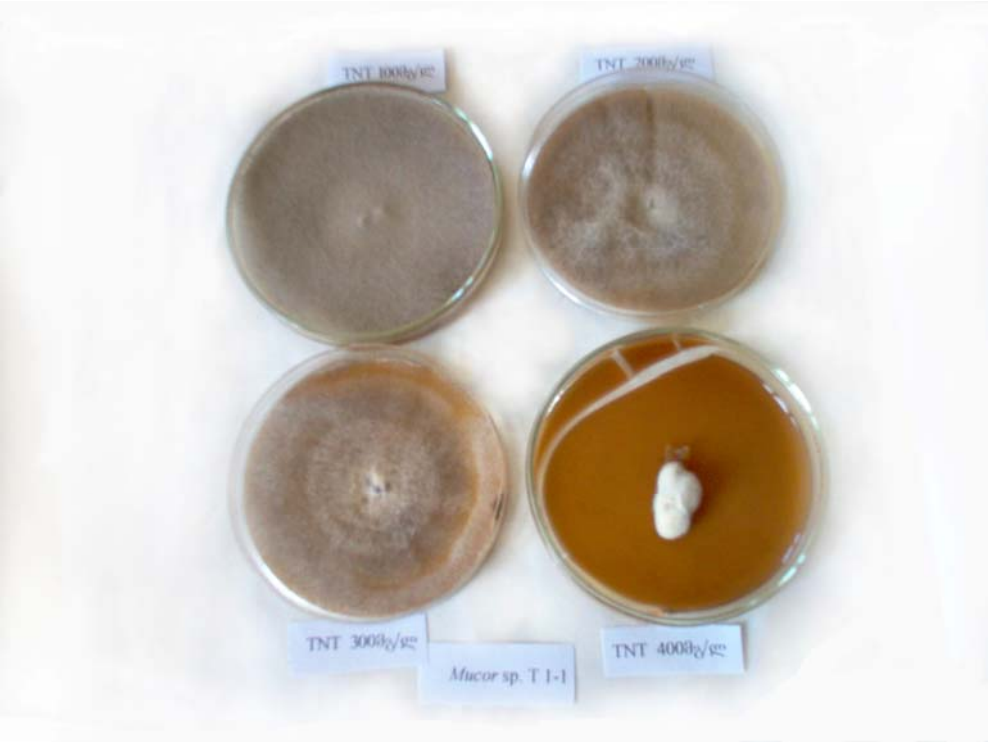
ჩატარებული კვლევების შედეგად აღმოჩნდა, რომ 24 კულტურა კარგად იზრდება ტნტ-ს დაბალ კონცენტრაციაზე (100 მგ/ლ), 9 კულტურა 200 მგ/ლ-ზე, 4 კულტურა გაიზარდა მაღალ კონცენტრაციაზე (300მგ/ლ) და მხოლოდ 1 კულტურა გაიზარდა 400 მგ/ლ კონცენტრაციაზე (ნახ 2).



ნახ. 2 ტნტ-ს სხვადასხვა კონცენტრაციების შემცველ საკვებ არეებზე მზარდი მიკროსკოპული სოკოების რაოდენობა

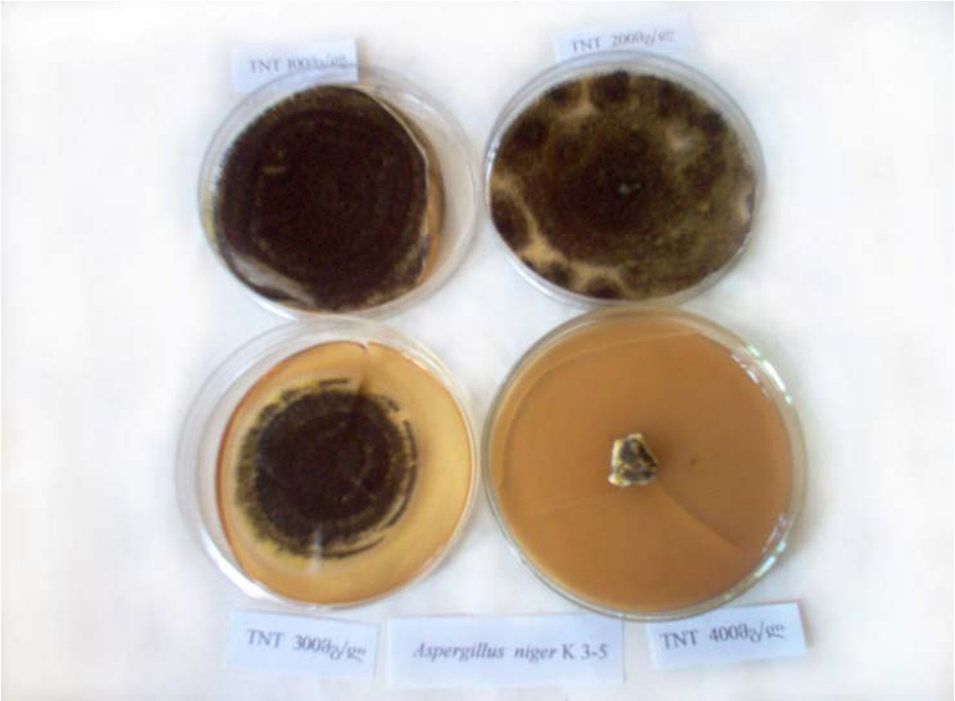
სურ. 5. ***Trichoderma* sp. N2-6**-ის ზრდა ტნტ-ს სხვადასხვა კონცენტრაციებზე

**სურ. 6. *Trichoderma* sp. N2-6-ის ზრდა ტნტ-ს 400მგ/ლ კონცენტრაციაზე**

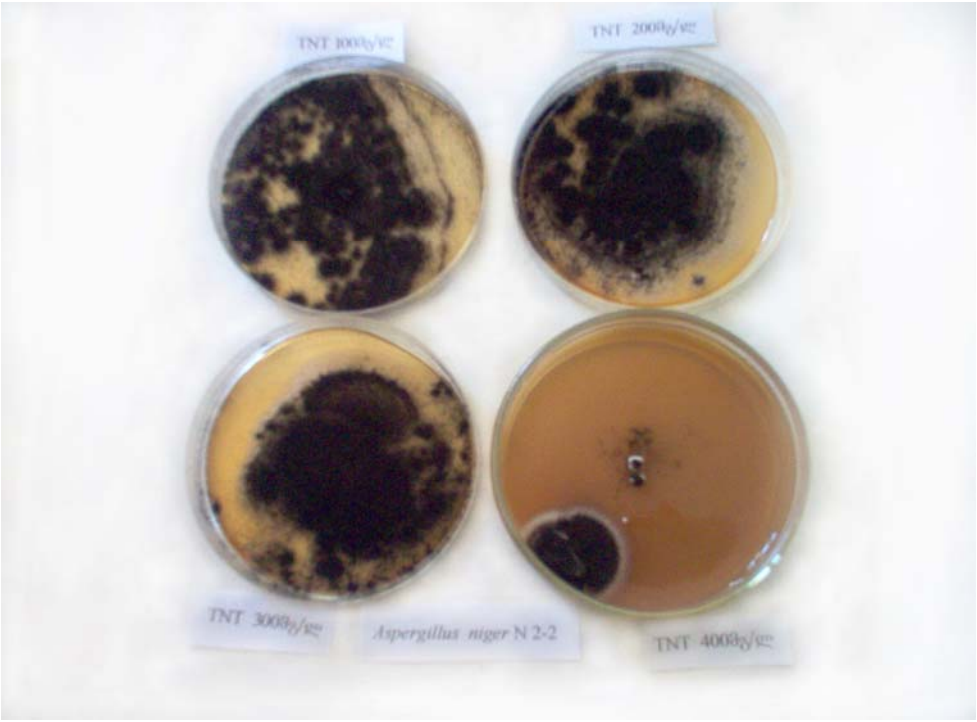



**სურ. 7. *Mucor* sp. T1-1-ის ზრდა ტნტ-ს სხვადასხვა კონცენტრაციებზე**

სურ. 8. ***Mucor* sp. T1-1**-ის ზრდა ტნტ-ს 400 მგ/ლ კონცენტრაციაზე




სურ. 9. ***Aspergillus niger* K3-5**-ის ზრდა ტნტ-ს სხვადასხვა კონცენტრაციებზე

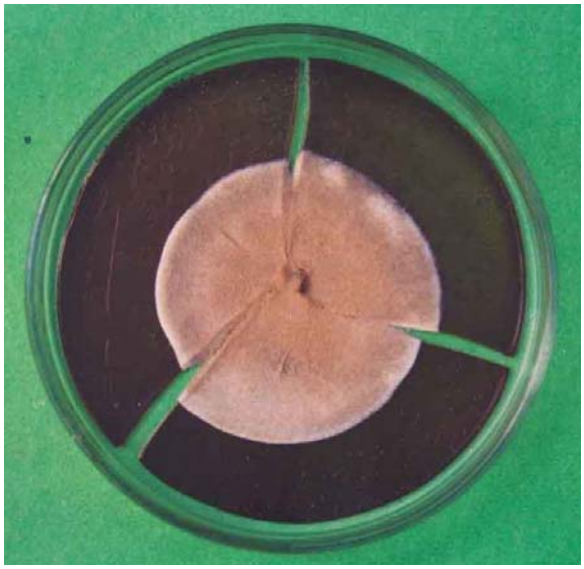


**სურ. 10. *Aspergillus niger* N2-2-ის ზრდა ტნტ-ს სხვადასხვა კონცენტრაციებზე**

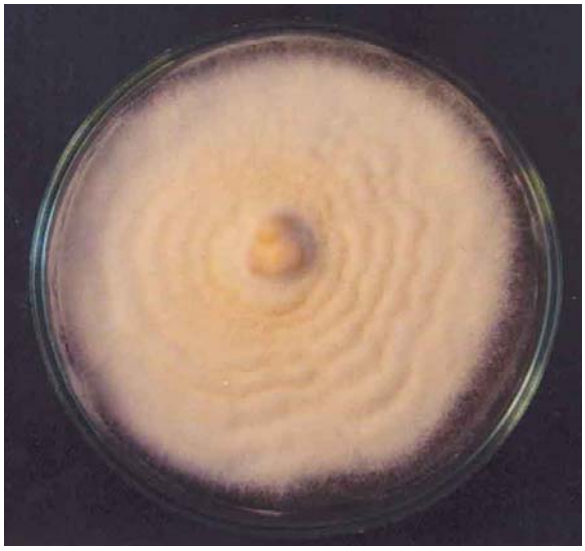
შემდეგი კვლევებისათვის არჩევანი გავაკეთეთ შემდეგ ოთხ კულტურაზე: *Mucor* sp. T1-1, *Aspergillus niger* K3-5, *Trichoderma* sp. N2-6, *Aspergillus niger* N2-2, რომლებიც ტნტ-ს მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას ხასიათდებოდნენ კარგი ნაზრდით. უკანასკნელი წლების ლიტერატურული მონაცემებით სწორედ მიკროსკოპული სოკოების ამ გვარის კულტურები ხასიათდებიან ტნტ-ს დეტოქსიკაციის უნარით [13, 177 ].

შერჩეული შტამების მორფოლოგიური თვისებები 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის კონცენტრაციის მომატებისას იცვლებოდა შემდეგნაირად: კულტურა *Mucor* sp. T1-1-ის შემთხვევაში ბამბისებრი კოლონია თანდათან გარდაიქმნა ტყავისებრ კოლონიად. კულტურა *Fusarium monoliforma* S2-6-ის კოლონიას, ტნტ-ს მაღალი კონცენტრაციისას, წარმოექმნა წრიული რგოლები (საფიქრებელია წარმოიქმნა ინდუცირებული მუტაცია), პიგმენტაცია იყო მკვეთრი, *Aspergillus niger* K3-5-ისა და *Trichoderma viride* N1-9-ის კულტურების კოლონიების ზრდა შეფერხებული იყო, თუმცა ორივე შემთხვევაში ფერი და სპორომატარებლობა შენარჩუნებული ჰქონდათ. (სურ. 11-18)

***Mucor***



***Fusarium***



***Aspergillus***

***Trichoderma***

სურ. 11-18. მიკტოსკოპული სოკოების მორფოლოგიური თვისებების ცვლილება ტნტ-ს კონცენტრაციის მომატებისას.

## 3.3. მიკროსკოპული სოკოების ზრდა არომატული ბირთვის მქონე ორგანულ ტოქსიკანტებზე

შემდეგ ეტაპზე გამოვავლინეთ ის კულტურები, რომლებიც არომატული ბირთვის მქონე სხვა ტოქსიკური კანცეროგენული ნივთიერების – ბენზ(α)პირენის მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას ხასიათდებოდნენ კარგი ნაზრდით. საკვები არეების შემადგენლობაში ნახშირბადის წყაროდ შეტანილი იყო ბენზ(α)პირენი-50მგ/ლ ბენზ(α)პირენის შემცველ არეებზე კარგი ნაზრდით გამოირჩეოდა სამი კულტურა: *Mucor* sp. T1-1; *Trichoderma* sp. N2-6, *Aspergillus .niger* N2-2.

ასევე ჩავატარეთ სოკოების კულტურების ზრდის მიხედვით სკრინინგი ორთოდიქლორბენზოლის შემცველ საკვებ არეებზე. შემოწმებული იქნა ორთოდიქლორბენზოლის ორი კონცენტრაცია 0.01M და 0.1M. კულტურების კულტივირება ასევე ხდებოდა ჩაპეკის და უნივერსალურ არეზე, რომელსაც დამატებული ჰქონდა ორთოდიქლორბენზოლი, ნახშირბადის სხვა წყაროსთან (გლუკოზა) ერთად (ვარიანტი 1), ასევე მის გარეშე (ვარიანტი 2). კულტურების ზრდა ფასდებოდა სამბალიანი სისტემით: + - სუსტი ზრდა, 2+ - საშუალო ზრდა, 3+ - კარგი ზრდა. ორივე არეზე შემოწმდა მიკროსკოპული სოკოს 24 კულტურა აღმოჩნდა, რომ ორთოდიქლორბენზოლის ზემოთ აღნიშნული კონცენტრაციები ვერ თრგუნავდა აღნიშნული კულტურების ზრდას არეებზე, სადაც შეტანილი იყო გლუკოზა, ხოლო ორთოდიქლორბენზოლის ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ არსებობის შემთხვევაში, გამოკვლეული მიკროსკოპული სოკოების მხოლოდ 6-მა კულტურამ

შეინარჩუნა ზრდის უნარი, აქედან 2 კულტურის: *Mucor* sp. T1-1, *Aspergillus niger* N2-2. ზრდა შეფასდა როგორც საშუალო. (ცხ. 1) ამ კულტურების გადათესვისას იმავე არეზე, რომელშიც ასევე ნახშირბადის ერთადერთი წყარო იყო ორთოდიქლორბენზოლი, მათი ზრდის ინტენსივობა არ შესუსტებულა (ცხრ. 1).

**ცხრილი 1**

**მიკ.როსკოპული სოკოების კულტყრების ზრდა ორთოდიქლორბენზოლის და ბენზ(*α*)პირენის შემცველ არეებზე**

| საკვები არეები | კულტურა | ზრდის ინტენსივობა | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ბენზ(α)პირენი 200მგ/ლ | ორთოდიქლორ-ბენზოლი | |
| | | | 0,01 M | 0,1 M |
| უნივერსალური არე | *Mucor* sp.T1-1 | +++ | ++ | ++ |
| | *Mucor* sp.Sh 6-3 | ++ | ++ | + |
| | *Trichoderma viride* N1-9 | ++ | + | - |
| | *Trichoderma* sp.N2-6 | +++ | + | + |
| | *Trichotecium* sp.S1-6 | ++ | ++ | + |
| | *Penicillium* sp.N-2 | + | + | - |
| | *Aspergillus niger* N2-2 | +++ | ++ | + |
| | *Aspergillus niger* K3-5 | ++ | + | + |
| | *Fusarium monoliforma* S2-6 | + | + | - |
| ჩაპეკის არე | *Mucor* sp.T1-1 | +++ | ++ | + |
| | *Mucor* sp. Sh 6-3 | ++ | ++ | + |
| | *Trichoderma viride* N1-9 | ++ | + | - |
| | *Trichoderma* sp.N2-6 | +++ | ++ | + |
| | *Trichotecium sp.* S1-6 | ++ | ++ | + |
| | *Penicillium* sp. N-2 | + | + | - |
| | *Aspergillus niger* N2-2 | +++ | ++ | + |
| | *Aspergillus niger* K3-5 | ++ | + | + |
| | *Fusarium monoliforma* S2-6 | + | + | - |

ამრიგად, აღმოჩნდა რომ, ყველა გამოცდილი ტოქსიკანტის საუკეთესო დესტრუქტორ შტამებს წარმოადგენენ ერთი და იგივე კულტურები, რომლებიც მომავალში შესაძლებელია გამოყენებული იქნენ სხვა არომატული ბირთვის მქონე ტოქსიკური კანცეროგენური ნივთიერებების (ქლორირებული ფენოლი, ქლორირებული დიბენზო-დიოქსინები) დეტოქსიკაციისათვის.

ასევე ჩავატარეთ სკრინინგი არეებზე, სადაც ტნტ წარმოადგენდა ნახშირბადის, აზოტის ან ორივე ელემენტის ერთადერთ წყაროს ერთდროულად (ცხრილი 2). მიღებული შედეგები მოწმობს, რომ მიკროსკოპული სოკოებიდან *Trichoderma viride* N1-9 და *Fusarium monoliforma* S2-6 იზრდება უკეთ, როცა ტნტ წარმოადგენს ნახშირბადის წყაროს, ხოლო *Aspergillus niger* K3-5 ტოქსიკანტს იყენებს აზოტის წყაროდ. ორივე ელემენტს ტნტ-ს მოლეკულიდან უფრო ეფექტურად იყენებს კულტურა *Mucor* sp. Sh 6-3.

## ცხრილი 2

## სელექციურად შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების ზრდა ტნტ-ს (200 მგ/ლ) შემცველ არეებზე

| საკვები არე | კულტურის დასახელება ან პირობითი ნომერი | არეში ნახშირბადისა და აზოტის წყაროს არსებობა | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ტნტ + ნახშირ-ბადის წყარო | ტნტ + აზოტის წყარო | ტნტ + ნახშირბა-დისა და აზოტის წყარო | მხოლოდ ტნტ |
| ჩაპეკის არე | *Trichoderma viride* N1-9 | ++ | + | ++ | + |
| | *Mucor* sp.Sh 6-3 | ++ | ++ | +++ | ++ |
| | *Trichoderma* sp.N2-6 | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | *Trichotecium sp.* S1-6 | + | + | ++ | + |
| | *Penicillium* sp. N-2 | + | + | + | - |
| | *Aspergillus niger* N2-2 | ++ | +++ | +++ | ++ |
| | *Aspergillus niger* K3-5 | ++ | ++ | +++ | ++ |
| | *Fusarium monoliforma* S2-6 | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | *Mucor* sp.T1-1 | +++ | ++ | +++ | ++ |

## 3..4. ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილირების უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენა

გარემოში მიკროორგანიზმების ზრდა-განვითარებაზე დიდ გავლენას ახდენს გარემო პირობები. ხელსაყრელი პირობები ხელს უწყობენ მიკროორგანიზმების სწრაფ ზრდას და მათი ცხოველ-მოქმედების მაქსიმალურ გამოვლენას, ხოლო არახელსაყრელი პირობები იწვევენ მათი განვითარების შეზღუდვას, თვისებების შეცვლას და სიკვდილს. სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორებიდან ჩვენ შევისწავლეთ ტემპერატურის, pH-სა და NaCl-ის სხვადასხვა კონცენტრაციების გავლენა ორგანული ტოქსიკანტების დესტრუქტორი შტამების ზრდა-განვითარებაზე და დავადგინეთ მათი განვითარების ოპტიმალური პირობები.

ვინაიდან მიკროორგანიზმების, ამ შემთხვევაში მიკროს-კოპული სოკოების, ზრდის რეგულაციისა და ფიზიოლოგიური აქტიურობისათვის ტემპერატურა ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორია, კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენის მიზნით, პირველ რიგში, შევისწავლეთ ტემპერატურის გავლენა კულტურების ზრდა-განვითარებაზე.

ოპტიმალური ტემპერატურის დასადგენად აღნიშნულ კულ-ტურებს ვზრდიდით 5-55$^0$C-მდე, 5$^0$C-ის ინტერვალით – საწყის მყარ აგარიზირებულ საკვებ არეზე.

ნაზრდს ვაფასებდით კულტურალურ-მორფოლოგიურ თვისებებზე დაყრდნობით, აღწერას ვაწარმოებდით მე-3, მე-5, მე-7 და მე-10 დღეს.

ტემპერატურის ოპტიმუმად მიღებული იყო სოკოების კულტურების მაქსიმალური ნაზრდი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის ზომითა და ზრდის სიჩქარით [42]. მხედველობაში მიიღებოდა ის ფაქტი, რომ ლაბორატორიულ პირობებში მიკროორგანიზმების მაქსიმალური ზრდის სიჩქარე არის უფრო მაღალ ტემპერატურაზე, ვიდრე ბუნებრივ პირობებში (სოკოების გამოყოფის ადგილი).

კრიტიკულ ტემპერატურასთან მიახლოვებისას სოკოს მორფოლოგიური და ფიზიოლოგიური თვისებები მნიშვნელოვნად იცვლებოდა.

სხვადასხვა გვარის სოკოები განსხვავებულად რეაგირებდნენ ტემპერატურის ცვალებადობაზე. $40^0$C–ზე მაღლა *Trichoderma*-ს გვარის კულტურებს შეემჩნეოდათ სპორების დეგენერაცია, *Mucor*-ის ზოგიერთ სახეობას დაბალი ტემპერატურას დროს ბამბისებრი მიცელიუმი ტყავისებრი უხდებოდა, *Aspergillus*-ის რამდენიმე წარმომადგენელს ეზღუდებოდა სპორების შერწყმა. მიკროსკოპულ სოკოების ასეთი კულტურალურ-მორფოლოგიური ცვლილებები გამოწვეული ტემპერატურის ცვალებადობით მრავალი ავტორის მიერ არის აღწერილი [181, 23].

ცხრილი 3

## ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილირების უნარის მქონე კულტურების ზრდა-განვითარება სხვადასხვა ტემპერატურაზე

| კულტურა | ტემპერატურის დიაპაზონი, რიმელშიც იზრდება კულტურა, $^0$C | ზრდის ოპტიმალური ტემპერატუ-რა, $^0$C | კულტურის დახასიათება |
|---|---|---|---|
| *Mucor* sp.T1-1 | $15^0$-$50^0$C | $40^0$-$45^0$C | თერმოფილი |
| *Mucor* sp. Sh 6-3 | $15^0$-$50^0$C | $40^0$C | თერმოტოლე-რანტი |
| *Trichoderma viride* N1-9 | $15^0$-$35^0$C | $25^0$-$30^0$C | მეზოფილი |
| *Trichoderma* sp.N2-6 | $15^0$-$35^0$C | $25^0$-$30^0$C | მეზოფილი |
| *Trichotecium sp.* S1-6 | $25^0$-$55^0$C | $40^0$-$45^0$C | თერმოფილი |
| *Penicillium* sp. N-2 | $15^0$-$35^0$C | $25^0$-$30^0$C | მეზოფილი |
| *Aspergillus niger* N2-2 | $20^0$-$45^0$C | $30^0$-$35^0$C | თერმოტოლე-რანტი |
| *Aspergillus niger* K3-5 | $15^0$-$45^0$C | $30^0$-$35^0$C | თერმოტოლე-რანტი |
| *Fusarium monoliforma* S2-6 | $5^0$-$25^0$C | $20^0$-$25^0$C | ფსიქროფილი |

ორგანული ტოქსიკანტების დაშლის უნარის მქონე მიკროსკოპული სოკოს 9 კულტურას შორის შერჩეულია 2 თერმოფილი კულტურა, 1 ფსიქროფილი და 3 თერმოტოლერანტი კულტურა. თერმოფილებს შორის წარმოდგენილია გვარი *Mucor*-ისა და *Trichothecium*-ის კულტურები. ფსიქროფილები ძირითადად არიან *Fusariumis*-ის გვარის კულტურები. (ცხ. 3) ეს მონაცემებიც დასტურდება ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით [13].

ვინაიდან ცნობილია, რომ არის მჟავიანობა და ტუტიანობა ის პარამეტრებია, რომლებიც განსაზღვრავენ მიკროორგანიზმების გავრცელებას ექსტრემალურ პირობებში, შემდეგ ეტაპზე სოკოების კულტურების ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენის მიზნით, შევისწავლეთ pH-ის გავლენა კულტურების ზრდა-განვითარებაზე. ოპტიმალური pH-ის დასადგენად აღნიშნულ კულტურებს ვზრდიდით pH-2,0 დან pH-10,0 მდე pH-0,5-ის ინტერვალით, საწყის საკვებ არეში. კულტურებისათვის აღებული იყო მათთვის ოპტიმალური ზრდის ტემპერატურა. pH-ის ოპტიმუმად მიღებული იყო სოკოების კულტურების მაქსიმალური ნაზრდი, რომელიც ისაზღვრებოდა კოლონიის დიამეტრის გაზრდითა და ზრდის სიჩქარით.

ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილაციის უნარის მქონე 9 კულტურას შორის შევარჩიეთ 2 ალკალიფილი, 2 ალკალიტოლერანტული და ერთი აციდოტოლერანტული კულტურა.

ალკალიფილებს შორის წარმოდგენილია *Mucor*-ისა და *Trichothecium*-ის გვარის მიკროსკოპული სოკოების კულტურები (ცხ. 4).

**ცხრილი 4**

**ორგანული ტოქსიკანტების ასიმილირების უნარის მქონე კულტურების ზრდა-განვითარება სხვადასხვა pH-ის მქონე არეებზე**

| კულტურა | pH დიაპაზონი, რიმელშიც იზრდება კულტურა | ზრდის ოპტიმალური pH | კულტურის დახასიათება |
|---|---|---|---|
| *1* | 2 | 3 | 4 |
| *Mucor* sp.T1-1 | pH 3,5-10,0 | pH 8,5 | ალკალიტოლერანტი |
| *Mucor* sp. Sh 6-3 | pH 4,5-11,0 | pH 9,0 | ალკალიფილი |
| *Trichoderma viride* N1-9 | pH 2,0-6,0 | pH 2,5 | აციდოტოლერანტი |
| *Trichoderma* sp.N2-6 | pH 3,0-7,5 | pH 6,0 | |
| *Trichotecium sp.* S1-6 | pH 4,0-11,0 | pH 9,5 | ალკალიფილი |
| *Penicillium* sp. N-2 | pH 2,0-9,0 | pH 5,5-6,0 | |
| *Aspergillus niger* N2-2 | pH 3,5-10,0 | pH 8,5 | ალკალიტოლერანტი |
| *Aspergillus niger* K3-5 | pH 2,5-9,0 | pH 5,5-6,0 | |
| *Fusarium monoliforma* S2-6 | pH 3,5-9,0 | pH 5,5-6,0 | |

ოსმოსური წნევის სხვადასხვა მნიშვნელობებზე მიკროსკოპული სოკოების ზრდის უნარის გამოსავლენად კულტურებს ვზრდიდით საწყის საკვებ არეზე, სადაც NaCl შეტანილი იყო სხვადასხვა კონცენტრაციით 0,5 M-დან – 4,0 M-მდე (შესაბამისად, 2,93% – 23,2%). კულტურების ზედაპირული კულტივირება წარმოებდა პეტრის თასებზე $30^0$C-ის პირობებში.

ცნობილია, რომ 25°C ტემპერატურაზე მიკროორგანიზმი, რომელსაც აქვს 4M NaCl-ის კონცენტრაციის პირობებში ზრდის უნარი, კლასიფიცირდება, როგორც მაღალტოლერანტული მარილის მიმართ, მაშინ, როცა 20°C-ის დროს იგი შეიძლება მიჩნეულ იქნეს ზომიერ ჰალოფილად [124]. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით სოკოების კულტურებს შორის 3 აღმოჩნდა ექსტრემალური ჰალოფილი. ეს კულტურები იზრდებოდნენ ისეთ საკვებ არეზე, რომელიც შეიცავდა 1M(6%)-დან 4M(23,2%)-მდე NaCl-ს, ხოლო ოპტიმალურ ზრდა-განვითარებას აღწევდნენ 3M(18%) NaCl-ის თანაობისას. ჰალოფილური კულტურები გამოირჩეოდნენ გამრავლების შენელებული ტემპითა და პოპულაციის დაბალი სიმკვრივით. 3 კულტურა მიეკუთვნა ზომიერ ჰალოფილს. ისინი 0,5 -დან 3 -მდე NaCl-ის თანაობისას იზრდებოდნენ და ზრდის ოპტიმუმი ჰქონდათ 2,5 M NaCl-ზე. აღსანიშნავია, რომ ჰალოფილური კულტურების უმრავლესობა *Aspergillus*-ისა და *Penicillium*-ის გვარების წარმომადგენლებია. ეს შედეგი დასტურდება ლიტერატურაში არსებული მონაცემებით [108].

NaCl-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად რიგმა კულტურებმა მკვეთრი მორფოლოგიური ცვლილებები განიცადეს, რაც პიგმენტაციის, კონსისტენციის, კოლონიების ფორმის, ჰიფების

სიმაღლის და სხვა ცვლილებებში გამოიხატა. ეს ცვლილებები უფრო ნაკლებად *Aspergillus*-ის გვარის წარმომადგენლებში გამომჟღავნდა.

**ცხრილი 5**

**მიკროსკოპული სოკოების კულტურების ზრდა-განვითარება NaCl-ის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე**

| კულტურა | NaCl-ის კონცენტრაციები, სადაც იზრდება კულტურა | NaCl-ის ოპტიმალური კონცენტრაცია | კულტურის დახასიათება |
|---|---|---|---|
| *Mucor* sp.T1-1 | 0,5M-3 M | 2,5M | არაჰალოფილი |
| *Mucor* sp. Sh 6-3 | 0,5M-2,5M | 2M | ზომიერი ჰალოფილი |
| *Trichoderma viride* N1-9 | 0,5M-2,5M | 1,5M | არაჰალოფილი |
| *Trichoderma* sp. N2-6 | 0,5M-3 M | 2,5M | ზომიერი ჰალოფილი |
| *Trichotecium sp.* S1-6 | 1M-4 M | 3M | ექსტრემალური ჰალოფილი |
| *Penicillium* sp. N-2 | 1M-4 M | 3M | ექსტრემალური ჰალოფილი |
| *Aspergillus niger* N2-2 | 1M-4 M | 3M | ექსტრემალური ჰალოფილი |
| *Aspergillus niger* K3-5 | 0,5M-3 M | 2,5M | ზომიერი ჰალოფილი |
| *Fusarium monoliforma* S2-6 | 0,5M-2,5M | 2M | არაჰალოფილი |

ამრიგად, ჩატარებული კვლევის შედეგად დადგენილია დეტოქსიკაციის უნარის მქონე კულტურების ექსტრემოფილური თვისებები.

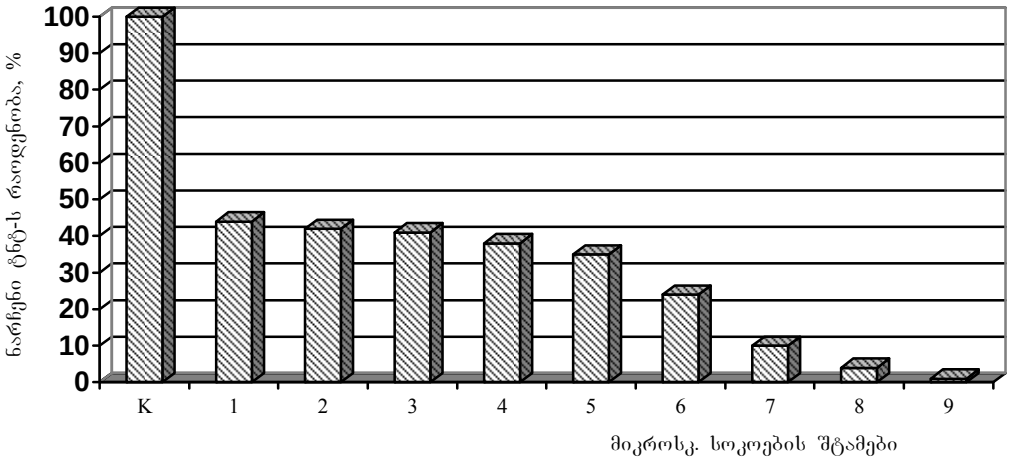
## 3.5. შერჩეული კულტურების მიერ ასიმილირებული და დეგრადირებული ტნტ-ს რაოდენობრივი შეფასება

ამ კვლევებისათვის ავიღეთ ის 9 კულტურა, რომლებიც ტნტ-ს მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას ხასიათდებოდნენ საშუალო და კარგი ნაზრდით. ეს კულტურებია: *Mucor* sp. T1-1, *Trichoderma sp.* N2-6, *Aspergillus niger* N2-2; *Aspergillus niger* K3-5, *Mucor* sp. Sh 6-3, *Trichoderma viride* N1-9, *Trichotecium sp.* S1-6, *Penicillium* sp. N-2, *Fusarium monoliforma* S2-6.

მიკროსკოპული სოკოებს ვზრდიდით თხევად არეში [14], ჩასათეს მასალად აღებული იყო 10-დღიანი კულტურების კონიდიების სუსპენზია.

დესტრუქტორი შტამების სკრინინგისას მყარ არეში ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ შეგვქონდა 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლი, ხოლო თხევად არეში შერჩეული შტამების გააქტიურების მიზნით ტნტ-სთან ერთად ნახშირბადის წყაროს – გლუკოზას ვამატებდით. აღსანიშნავია, რომ უკვე შერჩეული შტამების ზრდა-განვითარებისათვის მყარ არეში ნახშირბადის წყაროდ მხოლოდ გლუკოზაა შეტანილი.სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა 750 მლ-იან ერლენ-მეიერის კოლბებში, სანჯღრეველაზე 200 ბრ/წთ, ოპტიმალურ ტემპერატურაზე, 72სთ-ის განმავლობაში. კულტურალურ ხსნარში დარჩენილი ტნტ-ს რაოდენობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრიული მეთოდით 447 ნმ-ზე, ძლიერ ტუტე გარემოს (pH>11) თანაობისას. ტნტ-ს რაოდენობის 100%-ად ვთვლიდით შესაბამისს საკვებ არეს 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლით, სადაც არ იყო ჩათესილი კულტურა. კონტროლი იყო სუფთა საკვები არე.

ათვისებული ტნტ-ს რაოდენობით ვაფასებდით მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს ბიოგარდაქმნის უნარს. მიღებული შედეგები მოცემულია მე-3 ნახაზზე.




**ნახ. 3. ტნტ-ს ბიოტრანსფორმაციის უნარის მქონე შტამები:**

**K – კონტროლი 100%**
**1. *Trichoderma viride* N1-9**
**2. *Trichotecium sp.* S1-6**
**3. *Mucor* sp. Sh 6-3**
**4. *Penicillium* sp. N-2**
**5. *Fusarium monoliforma* S2-6**
**6. *Aspergillus niger* K3-5**
**7. *Aspergillus niger* N2-2**
**8. *Trichoderma* sp.N2-6**
**9. *Mucor* sp.T1-1**

ნახ. 3-დან ჩანს, რომ ტრინიტროტოლუოლი მაქსიმალურად აითვისა მიკროსკოპული სოკოს 2 შტამმა *Trichoderma sp.* N2-6 და *Mucor* sp. T1-1, კარგად შტამებმა: *Aspergillus niger* N2-2 *Aspergillus niger* K3-5. შედარებით ნაკლებად დანარჩენმა 5 კულტურამ.

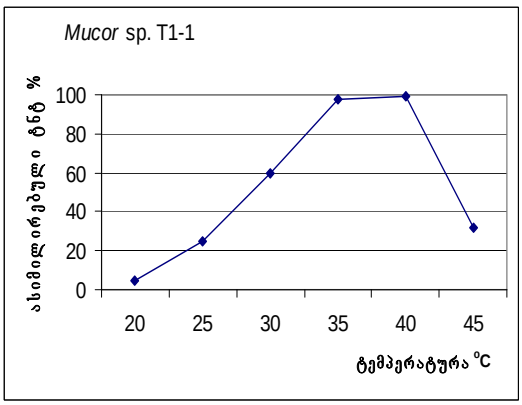
ამდენად, ტნტ-ს ბიოტრანსფორმაციის უნარით გამოირჩევიან სწორედ ის შტამები, რომლებიც ამ ტოქსიკანტის მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას გამოირჩეოდნენ საუკეთესო ნაზრდით. აღსანიშნავია რომ, ეს 4 შტამი გამოყოფილია დაბინძურებული ნიადაგებიდან და მათი შედარებით მაღალი მადეგრადირებელი

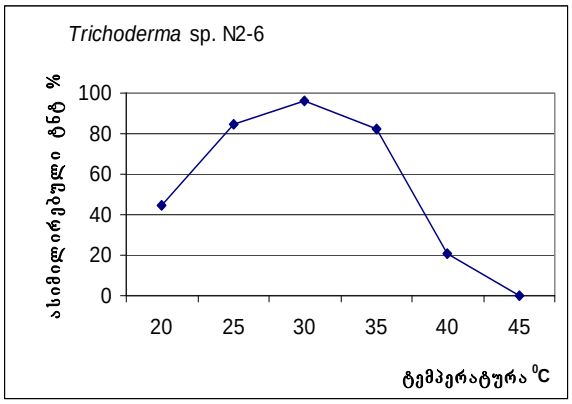
უნარი შეიძლება აიხსნას ადაპტაციით ტოქსიკანტის შემცველ გარემოში არსებობასთან.

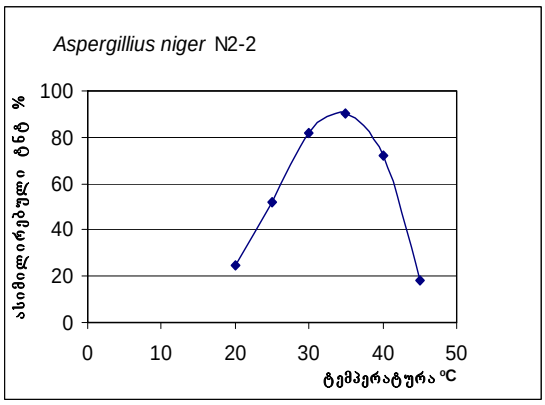
## 3.6. ტნტ-ს დესტრუქტორი შტამების კულტივირების პირობების დადგენა

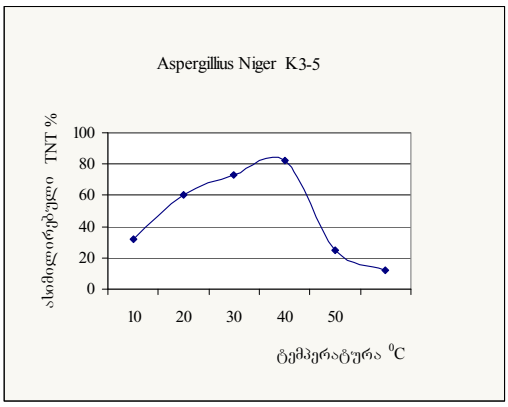
მიკროორგანიზმების მეტაბოლური აქტივობა მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული კულტივირების პირობებზე. ამიტომ შევისწავლეთ და დავადგინეთ ტნტ-ს მადეგრადირებელი მაღალაქტიური შტამებისთვის ოპტიმალური ტემპერატურა, pH და კულტივირების ხანგრძლივობა.

შერჩეული შტამების*: Aspergillus niger* K3-5, *Mucor* sp. T1-1, *Trichoderma sp.* N2-6, *Aspergillus niger* N2-2 სიღრმულ კულტივირებას ვაწარმოებდით შესაბამისი ზრდის ტემპერატურული დიაპაზონის გათვალისწინებით, $20^0$C-დან $50^0$C-ტემპერატურამდე $5^0$C-ის ინტერვალით. შედეგები ნაჩვენებია მე-4-ე ნახაზზე.





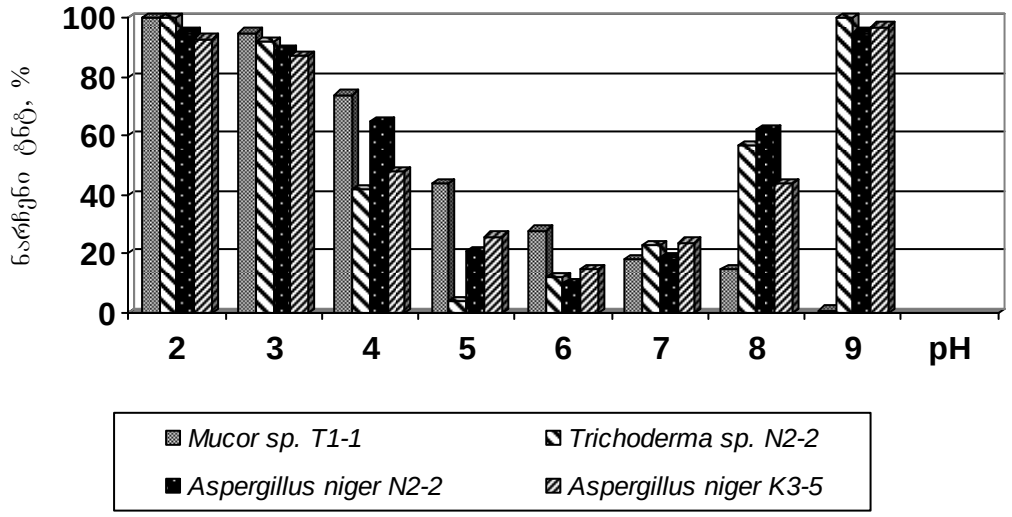

**ნახ. 4 მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს დეგრადაცია სხვადასხვა ტემპერატურაზე**

ნახაზების განხილვიდან ჩანს, რომ ტნტ-ს მაქსიმალური ბიოგარდაქმნა მიიღწევა მიკროსკოპული სოკოს შტამების - *Aspergillus niger* K3-5 და *Aspergillus niger* N2-2 კულტივირებისას $35^0$C ტემპერატურაზე, კულტურა. *Mucor* sp. T1-1 ტნტ-ს მაქსიმალურ რაოდენობას ითვისებს $40^0$C-ზე, ხოლო შტამი – *Trichoderma sp.* N2-6 $30^0$C ტემპერატურაზე.

მიკროორგანიზმების სიღრმული კულტივირებისას დიდი მნიშვნელობა აქვს ასევე საკვები არის pH-ს. მთელი ექსპერიმენტის მანძილზე მუდმივი მნიშვნელობის pH-ის დაჭერა შეუძლებელი იყო იმ მარტივი მიზეზის გამო, რომ მიკროორგანიზმები სასიცოცხლო პროცესში ყოველთვის ცვლიან საკვები არის pH-ს.

ოპტიმალური pH-ის დადგენის მიზნით შერჩეულ დესტრუქტორ შტამებს, მათი ალკალი და აციდოფილობის გათვალისწინებით, ვზრდიდით საწყის თხევად საკვებ არეში, სადაც pH–ს ვცვლიდით 2-დან 9-მდე. კულტივირებას ვაწარმოებდით თითოეული შტამისათვის

შესაბამის ოპტიმალურ ტემპერატურაზე. შედეგები ნაჩვენებია მე-5-ე ნახაზზე.




**ნახ. 5. ტნტ-ს გარდაქმნა მიკროსკოპული სოკოების მიერ სხვადასხვა pH-ის პირობებში**

მე-5-ე ნახაზიდან ჩანს, რომ მიკროსკოპული სოკოს შემდეგი შტამები *Aspergillus niger* K3-5 და *Aspergillus niger* N2-2 მაქსიმალურად გარდაქმნიან ტნტ-ს pH 6-ზე, ხოლო კულტურა – *Mucor* sp.T 1-1 თითქმის 100%-ით შლის ტნტ-ს pH 9ზე, *Trichoderma sp.* N2-6 კი pH 5-ზე.

## 3.7. მიკროსკოპული სოკოების კულტივირების ხანგრძლივობის შესწავლა

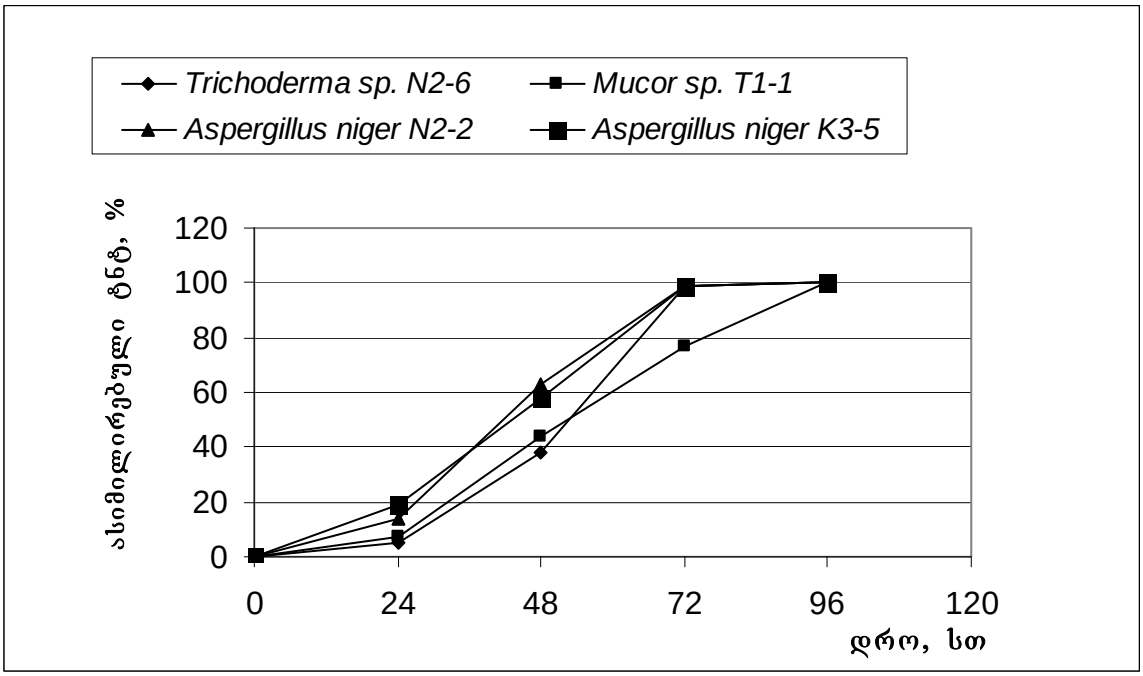
კულტივირების ხანგრძლივობის შესწავლის მიზნით მიკროსკოპულ სოკოებს ვზრდიდით თხევად საკვებ არეში ერლენ-მეიერის კოლბებში, სადაც ტნტ შეგვქონდა 30მგ 100მლ-ში.

სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა თერმოსტატირებულ სანჯღრევალაზე (200 ბრ/წთ), 30, 35 და $40^0$C ტემპერატურებზე (იმის

მიხედვით რომელი შტამისთვის რომელია ოპტიმალური ტემპერატურა).

ყოველი 24 საათის შემდეგ აღნიშნული შტამების კულტურალურ ხსნარში ხდებოდა ტნტ-ს რაოდენობრივი ცვლილების განსაზღვრა.

მიღებული მონაცემების (ნახ. 6) ანალიზის საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ორი შტამი *Aspergillus niger* K3-5*, Aspergillus niger* N2-2 და *Trichoderma sp.* N 2-6 კულტივირების მესამე დღეს (72სთ) ახდენს ტნტ-ს მაქსიმალური რაოდენობით ბიოტრანსფორმაციას, რაც შეეხება შტამს: *Mucor* sp.T1-1 კულტივირების ხანგრძლივობის ოპტიმუმია – 96 სთ.




**ნახ. 6 მოკროსკოპული სოკოების კულტურების მიერ ტნტ-ს ასიმილაციის დინამიკა**

ამრიგად, ტნტ-ს ასიმილაციისა და დეგრადაციის მქონე შტამებისთვის დავადგინეთ სიღრმული კულტივირების პირობები.

## 3.8. ტნტ-ს დეტოქსიკაციის შედეგად წარმოქმნილი პროდუქტების შესწავლა

ცნობილია, რომ ტნტ-ს პირველადი მიკრობული გარდაქმნა, ელექტრონების ნაკლებობის გამო, მიმდინარეობს აღდგენითი მექანიზმით, კერძოდ მიკროორგანიზმები ამ დროს ახდენენ ტნტ-ს ბოიტრანსფორმაციას შემდეგ მეტაბოლიტებად: აზოქსიტეტრა-ნიტროტოლუოლი, ამინოდინიტროტოლუოლი და ჰიდროქსილამინო-დინიტროტოლუოლი. მექანიზმი, რომლის მიხედვითაც სოკოები ახდენენ ამ ფეთქებადი ნივთიერების მინერალიზაციას არ არის ცნობილი [153, 177]. ჩვენს მიერ შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების მიერ ტნტ-ს გარდაქმნის სავარაუდო მექანიზმის ასახსნელად დავადგინეთ მათ მიერ [1-$^{14}$C]-ტრინიტროტოლუოლის ბიოგარდაქმნის პროდუქტები.

კვლევისათვის გამოვიყენეთ შტამები, რომლებიც გამოირ-ჩეოდნენ არარადიაქტიური ტნტ-ს უტილიზაციის მაღალი უნარით.

როგორც მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა სხვადსხვა გვარის მიკროსკოპული სოკოების კულტურები [1-$^{14}$C]ტნტ-ს ასიმილაციას განსხვავებული ინტენსივობით ახდენენ. 5-დღიანი ექსპოზიციის პირობებში შეთვისებული [1-$^{14}$C]ტნტ-ს რადიოაქტიურობის თითქმის

ნახევარზე მეტი შესწავლილი შტამების ბიომასაში რჩება. შედეგები მოცემულია მე-6-ე ცხრილში.

**ცხრილი 6**

**ბიომასაში გადასული (1-$^{14}$C)-ტნტ-ს რაოდენობა, %.**

| კულტურის დასახელება | საკვები არე | ბიომასა, მგ | ბიომასის რადიოაქტიურობა, %, შეტანილი რადიოაქტიურო-ბიდან |
|---|---|---|---|
| *Mucor sp.*T1-1 | ჩაპეკის არე | 29 | 53,6 |
| *Trichoderma sp.* N2-6 | ჩაპეკის არე | 25 | 51,9 |
| *Aspergillus niger* N2-2 | ჩაპეკის არე | 27 | 52,9 |

(1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის შედეგად მიღებული ძირითადი პროდუქტების კვლევა გავაგრძელეთ კულტურალურ სითხეში. კერძოდ, ქაღალდის ქრომატოგრაფიის მეთოდის საშუალებით დავადგინეთ ხსნადი კომპონენტების ფრაქციათა რაოდენობა %-ში ჯამური აქტივობიდან.

შედეგები მოცემულია მე-7-ე ცხრილში.

**ცხრილი 7**

**(1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის ძირითადი პროდუქტები კულტურალურ სითხეში**

| შტამის დასახელება | რადიოაქტიურობა, %, დაბალმოლეკულური ნაერთების ფრაქციათა ჯამური აქტივობიდან | |
|---|---|---|
| | ორგანული მჟავები | ამინომჟავები |
| *Mucor sp.*T1-1 | 72,2 | 27,8 |
| *Trichoderma sp.* N2-6 | 77,4 | 22,6 |
| *Aspergillus niger* N2-2 | 94.8 | 5.2 |

როგორც 6-7 ცხრილებიდან ჩანს, აღნიშნული შტამების მიერ შეთვისებული ტნტ-ს ნახშირბადოვანი ჩონჩხი ბიოტრანსფორმაციას განიცდის. ტნტ-ს გარდაქმნის ძირითადი პროდუქტებს წარმოადგენს ორგანული მჟავები და ამინომჟავები. მიკროსკოპული სოკოების მიერ შეთვისებული და გარდაქმნილი [1-$^{14}$C]ტნტ-ს ნახშირბადატომები ძირითადად ორგანული მჟავების სინთეზში მონაწილეობენ. კულტურალური სითხიდან გამოყოფილია ორგანული მჟავებისა (70-90%) და ნაწილობრივ ამინომჟავების (10-30%) რადიოაქტიური ფრაქციები.

ქაღალდის ქრომატოგრაფიის ცნობილი მეთოდების გამოყენებით [203] მოვახდინეთ ამ ნივთიერებების დაყოფა ცალკეულ ფრაქციებად და დავადგინეთ თითოეული ნაერთის რადიოაქტიურობა. განვსაზღვრეთ პროცენტულად რადიოაქტიურობის განაწილება თითოეულ წარმოქმნილ ორგანულ მჟავაში. [1-$^{14}$C] ტნტ-ს რადიოაქტიური ნიშნული უმეტესად აღმოჩენილია ფუმარისა და ქარვის მჟავებში. ცნობილია, რომ ფუმარის მჟავა ბენზოლის ბირთვის ბიოტრანსფორმაციის ერთ-ერთ პროდუქტს წარმოადგენს და ის ადვილად გარდაიქმნება ქარვის მჟავად.

მიღებული შედეგები მოცემულია მე-8-ე ცხრილში.

ცხრილი 8

## მიკროსკოპული სოკოების მიერ (1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის შედეგად წარმოქმნილი ძირითადი რადიოაქტიური ორგანული მჟავები

| შტამის დასახელება | ორგანული მჟავების რადიაქტიული ფრაქცია, % დაბალმოლეკულური ნაერთების ფრაქციის ჯამური აქტივობიდან | რადიოაქტიურობის განაწილება ორგანულ მჟავებში, %, (ორგანული მჟავების ჯამური ფრაქციის საერთო რადიოაქტიურობიდან) |
|---|---|---|
| *Mucor sp.*T1-1 | 72,2 | 1. ფუმარის მჟავა 86,6<br>2. ქარვის მჟავა 4,1<br>3. გლიკოლის მჟავა 2,8<br>4. ლიმონმჟავა 2,7<br>5. ვაშლის მჟავა 1,8<br>6. X 2 |
| *Trichoderma sp.* N2-6 | 77,4 | 1. ფუმარის მჟავა 91,8<br>2. ქარვის მჟავა 4<br>3. გლიკოლის მჟავა 1,5<br>4. ლიმონმჟავა 1,1<br>5. ვაშლის მჟავა 0,8<br>6. X 0,8 |
| *Aspergillus niger* N2-2 | 89,8 | 1. ფუმარის მჟავა 88,8<br>2. ქარვის მჟავა 3,3<br>3. გლიკოლის მჟავა 3,7<br>4. ლიმონმჟავა 1,2<br>5. ვაშლის მჟავა 0,7<br>6. X 2,3 |

X – გაუშიფრავი ორგანული მჟავა.

ასევე დავადგინეთ პროცენტულად რადიოაქტიურობის განაწილება თითოეულ წარმოქმნილ ამინომჟავაში. მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ამინომჟავებს შორის ჭარბობს არომატული ამინომჟავები. სამივე ნიმუშში რადიოაქტიურობის ყველაზე მაღალი

მაჩვენებლით გამოირჩეოდა ფენილალანინი, შემდეგ კი გლუტამინის მჟავა და ტიროზინი. შედეგები მოცემულია მე-9-ე ცხრილში.

**ცხრილი 9**

**მიკროსკოპული სოკოების მიერ (1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის ბიოტრანსფორმაციის შედეგად წარმოქმნილი ძირითადი რადიოაქტიური ამინომჟავები**

| შტამის დასახელება | ამინომჟავების რადიაქტიული ფრაქცია, % დაბალმოლეკულური ნაერთების ფრაქციის ჯამური აქტივობიდან | რადიოაქტიურობის განაწილება ამინომჟავებში, % (ამინომჟავების ჯამური ფრაქციის ასერთო რადიოაქტიურობიდან) |
|---|---|---|
| *Mucor sp.*T1-1 | 28,5 | 1. ფენილალანინი 27,4<br>2. გლუტამინის მჟავა 19,3<br>3. ტიროზინი 17,5<br>4. არგინინი 13,6<br>5. ასპარგინის მჟავა 11,5<br>7. სერინი 10,7 |
| *Trichoderma sp.* N2-6 | 22,6 | 1. ფენილალანინი 24,3<br>2. გლუტამინის მჟავა 12,6<br>3. ტიროზინი 18,7<br>4. არგინინი 18,5<br>5. ასპარგინის მჟავა 11,5<br>6. სერინი 10,4 |
| *Aspergillus niger* N2-2 | 10,2 | 1. ფენილალანინი 38,9<br>2. გლუტამინის მჟავა 14,7<br>3. ტიროზინი 12,8<br>4. არგინინი 11,4<br>5. ასპარგინის მჟავა 11,8<br>6. სერინი 10,4 |

მიღებული შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჩვენს მიერ შერჩეული მიკროსკოპული სოკოების მოქმედებით ხდება ტნტ-ს ღრმა დეგრადაცია. ამ პროცესის საწყის სტადიაზე სავარაუდოდ ხდება ნიტროჯგუფების აღდგენა, რის შემდეგაც მიკროორგანიზმების მიერ ტნტ-ს არომატული ბირთვი

გამოიყენება არომატული ამინომჟავების ბიოსინთეზში. გარდა ამისა აღდგენილი ტოქსიკანტის გარკვეული ნაწილი განიცდის შემდგომ ჟანგვას, რის შედეგადაც ხდება ამინოგუფების მოცილება და არომატული ბირთვის გახლეჩვა. ამ რეაქციების შდეგად წაროიქმნება ორგანული მჟავები, რომლებიც წარმოადგენენ უჯრედის სტანდარტულ მეტაბოლიტებს. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ითქვას, რომ მიკროსკოპული სოკოების ფერმენტების მოქმედებით მიმდინარე თანამიმდევრული აღდგენისა და ჟანგვის რეაქციების შედეგად ხდება ტნტ-ს სრული გაუვნებელყოფა და ამ ტოქსიკური ნაერთების ატომები ერთვებიან მიკროორგანიზმების ნივთიერებათა ცვლის პროცესებში.

## 3.9. დესტრუქტორი შტამების გამოყენება დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციისათვის.

ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციისათვის ჩვენს მიერ შერჩეული იქნა ორი შტამი: *Aspergillus niger* N2-2 და *Mucor* sp. T1-1. დეგრადაციის უნარი შესწავლილი იქნა ლაბორატორიულ და ბუნებრივ მოდელურ პირობებში.

ლაბორატორიული ცდები ტარდებოდა პეტრის ჯამებში, რომლებშიც მოთავსებული იყო 25გ, 200მგ/კგ ტნტ-თი დაბინძურებული საქართველოში გავრცელებულ შავმიწა და წითელმიწა ნიადაგები. წინასწარ ორჯერ გასტერილებულ მიწიან ჯამებში ტნტ შეგვქონდა სპირტხსნარის სახით და კიდევ ერთხელ ვასტერილებდით. შტამი *Aspergillus niger* N2-2 შეგვქონდა $8,5 \cdot 10^6$

კოლონიის წარმომქმნელი ერთეულის რაოდენობით (კწე) 1გ ნიადაგზე გადაანგარიშებით, ხოლო *Mucor* sp. T1-1 – $7,5 \cdot 10^5$ კწე-ს რაოდენობით. კონტროლად გამოყენებული იყო ტნტ-თი დაბინძურებული შავმიწა და წითელმიწა ნიადაგები, მიკროორგანიზმების გარეშე.

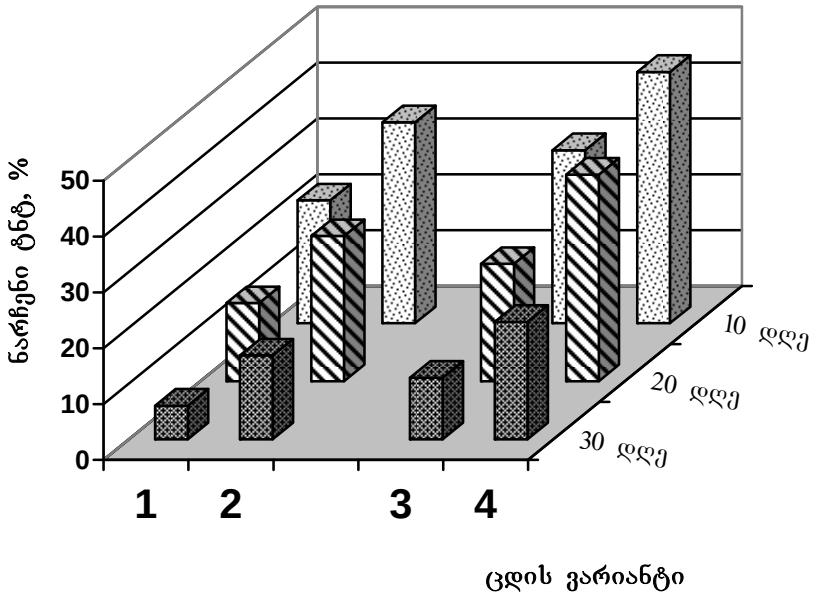
კულტურების ინკუბაცია ხდებოდა თერმოსტატში ოპტიმალურ ტემპერატურაზე. ექსპერიმენტის ხანგრძლივობა – 30 დღე. ყოველ მე-10 დღეს ნიმუშებში ვსაზღვრავდით კწე-ს რაოდენობრივ ცვილებებს და ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობას. შედეგები ნაჩვენებია მე-10-ე ცხრილსა და მე-7-ე ნახაზზე.

**ცხრილი 10**

**ინტროდუცირებული სოკოების კწე-ს ცვლილება ტნტ-თი დაბინძურებულ ნიადაგებში სტერილურ ლაბორატორიულ პირობებში**

| კულტურა | ნიადაგის ტიპები | კწე 1გ ნიადაგზე | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | კულტივირების დასაწყისი | 10 დღის შემდეგ | 20 დღის შემდეგ | 30 დღის შემდეგ |
| *Mucor* sp. T1-1 | შავმიწა | $7,5 \cdot 10^5$ | $9,5 \cdot 10^6$ | $6,5 \cdot 10^5$ | $3,5 \cdot 10^4$ |
| | წითელმიწა | $7,5 \cdot 10^5$ | $5,5 \cdot 10^5$ | $3,5 \cdot 10^4$ | $2,3 . 10^4$ |
| *Aspergillus niger* N2-2 | შავმიწა | $8,5 \cdot 10^6$ | $4,5 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^5$ | $6,5 \cdot 10^4$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | წითელმიწა | $8,5 \cdot 10^6$ | $4,5 \cdot 10^6$ | $3,5 \cdot 10^5$ | $4,5 \cdot 10^4$ |




**ნახ. 7. ტნტ-ს დეგრადაცია მიკროსკოპული სოკოების მიერ სტერილურ ნიადაგებში:**

1. **შავმიწა + ტნტ + *Mukor* sp. T1-1.**
2. **წითელმიწა + ტნტ + *Mukor* sp. T1-1.**
3. **შავმიწა + ტნტ + *Asp. niger* N2-2.**
4. **წითელმიწა + ტნტ + *Asp. niger* N2-2.**

მიღებული შედეგები უჩვენებს, რომ ინტროდუცირებული სოკოების განვითარება შავმიწა და წითელმიწა ნიადაგებში სხვადასხვანაირად მიმდინარეობს. კულტივირების დაწყებიდან მე-10 დღეს შავმიწა ნიადაგში ხდება ინტროდუცენტების კწე-ს მომატება ერთი რიგით, შემდეგ კი თანდათან იკლებს. ხოლო წითელმიწა ნიადაგებში – ინტროდუცენტების კწე-ს მე-10 დღესვე კლებულობს. ეს

შეიძლება აიხსნას იმით, რომ შავმიწა ნიადაგები უფრო მდიდარია ორგანული და მინერალური ნივთიერებებით და არსებული ორგანიკა სავარაუდოდ ხელს უწყობს მიკროორგანიზმებს ტოქსიკანტის მოქმედებით გამოწვეული სტრესის გადატანაში. ტნტ-ს მაქსიმალური კლება ხდება პირველი 10 დღის განმავლობაში (64-72%-ით) და ბოლო 20 დღის განმავლობაში ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობა მხოლოდ 6-15%-ს შეადგენს. უნდა აღინიშნოს რომ ტნტ-ს დეგრედაცია უფრო ინტენსიურად მიმდინარეობს შავმიწა ნიადაგებში.

ლაბორატორიულ პირობებში ჩატარებულმა ცდებმა დაგვარწმუნა, რომ აღნიშნული შტამების ინტროდუქცია ეფექტურია, და საინტერესოდ მივიჩნიეთ ჩაგვეტარებინა ბუნებრივ მოდლურ პირობებში. ამ მიზნით ავიღეთ 0,3 $м^2$ ფართობის შავმიწა და წითელმიწა არასტერილური ნიადაგები, ხელოვნურად დაბინ-ძურებული 1mM ტნტ/კგ ნიადაგზე. დაბინძურების სიღრმე 30 სმ.

სამუშაოს მიზანს შეადგენდა ჩვენს მიერ შერჩეული კულტურების – *Aspergillus niger* N2-2 და *Mucor* sp.T1-1-ის ბიოტრანსფორმაციის უნარი შეგვემოწმებინა მათი შეტანით უშუალოდ დაბინძურებულ, არასტერილურ ნიადაგებში. ამ ორი ტიპის ნიადაგში – წითელმიწა და შავმიწა, შეტანილი იყო ტნტ განსაზღვრული რაოდენობით. პარალელურად იგივე ტიპის სტერილურ ნიადაგებშიც შეტანილი იყო აღნიშნული რაოდენობის ტნტ. (რათა გამორიცხულიყო ადგილობრივი მიკროორგანიზმების მიერ ათვისებული ტოქსიკანტის რაოდენობა), ვინაიდან ცნობილია, რომ ნიადაგის დაბინძურებისას სხვადასხვა ტოქსიკანტებით იცვლება მისი ბიოქიმიური წონასწორობა, კერძოდ ხდება იმ

მიკროორგანიზმების გააქტიურება, რომლებსაც გააჩნიათ დამაბინძურებელი ტოქსიკანტების დეგრადაციის უნარი.

ასევე, ნიადაგში ორგანულ ტოქსიკანტებთან ერთად შევიტანეთ სიღრმული კულტივირებით გაზრდილი, შერჩეული კულტურების კულტურალური ხსნარი ბიომასით. (თითოეული შტამისათვის ავიღეთ დადგენილი კულტივირების ოპტიმალური პირობები). ამდენად თითოეული ტიპის მიწისათვის და თითოეული სოკოს შტამისათვის ავიღეთ შემედი ვარიანტები:

სტერილური ნიადაგი + ტნტ (მიჩნეული კონტროლად).

არასტერილური ნიადაგი + ტნტ.

არასტერილური ნიადაგი + ტნტ + მიკროორგანიზმი

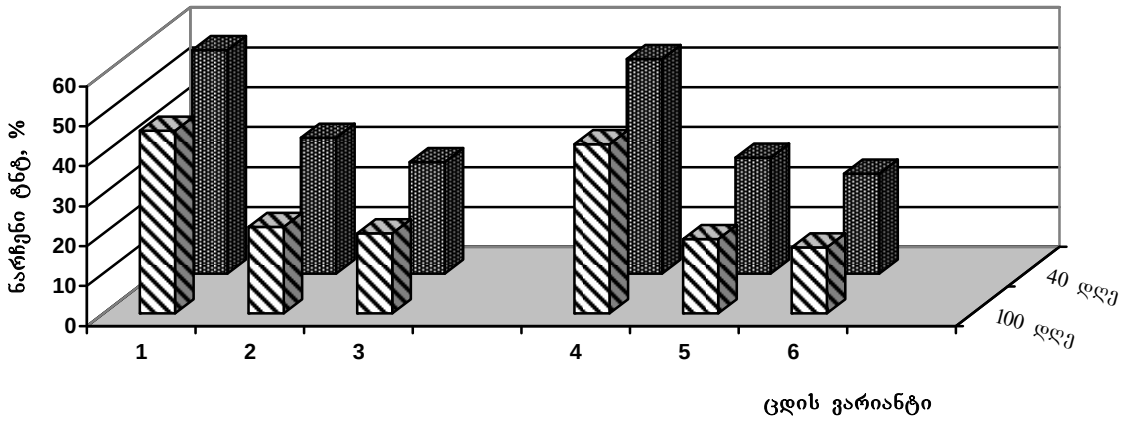
40 და 100 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ თითოეულ ნიმუშში განვსაზღვრეთ როგორც ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობა, ასევე მიკროორგანიზმების კოლონიების რაოდენობა ერთ გრამ მშრალ ნიადაგზე გადაანგარიშებით.

ცდის მონაცემებმა აჩვენა, რომ ადგილობრივი მიკროორგანიზმების რაოდენობა 40 და 100 დღის შემდეგ შემცირდა, რაც გამოწვეულია იმით, რომ ნიადაგის ადგილობრივი მიკროორგანიზმების გარკვეულმა რაოდენობამ არ განიცადა ადაპტაცია ტოკსიკანტის მიმართ. ჩვენს მიერ შერჩეული კულტურების შეტანის დროს კი ნიადაგში არსებული მიკროორგანიზმების რაოდენობა პირველ ეტაპზე მცირედ შემცირდა, მაგრამ შემდეგ კვლავ დაუბრუნდა საწყის რაოდნობას ან ზოგიერთ შემთხვევაში უმნიშვნელოდ გადააჭარბა კიდეც მას (ცხრილი 11).

ცხრილი 11

## მიკროსკოპულლი სოკოების კწე-ს ცვლილება ტნტ-თი დაბინძურებულ ნიადაგებში ბუნებრივ მოდელურ პირობებში

| ცდის ვარიანტი | სოკოების კწე 1გ ნიადაგზე | | |
|---|---|---|---|
| | ჩათესვის მომენტი | 40 დღის შემდეგ | 100 დღის შემდეგ |
| წითელმიწა (სტერილური ნიადაგი) + ტნტ | 0 | 0 | 0 |
| წითელმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ | $3.8\times10^{6}$ | $1.2\times10^{6}$ | $1.3\times10^{5}$ |
| წითელმიწა (არასტერილური ნიადა-გი) + ტნტ + *Aspergillus niger* N2-2 | $5,4\times10^{6}$ | $3.9\times10^{5}$ | $4.9\times10^{6}$ |
| წითელმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ + *Mucor* sp. T1-1 | $1.9\times10^{6}$ | $7.2\times10^{5}$ | $1.3\times10^{6}$ |
| შავმიწა (სტერილური ნიადაგი) + ტნტ | 0 | 0 | 0 |
| შავმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ | $6,5\times10^{6}$ | $4,7\times10^{5}$ | $3.2\times10^{5}$ |
| შავმიწა (არასტერილური ნიადა-გი) + ტნტ + *Aspergillus niger* N2-2 | $5\times10^{6}$ | $8,8\times10^{5}$ | $5.7\times10^{6}$ |
| შავმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ + *Mucor* sp. T1-1 | $1.9\times10^{6}$ | $7.0\times10^{5}$ | $2,4\times10^{6}$ |




ნახ. 8 მიკროორგანიზმების მიერ ტნტ-ს დეგრადაცია ბუნებრივ მოდალურ პირობებში:

1. წითელმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ.
2. წითელმიწა (არასტერილური ნიადაგი)+ტნტ + ***Aspergillus niger*** **N2-2.**
3. წითელმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ + ***Mucor*** **sp. T1-1.**
4. შავმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ.
5. შავმიწა (არასტერილური ნიადაგი + ტნტ + ***Aspergillus niger*** **N2-2.**
6. შავმიწა (არასტერილური ნიადაგი) + ტნტ + ***Mucor*** **sp. T1-1.**

როგორც მე-8-ე ნახაზზ ჩანს, დაბინძურებული ნიადაგებიდან ადგილობრივი მიკროორგანიზმების მიერ ტნტ-ს ბიოდეგრადაციის ხარისხი შეადგენს 40-50%-ს, ხოლო დამატებით შეტანილი შტამ-დესტრუქტორების შემთხვევაში კი აღწევს 80%-ს. ამდენად, ამ შტამების ინტროდუქცია აუმჯობესებს ტნტ-ს დეგრადაციის ხარისხს ნიადაგში, რაც მოწმობს ამ შტამების მაღალ დესტრუქციულ აქტივობაზე.

ასეთი შტამები წარმატებით შეიძლება იქნენ გამოყენებულნი სამხედრო ნარჩენებისაგან დაბინძურებული ნიადაგების

გაწმენდისათვის და მნიშვნელოვანი როლი შეასრულონ გარემოს დაცვაში.

## დაკვნები

1. საქართველოს სამხედრო პოლიგონიდან და წარმოების ნარჩენი წყლებიდან გამოყოფილ და საქართველოს დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში არსებული მიკროსკოპული სოკოების კოლექციის შტამების სკრინინგის შედეგედ გამოვლენილი იქნა 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლის დესტრუქტორი შტამები. 77 შესწავლილი შტამიდან 100მგ/ლ ტნტ-ს კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეზე ზრდის უნარი აღმოაჩნდა 24 შტამს, 200მგ/ლ კონცენტრაციაზე 9-ს, 300მგ მლ კონცენტრაციაზე 4-ს, ხოლო 400მგ/ლ კონცენტრაციაზე 1 შტამს.
2. გამოვლენილია ის კულტურები, რომლებიც არომატული ბირთვის მქონე ტოქსიკური კანცეროგენური ნივთიერების (ბენზ(α)პირენი, ორთოდიქლორ-ბენზოლის) მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას ხასიათდებოდნენ კარგი ნაზრდით. აღმოჩნდა რომ, ყველა გამოცდილი ტოქსიკანტის საუკეთესო დესტრუქტორ შტამებს წარმოადგენენ ერთი და იგივე კულტურები: *Mucor* sp. T1-1; *Trichoderma* sp. N2-6, *Aspergillus .niger* N2-2, რომლებიც მომავალში შესაძლებელია გამოყენებული იქნენ სხვა არომატული ბირთვის მქონე ტოქსიკური კანცეროგენული ნივთიერებების (ქლორირებული ფენოლი, ქლორირებული დიბენზოდიოქსინები) დეტოქსიკაციაში.
3. ექსტრემოფილობის ხარისხის დადგენის მიზნით ტნტ-ს მაღალ (200მგ/ლ) კონცენტაციაზე მზარდი კულტურებისათვის შესწავლილია ტემპერატურის, ასევე pH-ისა და NaCl-ის განსხვავებული

მაჩვენებლების გავლენა მათ ზრდა-განვითარებაზე, გამოვლენილია 2 თერმოფილური, 3 თერმოტოლერანტი, 3 მეზოფილი და ერთი ფსიქროფილი კულტურა, ასევე შესწავლი კულტურებიდან 2 აღმოჩნდა ალკალიფილი, 2 ალკალიტორელანტი და 1 აციდოტოლერანტი, ხოლო NaCl-ის მაღალ კონცენტრაციებზე ზრდის უნარის მიხედვით გამოვავლინეთ 3 ექსტრემალური ჰალოფილი და 3 ზომიერი ჰალოფილი.

4. დავადგინეთ ტნტ-ს მაღალაქტიური დესტრუქტორი შტამების კულტივირების პირობები, ნაჩვენებია, რომ ტნტ-ს მაქსიმალური გარდაქმნა მიიღწევა მიკროსკოპული სოკოს შტამების - *Aspergillus niger* K3-5 და *Aspergillus niger* N2-2 კულტივირებისას $35^0$C ტემპერატურაზე, კულტურა. *Mucor* sp. T1-1 ტნტ-ს მაქ-სიმალურ რაოდენობას ითვისებს $40^0$C-ზე, ხოლო შტამი – *Trichoderma sp.* N2-6 $30^0$C ტემპერატურას პირობებში, შტამები *Aspergillus niger* K3-5 და *Aspergillus niger* N2-2 მაქსიმალურად გარდაქმნიან ტნტ-ს pH 6-ზე, ხოლო კულტურა. *Mucor* sp. T1-1 თითქმის 100%-ით შლის ტნტ-ს pH 9-ზე, *Trichoderma sp.* N2-6 კი pH 5-ზე.

5. ტნტ-ს გარდაქმნის მექანიზმის დასადგენად შევისწავლეთ მიკროსკოპული სოკოების. *Mucor* sp. T1-1, *Trichoderma sp.* N2-6,-სა და *Aspergillus niger* N2-2-ის მიერ (1-$^{14}$C)-ტრინიტროტოლუოლის ბიოგარდაქმნის პროდუქტები. დადგინდა, რომ აღნიშნული შტამების მიერ შეთვისებული ტნტ-ს ნახშირბადოვანი ჩონჩხი ბიოტრანსფორმაციას განიცდის. კულტურალური სითხიდან გამიყოფილია ორგანული მჟავებისა და ნაწილობრივ ამინომჟავების რადიოაქტიური ფრაქციები. დადგენილია, რომ მიკროსკოპული

სოკოების მიერ შეთვისებული [1-$^{14}$C]ტნტ-ს ნახშირბადატომები ძირითადად ორგანული მჟავების სინთეზში მონაწილეობენ (70-80%).

6. ლაბორატორიულ პირობებში შავმიწა და წითელმიწა სტერილურ ნიადაგებში, 30 დღის განმავლობაში, 30$^{0}$C-ზე, შტამების *Mucor* sp. T1-1 და *Aspergillius niger* N2-2 კულტივირების შემდეგ ნიადაგებში ნარჩენი ტნტ-ს რაოდენობა შავმიწა ნიადაგში შეადგენდა 6%-ს, *Aspergillius niger* N2-2-ის კულტივირებისას 11%-ს, ხოლო წითელმიწა ნიადაგში შესაბამისად 15 და 21%-ს.
7. ბუნებრივ მოდალურ პირობებში 100 დღის განმავლობაში დაბინძურებულ ნიადაგებში ნიადაგის მიკროფლორის მიერ ტნტ-ს დეგრადაციის ხარისხი შეადგენს 40-50%-ს, ხოლო დამატებით შტამ-დესტრუქტორების – *Mucor* sp. T1-1 და *Aspergillius niger* N2-2-ის შეტანის შემთხვევაში კი აღწევს 80%-ს, რაც მიუთითებს შტამების მაღალ დესტრუქციულ აქტივობაზე და იძლევა მათი გამოყენების შესაძლებლობას ტნტ-თი დაბინძურებული ნიადაგების ბიორემედიაციის ტექნოლოგიებში.

## გამოყენებული ლიტერატურის სია


1. **გეგენავა გ.** 1976. მცენარეთა დაცვის ქიმიური და მიკრობიოლოგიური საშუალებები. თბილისი. გვ. 135-138
2. **გორდეზიანი მ., ვესიტაძე გ.** 2000. ეკოლოგიის ქიმიური საფუძვლები. თბილისი, გვ 45-47
3. **გორდეზიანი მ., კვესიტაძე გ.,** 2000; ეკოლოგიის ქიმიური საფუძვლები. თბილისი, გვ 94-101
4. **გორდეზიანი მ., კვესიტაძე გ.,** 2000; ეკოლოგიის ქიმიური საფუძვლები. თბილისი, გვ 199-202
5. **კვესიტაძე გ., კვესიტაძე ე.,** 2000. ბიოტექნოლოგია. თბილისი, შ.პ.ს. "ეტრატი". გვ 80-88.
6. **Abraham Esteve-Núñez, Antonio Caballero, and Juan L. Ramos.** Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. Microbiology and Molecular Biology Reviews, September 2000, Vol. 65, No. 3, p. 335-352
7. **Alexander M.** 1994. Biodegradation and Bioremediation. Acad. Press, San Diego, Calif.
8. **Andersson B. E., Henrysson T.** (1996) Accumulation and degradation of dead-end metabolities during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 46:647-652.
9. **Andrea R. Clemente; Tania A. Anazawa; Lucia R. Durrant.** 2001**.** Bioderadation of aromatic hydrocarbons by soil fungi. Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
10. **Aust, S. D. P. R. Swaner J. D. Stahl**. 2003. Detoxification and metabolism of chemicals by white-rot fungi. Pesticide decontamination and detoxification.

J. J. P. C. Zhu S. D. Aust A. T. Lemley Gan , 3-14. Washington, D.C.: Oxford University Press.

11. **Averill B. A.** 1995. Transformation of inorganic N-oxides by denitrifying and nitrifying bacteria: Pathways, mechanisms, and relevance to biotransformation of nitroaromatic compounds, p. 183-197. *In* J. C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, N.Y.
12. **Baarschers W. H., Heitland H. S.** (1986) Biodegradation of Fenitrothion and Fenitrooxon by the fungus *Trichoderma viridae*. J Agric Food Chem 34: 707-709
13. **Baker E. E.** Physiology of fungi and their practical application. Moscow, University, 1963, -27.
14. **Barr D. P. and Aust S. D. 1994**. Mechanisms the white rot fungi use to degrade pollutants. Env. Sci. Technol., 28: 79A-87A.
15. **Bayman P., Radkar G. V.** (1997) Transformation and tolerance of TNT (2, 4, 6-trinitrotoluene) by fungi. Int. Biodeter. Biodegr. 39: 45-53.
16. **Benner B.A., Jr. Bryber N. P., Wise S.A., Mulholland G. W. Lao R. C., Fingas M. F.** 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from the combustion of crude oil on water. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1418-1427,
17. **Bennet J. W., Hollrah P., Waterhouse A.** 1995. Isolation of bacteria and fungi from TNT contaminated composts and preparation of 14C-ring labelled TNT. Int. Biodeter. Biodegr. 35: 421-430.
18. **Bennett J. W. and Faison B. D.** 1997. Use of Fungi in Biodegradation. In: Environmental Microbiology, ASM Press, Washington.
19. **Birnbaum L. S.** The Mechanism of Dioxin Toxicity: Relationship to Risk Assessment // Environ. Health Perspect. - 1994. - V.102, Iss.9. - P.157-167.
20. **Blotevogel, K.-H., and T. Gorontzy.** 2000. Microbial degradation of compounds with nitro functions, p. 274-302. *In* J. Klein (ed.), Biotechnology, vol. 11b. Environmental processes II. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
21. **Bogan B. W., Lamar R. T., Burgos W. D., Tien M** (1999) Extent of humification of anthracene, flouranthene and benzo[*a*] pyrene by *Pleurotus*

*ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. Lett APP Microbiol 28:250-254

22. **Bogan B. W., Lamar R.** 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading of *Phanerochaete chrysosoporium* HHB — 1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1597-1603.
23. **Bonner R., Fergus CH. R.** The influence of temperature and relative humidity of silage on growth and survival of silage fungi. –Mykologia, 1960,52,#4,p. 642-647.
24. **Boyle C. D., Wiesner C., Richardson A** (1998) Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. Soil Biol Biochem 30:873-882.
25. **Breivik, K. R. Alcock Y. Li R. E. Bailey H. Fiedler J. M. Pacyna.** 2004. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. Environmental Pollution 128: 3-16.
26. **Birnbaum L.S.** 1994.The Mechanism of Dioxin Toxicity: Relationship to Risk Assessment // Environ. Health Perspect. - V.102, Iss.9. - P.157-167.
27. **Bruhn C., Lenke H., Knackmuss H. J.** 1987. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53, p.208-210.
28. **Bumpus J. A., Aust S. D.** 1987 Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chloropheny)ethane] by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium.* Appl Environ Microbiol 53: 2001-2008.
29. **Bumpus J. A., Powers R. H., Sun T.** 1993. Biodegradation of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chloropheny)ethene) by *Phanerochaete chrysosporium.* Mycol Res 97:95-98
30. **Bumpus J. A., and M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. Curr. Microbiol. **28:**185-190.

31. **Carroll G.C. and Wicklow D.T.** 1992. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., N.Y.

32. **Cerniglia C. E.** 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 324-333,

33. **Cerniglia C. E., White G.L.** 1985. Heflich, R.H. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Microbiol.* 143: 105-110.

34. **Chaudhry G. R.** 1994. Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

35. **Chivukula M. and Renganathan V.** 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae.* Appl. Environ. Microbiol., 61:4374-4377.

36. **Cooke R. C. and Rayner A. D. M.** 1984. Ecology of Saprophytic Fungi. Longman, London.

37. **Crabble J. R., Campbell J. R., Thompson L., Walz S. L., Schulz W. W.** 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based poyurethane by soil fungi. Int Chem Eng 37: 176-180.

38. **Craig H. and Sisk W.** 1998. The Composting Alternative to Incineration of Explosives Contaminated Soils. EPA Tech Trends, November 5, 1998.

39. **Crawford D. L., Crawford R. L.** 1996. Bioremediation Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-34.

40. **Crawford R. L.** 1993. Biotreatment of nitroaromatic compounds. Trends Biotechnol. **11:**411-412.

41. **Crawford R. L.** 1995. The microbiology and treatment of nitroaromatic compounds. Curr. Opin. Biotechnol. **6:**329-336

42. **Crisan E.V.** Current concepts of thermophilic fungi.- Mycologia, 1973, 55, #5, 1171-1198.

43. **Davis M. W., Glaser J. A., Evans J. W, Lamar R. T.** 1993. Filed evolution of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote contaminated soil. Environ Science Technol 27:2572-2576.

44. **Davis-Hoover W.** 1994. Ex Situ Bioremediation of TNT, Dinoseb & Other Pesticides/Herbicides. EPA Tech Trends, August 1994.

45. **Deguchi T., Kitaoka Y., Kakezawa M., Nishdia T.** (1998) Purification and characterization of a neylon-degrading enzyme. Appl Environ Microbiol 64:1366-1371

46. **Dipple A., Cheng S.C., Bigger C.A.H.** 1990.Polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogens. *In:* Pariza, M. W.; Aeschbacher, H. U.; Felton, J. S.; Sato, S. (Eds.), Mutagens in the diet. Wiley-Lissp., New York, pp. 109-127.

47. **Donnelly K. C., Chen J. C., Huebner H. J., Brown K. W., Auterieth R. l., Bonner J. S.** 1997. Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. Environ Toxicol Chem 16:1105-1110.

48. **Duque E., Haïdour A., Godoy F., Ramos J. L. 1993.**Construction of a Pseudomonas Hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. J. Bacteriol. 175, p.2278-2283.

49. **Eaton Ra., Hale MDC.** 1993. Wood, decay, pests and prevention. Champan and Hall, London.

50. **Eggen T.** 1999. Application of fungal substrate from commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus* – for bioremediation of creosote contaminated soil. Int Biodeter Biodegr 44: 117-126.

51. **Eggert C., Temp U., Eriksson K. E.** 1996. The ligninolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarius*; purification and characterization of the laccase. Appl environ Microbiol 62:1151-1158.

52. **Elovitz M. S.., Weber E. J.** 1999. Sediament-mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and fate of thy resulting aromatic (poly)amines. Evviron. Sci. Technol. 33, p. 2617-2625.

53. **Environmental Biotechnology and Enzymes** Hexogen and TNT http://www.ibwf.de/env&enz_index.htm#Hexogen%20and%20TNT, p2-4

54. **Environmental Protection Agency**. (EPA) 1995. J.R. Simplot Ex-Situ Anaerobic Bioremediation Technology: TNT. EPA Superfund Innovative Technology Evaluation (SITE) Capsule. EPA 540/R-95/529a. September 1995.

55. **Environmental Protection Agency**. (EPA) 1997. Innovative Uses of Compost; Composting of Soils Contaminated by Explosives. EPA Fact Sheet. EPA530/F-97/045. October 1997.

56. **EPA. (1991, a)**. Health Effects Summary Tables. Annual FY-91. Prepared by thy office of health and Environmental Assessment, Environmental Criteria Remedial Repose. Washington, D. C. OERR 9200. 6-303 (91-1). NTIS PB91-921199.

57. **EPA. (1991, b).** Integrated Risk Information System (IRIS). Risk s Estimate For Carcinogenicity and Reference Dose for Oral Exposure for 2,4,6-Trinitrotoluene. Online file. office of Healer and Environmental Assessment. Cincitali, Oh.

58. **EPA US.** 2000. Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) and Related Compounds. Path 1, V.2, - Washington, DC, EPA/600/P-00/001Ab,. - 628p.

59. **Esteve-Nunez A., Callaberol., Ramos J.L.** (2001) Biological dagradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 335-352

60. **Fant, F., A. de Sloovere, K. Matthijse, C. Marle, S. el Fantroussi, and W. Werstraete.** 2001. The use of amino compounds for binding 2,4,6-trinitrotoluene in water. Environ. Pollut. **111:**503-507.

61. **Faulkner J. K., Woodcock D.** (1964) Metabolism of 2,4-diclorophenoxyacetoc acid by *Aspergillus niger*. Van Tiegh. Nature 203: 865-866.

62. **Fernandez P., Grifoll A. M., Solanas A. M., Bayona J.M., Albaiges J.** 1992**.** Biossay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26: 817-829.

63. **Fernando T., Bumpus J. A., and Aust S. D.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **56:**1666-1671.

64. **Field, J. A., E. De Jong, G. Feijoo-Costa, and J. A. M. de Bont.** (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Trends Biotechnol. 11**:** 44-49.

65. **Frankland, J. C., Hedger, N. H. and Swift, J. J. (Eds.)** 1982. Decomposer Basidiomycetes. Their Biology and Ecology. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

66. **Fraunhofer IGB**. Bioremediation of TNT-contaminated soil by a two-stage anaerobic/aerobic process. <http://www.igb.fhg.de/Uwbio/en/TNT.en.html> 4/15/99. (Accessed 04/19/99)

67. **Freeman R. A., Hileman F. D., Noble R. W., Schroy J. M**. In: J.H. Exner Experiments on the mobility of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin at Times Beach, Missouri ed. // Solving Hazardous Waste Problems, ACS Symposium Series Num. 338. - 1987.

68. **Fritsche, W., Scheibner K., Herre A. and Hofrichter M.** 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds, p. 213-238. *In* J. C. Spain, J. B. Hughes, and H.-J. Knackmuss (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.

69. **Fuller, M. E., and J. Manning, Jr.** 1997. Aerobic gram-positive and gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Curr. Microbiol. **35:**77-83

70. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Crit. Rev. Microbiol. **20:**265-284

71. **Funk, S. B., Roberts D. J., Crawford D. L. and Crawford R. L.** 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. Appl. Environ. Microbiol. **59:**2171-2177.

72. **Funk, S. B., Crawford D. L., Crawford R. L.** 1996. Bioremediation of nitroaromatic compounds. Don L. Crawford and Ronald L. Crawford (ed.) Bioremediation Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge. 1996. pp. 195-205.

73. **Glaus M. A., Heijman C. G. Schwarzenbach R. P., Zeyer, J.** 1992. Reduction of nitroaromatic compounds madiated by Streptomycec sp. exudates. Appl. Envioron. Microbiol. 58, p.1945-1951.

74. **Gong P., SicilianoS. D., Greer C. W., Paquet L., Hawari J., Sunahara G. I.** 1999. Effects and bioavailability of 2, 4, 6-trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous mikroorganizms. Environ. Toxicol. Chem. 18:2681-2688

75. **Gorontzy T., Küver J., and Blotevogel K.** 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. J. Gen. Microbiol. **139:**1331-1336

76. **Gorontzy T., Drzyzga O., Kahl M. W., Bruns-Nagel D., Breitung J., von Löw E., and Blotevogel K.-H.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Crit. Rev. Microbiol. **20:**265-284

77. **Gramss G, Voigt KD, Kirsche B.** 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. Biodegradation 10:51-62.

78. **Haderlein S., Schwarzenbach R.,** 1995; Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitraromatic compaunds in the subsurface, p.199-225. In J. C. Spain (ed.), Biodegradation of nitraromatic compaunds. Plenum Press, New Cork, N.Y.

79. **Haïdour A., Romos J. L.** 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by Pseudomonas sp. Environ. Sci. Technol. P.2365-2370.

80. **Haigler B. E., Wallacee W. H., Spain J. C.** 1994. Biodegradation of 2- by nitrotoluene Pseudomonas sp. strain JS42. Appl. Envioron. Microbiol. 6077, p.3466-3469

81. **Hamman S.** sthamman@cnr.colostate.edu BI570 review article Spring 2004. Bioremediation capabilities of white rot fungi, p.2

82. **Hartter, D. R.ергтвук** 1985. The use and importance of nitroaromatic compounds in the chemical industry, p. 1-14. *In* D. E. Rickert (ed.), Chemical Institute of Toxicology Series. Toxicity of nitroaromatic compounds. Hemisphere Publishing, Washington, D.C.

83. **Haselhorst L**. Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) at munitions sites. 2000. http://horticulture.coafes.umn.edu/vd/h5015/99papers/haselhorst. htm , p1-3

84. **Hattor K., Hashimoto M., and Ohashi M.,** June 1970. Oxypyrrolnitrin: a new antibiotic. Japanese patent 45029432.

85. **Hawari J., Halasz A., Beaudet S., Paquet L., Ampleman G., and Thiboutot S.** 1999. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. Appl. Environ. Microbiol. **65:**2977-2986

86. **Hess T. F., Schmidt S. K., Silverstein J., Howe B**. 1990. Supplemental substrate enhancement of 2,4,6-trinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 56, p.1551-1558.

87. **Higson, F. K.** 1992. Microbial degradation of nitroaromatic compounds. Adv. Appl. Microbiol. **37:**1-19

88. **Hodgson, J., D. Rho, S. R. Guiot, G. Ampleman, S. Thiboutot, and J. Hawari.** 2000. Tween 80 enhanced TNT mineralization by *Phanerochaete chrysosporium*. Can. J. Microbiol. **46:**110-118.

89. **Hofstetter, T. B.** 1999. Reduction of polynitroaromatic compounds by reduced iron species. Coupling biogeochemical processes with pollutant transformation. Ph.D. thesis. Swiss Federal Institute of Technology (EHT), Zürich, Switzerland.

90. **Hofstetter, T. B., Heijman C. G., Haderlein S. B., Holliger C., and. Schwarzenbach R. P.** 1999. Complete reduction of TNT and other

(poly)nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions. Environ. Sci. Technol. **33:**1479-1487.

91. **Hodgson J., Rho D., Guiot Sr.,** 2000. Tween 80 enhanced TNT mineralization by *Panerochaete chrysosporium*. Can J. microbiol. 46.
92. **Honeycutt M. E., Jarvis A.S., McFarland V. A.** 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolits. ecotoxicol. Environ. Saf. 35, p.282-287.
93. **Hornung M.W., Zabel E.W., Peterson R.E.** Toxic Equivalency Factors of Polybrominated Dibenzo-*p*-dioxin Dibenzofuran, Biphenyl, and Polygalogenated Diphenyl Ether Congeners Based on Rainbow Trout Early Life Stage Mortality // Toxicology Appl. Pharmacol. - 1996. - V.140, Iss.2. - P.227-234.
94. **IARC.** 1983-1985. The evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC. Monographis*. Lyon, France, pp. 32-35,.
95. **Introduction to Phytoremediation**. 2000. EPA/600/ R-99/170. February, 2000. www.epa.gov/svetriol/download/remed/introphyto.pdf.
96. **Kanga, S.A.; Bonner, J.S.; Page, C.A.; Mills, M.A.; Autenrieth, R.L.** Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environ. Sci. Technol.* 31:556-561, 1997.
97. **Kaplan, D. L.** 1989. Biotransformation pathways of hazardous energetic organo-nitro compounds. Adv. Appl. Biotechnol. Ser. **4:**157-181.
98. **Kaplan, D. L.** 1992. Biological degradation of explosives and chemical agents. Curr. Opin. Biotechnol. **3:**253-260.
99. **Kim, H. Y., and H. G. Song.** 2001. Comparison of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. Curr. Microbiol. **41:**317-320.
100. **Kirk, R.E. and P.F. Othmer.** 1951. Encyclopedia of Chemical Technology. Interscience Encyclopedia, Incorperated, New York. 6: 43-48.
101. **Kirk, R. E. and P. F. Othmer.** 1993. Encyclopedia of Chemical Technology, Fourth Edition. John Wiley & Sons, New York. 10: 34-39.

102. **Kirk, T. K., Connors, W. J. and Zeikus, J. G**. 1976. Requirement of growth substrate during lignin degradation by two wood rotting fungi., Appl. Eviron. Microbiol., 32: 192-194.

103. **Klausen J., Tröber S. P., Haderlein S. B. and R. P. Schwarzenbach.** 1995. Reduction of substituted nitrobenzenes by Fe(II) in aqueous mineral suspensions. Environ. Sci. Technol. **29:**2396-2404.

104. **Kotterman M. J., Vis E. H., Field J. A.** (1998) Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. Appl Environ Microbiol 64:2853-2858

105. **Kremar P, Ulrich R.** (1998) Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chysospirium* for degradation of the cyclodience pasticide endosulfan. Appl Environ Microbiol 62: 593-600.

106. **Krumholz, L. R., Clarkson W. W., Wilber G. G., and Suflita J. M.** 1997. Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **18:**161-169.

107. **Kullam S. W., Matsumara F.** (1996) Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. Appl Environ Microbiol 62: 593-600.

108. **Kvesitadze G. I**. Enzumes of microscopic fungi cultures developing under extreme conditions. A.N. Bach Ins. Biochemistry, 1986, 17-19.

109. **Lamar, R.T. Evans, J.W. and Glaser, J.** 1993. Solid phase treatment of pentachlorophenol-contaminated soil using lignin degrading fungi. Environ. Sci. Technol., 27: 2566-71.

110. **Lau, K. L. Y. Y. Tsang S. W. Chiu**. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. Chemosphere 52: 1539-46.

111. **Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E., Moore M.** The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can. J. Microbiol*. 41: 477-488, 1995

112. **Lee B, Pometto ALI, et al.** (1991) Biodegradation of dagradable plastic polyethylene by *Phanerochaete sp.* and *Streptomyces spp.* Appl. Environ. Microbiol.,60: 3447-3449.

113. **Levin, L. A. Viale A. Forchiassin**. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete Trametes trogii. International Biodeterioration & 11

114. **Lewis T. A., Ederer M. M., Crawford R. L., and Crawford D. L.** 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **18:**89-96

115. **Litchfield C. D., Rao M.** (1998) Pentachlorophenol biodegradiation: laboratory and field studies. Wiley, New York, pp271-302.

116. **Malloch. Dovid**. Moulds, Their Isolation, Cultivation and Identification. University of Toronto Press. Toronto Buffalo London. 1981.

117. **McCormick, N. G., F. E. Feeherry, and H. S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. **31:**949-958.

118. **McFarlan S.** (2002) 2,4,6-Trinitrotoluene Pathway Map. Univ. of Minnesota.

119. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-TNT. Appl. Environ. Microbiol. **60:**187-194.

120. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1995. Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, p. 135-149. *In* J. C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, N.Y.

121. **NATO. North Atlantic Treaty Organisation** 1995. Cross-Border Environmental Problems Emanating from Defence-Related Installations and Activities, NATO/CCMS (Committee on the Challenges to Modern Society) /NACC (North Atlantic Cooperation Council) Pilot Study Summary, Final Report, Phase 1, Report No. 206.

122. **Nigam P., Banat I.M., McMullan G., Dalel Singh and Marchant R.** 1995. Microbial degradation of textile effluent containing Azo, Diazo and reactive dyes by aerobic and anaerobic bacterial and fungal cultures. 36th Annu. Conf, AMI, Hisar, 37-38.

123. **Nishno S. P., Paoli G. C., Spain G. C.,** 2000. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. Appl. Envioron. Microbiol. 66, p2139-2147

124. **Novitsky T.J., Kushner D.J.** 1975. Influences of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic "Micrococcus"sp., Can.J.,Microbiol.,21,107-110.

125. **Novotny C., Vyas BRM., Erbanova P., Kubatova A., Sasek V.** (1997) Removal of various PCBs by various white-rot fungi in liquid culutures. Folia Microbiol 42:136-140.

126. **Oh B., Sarath G., Shea P.J., Drijber R.A. Comfort S.D.** 2000. Rapid spectrophotometric determination of 2,4,6-trinitrotoluene in a Pseudomonas enzyme assay. J. Microbiol. Methods. Vol.42, No2.p.149-158.

127. **Ohmori, T., S. Hagiwara, A. Ueda, Y. Minoda, and K. Yamada.** 1978. Production of pyoluteorin and its derivatives from n-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S10B2. Agric. Biol. Chem. **42:**2031-2036.

128. **Parrish, F. W.** 1977. Fungal transformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Appl. Environ. Microbiol. **34:**232-233.

129. **Pasti-Grigsby M. B., Lewis T. A., Crawford D. L. and Crawford R. L.** 1996. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Actinomycetes* isolated from TNT-contaminated and uncontaminated environments. Appl. Environ. Microbiol. **62:**1120-1123.

130. **Pauli Ollikka, Kirsi Alhonmaki, Veli-Matti Leppanen, Tuomo Glumoff, Timo Raigola and Hari Suominen.** 1993. Decolorization of Azo Triphenyl Methane Heterocyclic and Polymeric dyes by lignin peroxidase, isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Environ. Microbiol., 59: 4010-4016.

131. **Peres, C. M., and S. N. Agathos.** 2000. Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation. Biotechnol. Annu. Rev. **6:**197-220.

132. **Pointing S. B.** (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 20-33.

133. **Reddy C.A. and Mathew, Z**. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. Fungi in bioremediation. G. M. Gadd Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

134. **Rieble, S., D. K. Joshi, and M. Gold.** 1994. Aromatic nitroreductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysospurium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **205:**298-304.

135. **Rieger, P.-G., V. Sinnwell, A. Preuss, W. Franke, and H.-J. Knackmuss.** 1999. Hydride-Meisenheimer complex formation and protonation as key reactions of 2,4,6-trinitrophenol biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*. J. Bacteriol. **181:**1189-1195

136. **Rittmann, B. E**. <<<et. al.>>> 1994. In Situ Bioremediation, second edition. Noyes Publications, Park Ridge, New Jersey. pp. 61-63, 205, 219-220.

137. **Rügge, K., T. B. Hofstetter, S. B. Haderlein, P. L. Bjerg, S. Knudsen, C. Zraunig, H. Mosbaek, and T. H. Christensen.** 1998. Characterization of predominant reductants in an anaerobic leachate-contaminated aquifer by nitroaromatic probe compounds. Environ. Sci. Technol. **32:**23-31

138. **Sack U., Heinze T.M. et al.** (1997) Comparizon of phenanthrene and pyrene dagradation by different wood decay fungi. Appl Environ Microbiol 63:3919-3925.

139. **Sami and Radhaune** 1995. Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill waste water. Appl. Envron. Microbiol., 61: 1098-1103.

140. **Scheibner, K., and M. Hofrichter.** 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. J. Basic Microbiol. **38:**51-59

141. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensevely mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47:**452-457.

142. **Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Biotechnol. Lett. **19:**835-839.

143. **Schneider K., Kalberlah F.** 1992. Toxikologische Bewertung der Rustungsaltlasten "Neue Wiese-muna Lehre". Gutachten im Auftrag des Umweltministeriums Nidersachsen.

144. **Spain, J.** 1995. Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions, p. 19-35. *In* J. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, N.Y.

145. **Spain, J. C.** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. **49:**523-555.

146. **Spain, J., J. B. Hughes, and H.-J. Knackmuss (ed.).** 2000. Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.

147. **Spanggord, R. J., C. D. Yao, and T. Mill.** 2000. Oxidation of aminodinitrotoluenes with ozone: products and pathways. Environ. Sci. Technol. **34:**497-504.

148. **Spanggord R. J., Spain J. C., Nishino S. F., and Mortelmans K. E.** 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57:**3200-3205.

149. **Spanggord, R. J., Mortelmans K. E., Griffin A. F., and Simmon V. F.** 1982. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure-activity

relationships of wastewater components emanating from the manufacture of trinitrotoluene. Environ. Mutagen. **4:**163-179.

150. **Spanggord R. J., Stewart K. R. and Riccio E. S.** 1995. Mutagenicity of tetranitroazoxytoluenes: a preliminary screening in *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA100NR. Mutat. Res. **335:**207-211.
151. **Spiess T., Desiere F., Fischer P., Spain J. C., Knackmuss H.-J. and Lenke H.** 1998. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. Appl. Environ. Microbiol. **64:**446-45.
152. **Spiker, J. K., D. L. Crawford, and R. L. Crawford.** 1992. Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **58:**3199-3202.
153. **Stahl, J. D., and Aust S. D.** 1995. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, p. 117-134. *In* J. C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York.
154. **Stahl, J. D., and S. D. Aust.** 1993. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **192:**477-482.
155. **Stahl, J. D., and S. D. Aust.** 1993. Plasma membrane dependent reduction of 2,4,6-TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **192:**471-476.
156. **Stahl, J. D., and S. D. Aust.** 1995. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, p. 117-134. *In* J. C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, NY.
157. **Stucki, G. and M. Alexander.** 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegration of aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology 53: 293-295.
158. **Sullia, S.B.** (2000) Fungal Diversity and Bioremediation. Depart. of Microbiology & Biotechnology.

159. **Sunahara G. I., Rodidoux P.Y., Havari J., Thiboutot S., Ampleman G., Renoux A. Y. 2000.** Ecotoxicological methods to assess the hazardous effects of energetic substances at contaminated sites. In: Contaminated Soil – Proceedings of the 7th international FZK/TNO Conference on contaminated Soil, Leipzig, Germany, v.2, 886-887.

160. **Taylor R. P.** 1970. Novel Meisenheimer complexes: the preparation of tetramethylammonium 1,1-dihydro-2,4,6-trinitrocyclohexadienate. J. Chem. Soc. Chem. Comm. **1970:**1463-1463.

161. **Thurson C.F.** (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140:19-26.

162. **Tischler, M., S. W. Ayer, and R. J. Andersen.** 1986. Nitrophenols from northeast Pacific bryozoans. Comp. Biochem. Physiol. Ser. B **84:**43-45.

163. **Tuomela M., Lytikainen M., Oivanen P., Hatakka A.** (1999) Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Soil Biol Biochem 31:65-74.

164. **UNEP. POPs**: Regulatory Actions and Guidelines Concerning Persistent Organic Pollutants. Geneva, p 1998. – 267.

165. **USAEC** (US Army Environmental Center). Cleanup Technology: Bioremediation of Explosives-Contaminated Soil. <http: aec-www.apgea.army.mil:8080/> 2/18/99 (Accessed 4/19/99).

166. **Van Aken, B., K. Skubusz, H. Naveau, and S. N. Agathos.** 1997. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. Biotechnol. Lett. **19:**813-817.

167. **Van Aken B., Godefroid L. M., Peres C. M., Naveau H., and Agathos S. N.** 1999. Mineralization of $^{14}$C-ring labeled 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene by manganese-dependent peroxidase of the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. J. Biotechnol. **68:**159-169.

168. **Van Aken, B., Cameron M. D., Stahl J. D., Plumat A., Naveau H., Aust S. I., and Agathos S. N.** 2000. Glutathione-mediated mineralization of $^{14}$C-labeled 2-amin-dinitrotoluene by Mn-dependent peroxidase HS from white-rot

fungus *Phanerochaete chrysosporiun*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **54:**659-664.

169. **Van Aken, B., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. I. Hatakka, H. Naveau, and S. N. Agathos.** 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. Biodegradation **10:**83-91.
170. **Van M. and Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X.R. van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Warn, T. Zacharewski**. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife // Environ. Health Perspect. - 1998. - V.106. - P.775-792.
171. **Won, W.D., L.H. DiSalvo, J. Ng.** 1976. Toxicity and Mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its Microbial Metabolites. Applied Environmental Microbiology 31:576-580.
172. **Verdin A. A., Sahraoui L-H., Durand R.** 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. International Biodeterioration & Biodegradation 53: 65-70.
173. **Vorbeck C., Hiltrud L. et al.** (2000) Initial Reductive Reaction in Aerobic Microbial Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol.64 (1): 246-252.
174. **Waksman S. A.** Soil fungi and their activities. – Soil., Sci 1916, 2, #1, p. 103-105.
175. **Walker, J. E., and D. L. Kaplan.** 1992. Biological degradation of explosives and chemical agents. Biodegradation **3:**369-385.
176. **Warcup S.H.** The soil-plate method for isolation of fungi from soil-Nature, 1950, 166, #4502, p. 117.

177. **Weber R.W.S., Mosbach D. and Anke H.** (2002) 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) tolerance and biotransformation potential of microfungi isolated from TNT– contaminated soil. Environmental Biotechnology and Enzimes.

178. **Webera R., Hagenmaiera H., Schrenka D., Schmitza H.-J., Hagenmaiera A.** Polyfluorinated dibenzodioxins and dibenzofurans-synthesis, analysis, formation and toxicology / // Chemosphere. - 1995. - V.30, Iss.4. - P.629-639.

179. **Weston, R.F., Inc.** 1993. Windrow composting demonstration for explosives-contaminated soils at the Umatilla Depot Activity. Hermiston. CETHA-TS-CR-93043.

180. **Wikstorm E., Tysklind M., Marklund S.** Influence of Variation in Combustion Conditions on the Primary Formation of Chlorinated Organic Micropollutants during Municipal Solid Waste Combustion / Environ. Sci. Technol. - 1999. - V.33, Iss.23. - P.4263-4269.

181. **Williams C. N.** Spore size in relation to culture conditions.- Trans. Brit. mycol. Sos., 1959, 42, #2, p. 213-222.

182. **Yanders A.F., Orazio C.E., Puri R.K., S. Kapila**. On translocation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: time dependent analysis at the Times Beach experimental site/ // Chemosphere. - 1989. - V.19, Iss.1-6. - P.429-432.

183. **Yateem A., Balba M. T., Al-Awadhi H, El-Nawawy A. S.** (1998) White-rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. Enviroment Int 24:181-187.

184. **Yufit S.S**. Is there any connection between the Toxicity of Polychlorynated Polyaromatic Compounds with their Solubility in Water // Organohalogen Compounds. - 1997. - V.33. - p.165-168.

185. **Антонюк В. В., Позняков С. П., Ермаков С. П.** 1997.Современные подходы к интегральной оценке изменений состояния здоровья населения под воздействием неблагоприятных факторов внешней среды // Тропцентр 98. Медицинская экотоксикология и экологическая химия диоксинсодержащих экотоксикантов. Книга 2, часть III / Под. ред. В.С. Румака и Н.А. Клюева. - Б.м., - 372 с.

186. **Билай В.И., Э.З. Коваль.** 1988. Аспергиллы. Киев.Наукова думка.

187. **Бочаров Б. В., Шадрин Ю. Н.** 1996. Поражение биоты в результате массированного применения гербецидов в военных целях в южном Вьетнаме // Отдаленные биологические последствия войны в южном Вьетнаме / Под ред. В.Е Соколова, С.А. Шилова. - М.: Б.м., - С.17-35.

188. **Высочин В. И.** 1989. Диоксины и родственные соединения. - Новосибирск: ГПНТБ СО АН СССР, - 153 с.

189. **Горленко М. В.** 1976. Жизнь растений. Москва Просвещние. Т.2.ст.380-387.

190. **Дудка Н.А. и др.** 1982. Методы экспериментальной микологии. ст. 439.

191. **Звягинцев Д.Г. и др.** 1980. Методы почвенной микробиологии и биохимии из. Моск. Унив. ст.12.

192. **Клюев Н. А.** 1996. Контроль суперэкотоксикантов в окружающей среде и источники их появления // ЖАХ. - - Т.51, №2. - С.163-172.

193. **Куценко С. А.** 2002. Основы токсикологии. Санк-Петербург.

194. **Литвинов.** 1967. Определитель микроскопических почвенных грибов, Ленинград.

195. **Наумова Р. П., Амерханова Н. Н.,** 1979 г. Изучение первого этапа превращениа TNT под действием *Pseudomonus denitrificans.* ./ Прикл. Биохимия и микробиология. т. 15, № 1.

196. **Пидопличко Н.М., Милько А.А.** 1971. Атлас мукоральных грибов., Киев.

197. **Сидоров Д. Г., Борзенков И.А., и др**. 1997 г. Полевой эксперимент по очистке почви от невтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмав. Прикл. Биохимия и микробиология. т. 33, № 5.

198. **Стабникюва Е. В., Селезнева М. В. и др**. 1995 г. Выбор активного микроорганизма-деструктура углеводородов для очистки нефтезагрязненых почв. Прикл. Биохимия и микробиология. т. 31, № 5. 534-539.

199. **Филатов Б.Н., Данилина А.Е., Михайлова Г.М., Киселева М.Ф**. 1997. Диоксин / - М.: Вторая типография ФУ "МБ и ЭП", -134с.

200. **Фомин, Г. С., Фомин, А. Г.** 2001. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Москва, ВНИИ стандарт.

201. **Фритц Дж., Шенк Г.** 1978. Количественный Анализ, Москва, «Мир», 557.

202. **Шелепчиков А.А.** Загрязнения окружающей среды олихлорированными дибензо-п-диоксинами и диоксиноподобными веществами. http://www.dioxin.ru/history/dioxin-info.htmГлавная страница, 6-7с.

203. **Школник Р.Я., Дман Н.Г., Костылев В. Н.** 1961.Хроматографическое разделение продуктов метаболизма на фракции . – Биохимия, Т 26, В4 С. 621-625.