

0-734005-1

На правах рукописи

ЯКОВЛЕВА ГАЛИНА ЮРЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА НА ШТАММЫ *BACILLUS SUBTILIS SK1*
И *PSEUDOMONAS FLUORESCENS B-3468***

03.00.07 – микробиология



АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2003

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Б.М. Куриненко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Д.Г. Ишмухаметова

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Г.И. Эль-Регистан

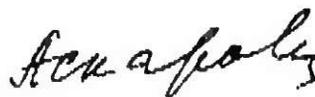
Ведущая организация: Военный университет радиационной,
химической и биологической защиты,
г. Москва

Защита состоится 24.04. 2003 г в 14³⁰ на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан 19 мая 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
кандидат биологических наук



А.Н. Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Нитроароматические соединения традиционно используют в качестве взрывчатых веществ и сырья для производства красителей, синтетических полимеров и растворителей. Они известны так же как избирательно действующие лекарственные препараты и пестициды. Большинство из них высокотоксичные и трудноразлагаемые неприродные соединения, относящиеся к числу экологически опасных веществ.

Одним из представителей полинитроароматических соединений является 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ) – вещество, отличающееся выраженными токсическими свойствами и устойчивостью к биодegradации. С увеличением уровня производства ТНТ, вызванного потребностями военных, возрастает значение ремедиации мест производства ТНТ, оказывающего вредное влияние на окружающую среду.

В настоящее время наряду с физическими и физико-химическими способами детоксикации отходов, загрязненных ТНТ, разрабатываются подходы для их биоремедиации с использованием микроорганизмов: грибов (Fernando et al., 1990; Hawari et al., 1999), анаэробных (Boopathy, Kulpaing, 1992; Boopathy et al., 1993) и аэробных бактерий (Наумова с соавт., 1979; Наумова с соавт. 1988; Boopathy et al., 1994; Kalafut et al., 1998).

Механизм биотрансформации ТНТ аэробными и аэротолерантными микроорганизмами интенсивно исследуется (Boopathy et al., 1994; Fuller, Manning, 1997; French et al., 1998; Kalafut et al., 1998; Наумов с соавт., 1998, 1999; Hawari et al., 2000; Esteve-Nunez et al., 2001; Зарипов с соавт., 2002; Zaripov et al., 2002). Установлены различия в стратегии трансформации ксенобиотика аэробными грамотрицательными и грамположительными бактериями (Kalafut et al., 1998). Вместе с тем, вопрос о механизмах его токсического действия на микроорганизмы – деструкторы вообще и на наиболее чувствительные к токсическому действию ТНТ аэробные грамположительные бактерии в частности, остается открытым.

Токсическое действие различных веществ может не только подавлять жизнеспособность микроорганизмов, но и вызывать их метаболическую адаптацию к новым условиям существования, механизмы которой могут быть разнообразными. В основе адаптации микроорганизмов к токсическим веществам нередко лежит использование как специальных ферментов детоксикации, так и различных ферментных систем обмена веществ клетки. Количество и последовательность использования ферментных систем для детоксикации будут зависеть от совокупности их свойств и, в частности, от устойчивости ферментов к инактивирующему (ингибирующему) действию ксенобиотика и от значения каталитической константы в реакциях превращения ксенобиотика как субстрата. Исходя из этого логично предположить, что концентрация ТНТ может оказать репарационное значение на его трансформацию той или иной ферментной системой клетки, что, возможно, и определяет осо-

бенности, так называемой, стратегии трансформации. Адаптационные процессы не ограничиваются реакциями детоксикации, а затрагивают целый ряд морфофизиологических показателей клеток (Пронин с соавт., 1982; Мулюкин с соавт., 1996; Мулюкин с соавт., 1997; Мулюкин, 1998). Влияние токсических концентраций ТНТ на морфо-физиологические показатели клеток микроорганизмов-деструкторов практически не исследованы несмотря на то, что такие исследования имеют несомненное теоретическое и практическое значение.

Цель и задачи исследования. В связи с вышеизложенным целью работы является оценка токсического действия различных концентраций ТНТ на морфофизиологические и физические свойства клеток грамположительного штамма *Bacillus subtilis SK1* и на стратегию трансформации ксенобиотика в сравнении с известным грамотрицательным штаммом-деструктором ТНТ *Pseudomonas fluorescens B-3468*.

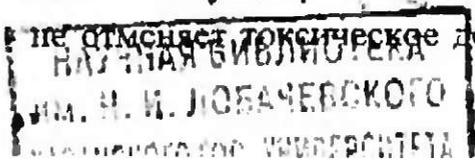
В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

1. Установить характер воздействия различных концентраций ТНТ на рост, морфологические и физические свойства клеток *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468* и на деструкцию ксенобиотика исследуемыми штаммами.
2. Оценить влияние ТНТ на некоторые физиологические показатели штаммов *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468*.
3. Определить природу продуктов, характеризующих стратегию трансформации различных концентраций ТНТ штаммами *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468*.
4. Оценить возможность использования неспецифического стимулятора метаболизма - РНКазы *Bacillus intermedius* для стимуляции роста *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468* и их способность трансформировать ТНТ.

Научная новизна работы. Установлено, что все исследованные концентрации ТНТ токсичны для *B. subtilis SK1*. При низких концентрациях ТНТ (20 мг/л) в среде культура сохраняет активный метаболизм и жизнеспособность. После элиминации ТНТ из среды культивирования бактерии переходят к активному росту. Токсическое действие концентраций нитроарила превышающих 50 мг/л проявляется в подавлении роста культуры, уменьшении количества колониеобразующих клеток, снижении скорости утилизации глюкозы и потреблении кислорода, уменьшении количества восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов и окисленных флавиновых кофакторов.

Впервые установлено, что концентрации ТНТ превышающие 50 мг/л вызывают изменения структурно-морфологических особенностей клеток (уменьшение размеров и увеличение удельной плотности), а также увеличение их термостабильности.

Установлено, что неспецифический стимулятор метаболизма бактерий - РНКазы *Bacillus intermedius* (биназа) не отменяет токсическое действие ТНТ и не



стимулирует элиминацию ксенобиотика.

Впервые показано изменение стратегии трансформации ксенобиотика одним и тем же грамположительным штаммом в зависимости от концентрации ТНТ. Установлено, что при концентрации ксенобиотика 20 и 50 мг/л в культуральной жидкости преобладают продукты нитровосстановления (ПНВ), а при концентрации выше 50 мг/л при незначительном количестве ПНВ в среде культивирования начинают накапливаться нитриты. Увеличение количества нитритов при неизменной концентрации продуктов нитровосстановления свидетельствует об использовании клеткой ферментативных систем, приводящих к образованию продуктов трансформации ТНТ не содержащих аминогрупп, и, следовательно, к изменению стратегии трансформации ксенобиотика. Переключение стратегии трансформации зависит от длительности контакта клеток с ксенобиотиком. С увеличением длительности контакта порог переключения смещается в область более низких концентраций ТНТ.

Значимость работы. Изменение стратегии трансформации ТНТ, связанное с изменением токсического пресса ксенобиотика, впервые описано в данной работе для аэробного грамположительного штамма *B. subtilis SK1*. Выяснение механизмов переключения представляет интерес для фундаментальной науки. Вероятность такого переключения следует учитывать также при использовании грамположительных бактерий или микробиологического сообщества для биodeградации отходов, содержащих ТНТ.

На примере грамположительного штамма *B. subtilis SK1* впервые установлено, что токсическое действие ТНТ сопровождается уменьшением размеров и увеличением показателя преломления (удельной плотности) клеток. Эти данные целесообразно учитывать при определении кинетических параметров роста бактерий в условиях токсического пресса. Пренебрежение этими данными при определении кинетических параметров роста бактерий, выращиваемых в условиях токсического пресса, может привести к некорректным выводам если эти параметры сформулированы на основе оптической плотности культуры.

Впервые показано, что ТНТ в токсических концентрациях увеличивает термостабильность аэробных грамположительных бактерий. Наряду с уменьшением размеров и увеличением показателя преломления (удельной плотности) клеток это является свидетельством структурно – функциональных перестроек клеток в условиях токсического пресса.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на итоговых научных конференциях КГУ (1997, 1998, 1999, 2002); Всесоюзной конференции "Биотехнология и биофизика микробных популяций" (Алма-Ата, 1991); Всесоюзного симпозиума "Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Сев.Прикаспия" (Оренбург, 1991); II Республиканская научная конференция молодых ученых и специалистов (Казань, 1996); XI Всероссийской конференции

"Ферменты микроорганизмов" (Казань, 1998); XII юбилейной конференции "Ферменты микроорганизмов" (Казань, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает в себя разделы: введение, материалы и методы исследований, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список используемой литературы. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунком и 5 таблицами. Цитируемая литература включает 191 источник, из них 143 – работы иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Микроорганизмы, среды и условия культивирования

Объектом исследования служили штаммы *Bacillus sp. SK1*, в дальнейшем определенный как *B. subtilis SK1*, и *Ps. fluorescens B-3468* из музея кафедры микробиологии КГУ, выделенные из почв, загрязненных ТНТ.

Инокулят выращивали в колбах на МПБ 16-18 ч при 30°C и вносили в среду культивирования до конечной концентрации $4 \cdot 10^7$ кл./мл. Культивирование вели в колбах на 250 мл на встряхивателе "Лавр 30" при 120 об./мин на синтетической среде следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.25; NaCl – 0.5; глюкоза – 3.0; фосфатный буфер (0.2 М KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 , pH 7.0) – 4 % (об./об.). Для репрессии спорообразования в среду добавляли 20 % (об./об.) МПБ и 6 % (об./об.) глюкозы.

ТНТ, предварительно растворенный в этаноле, вносили перед автоклавированием в подогретую до 80°C среду до конечной концентрации 20 – 200 мг/л.

РНКазу *Bacillus intermedius* (КФ 3.1.4.23) выделяли по известному методу (Голубенко с соавт., 1979) и использовали электрофоретически гомогенный препарат с удельной активностью $1.6 \cdot 10^6$ опт.ед/мг. Фермент в концентрациях от 10^{-7} – 10^{-1} мг/мл вносили одновременно с инокулятом.

2. Микробиологические методы

О концентрации биомассы судили по оптической плотности, измеряемой на фотоколориметре КФК-2-УХЛ4.2 при длине волны 670 нм, и по общему количеству клеток. Подсчет общего количества бактериальных клеток велся в камере Горяева.

Жизнеспособность микроорганизмов определяли путем подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

Термоустойчивость микроорганизмов определяли при подсчете числа клеток, оставшихся жизнеспособными после прогрева клеточных суспензий (0.5 мл) 10 мин при 80°C в ультратермостате.

Микроскопические наблюдения проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss Jena (ГДР) с фазово-контрастным устройством. Размеры клеток популяции опреде-

ляли с помощью окуляр-микрометра (Методы общей бактериологии, 1983).

Для расчета удельной плотности клеток использовали фотометрическое определение показателя преломления бактерий экстраполяционно-графическим методом (Фихман, 1967).

Окраска спор проводилась по Шеферу – Фултону (Методы общей бактериологии, 1983).

Количество поглощенного клетками кислорода определяли газометрическим методом в аппарате Варбурга (Семихатова, Чулановская, 1965).

3. Химические и биохимические методы

Для определения ТНТ использовали метод, основанный на цветной реакции ТНТ с Na_2SO_3 в щелочных условиях (Лурье, Рыбникова, 1974).

Для интегральной оценки количества продуктов нитровосстановления (ПНВ) использовали способность альдегидов, в том числе и ароматических, взаимодействовать с восстановленными азотсодержащими соединениями (Каррер, 1962). Суммарное количество ПНВ определяли с помощью цветной реакции с п-диметиламинобензальдегидом по методике, описанной Наумовой с соавт. (1983).

Для выделения и идентификации метаболитов 0.5 л отделенной центрифугированием (10 мин, 8000 g) от клеток культуральной жидкости и экстрагировали дважды 1 л диэтилового эфира. Объединенный экстракт высушивали безводным раствором Na_2SO_4 и отгоняли под вакуумом при 50° , перерастворенный в диэтиловом эфире осадок разделяли на пластинках Silufol UV 254 (150 x 150 мм) в системах растворителей: 1) бензол – хлороформ – этанол (63 : 30 : 7); 2) бензол – диоксан – уксусная кислота (90: 25: 4). Хроматограммы проявляли экспозицией в УФ-свете.

Нитриты определяли по общепринятой методике с реактивом Грисса (Hanson, Phillips, 1981).

Концентрацию глюкозы определяли ферментативным методом (Bergmeyer et al., 1974).

Количество окисленных и восстановленных кофакторов определяли спектрофлуориметрически (Harrison, Chance, 1970; Лукьянова с соавт., 1982) на спектрофлуориметре "SIGNE – 4M" (г. Рига).

Нитроредуктазную активность регистрировали спектрофотометрически при 340 нм (Bryant, DeLuca, 1991) и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{\text{NAD(P)H}} 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность РНКазы *Bacillus intermedius* определяли по накоплению кислото-растворимых продуктов гидролиза РНК (Лещинская с соавт., 1980).

4. Статистическая обработка результатов

Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе "Microsoft Excel". В работе все эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадра-

тическое отклонение σ в ней не превышало 13 %. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ТНТ на рост и деструктивные свойства *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468*. В экспериментах использовался широкий диапазон концентраций ТНТ - от 20 до 200 мг/л. Внесение ксенобиотика в среду культивирования оказывало ингибирующее действие на рост *B. subtilis SK1* (Рис. 1). Рост *B. subtilis SK1* на среде с ТНТ в концентрации 20 мг/л наблюдался начиная с 4 ч культивирования, после элиминации нитроарила из среды культивирования. В средах с более высокими концентрациями ксенобиотика так же отмечалось достоверное увеличение оптической плотности, однако, это увеличение было значительно меньше, чем в контроле.

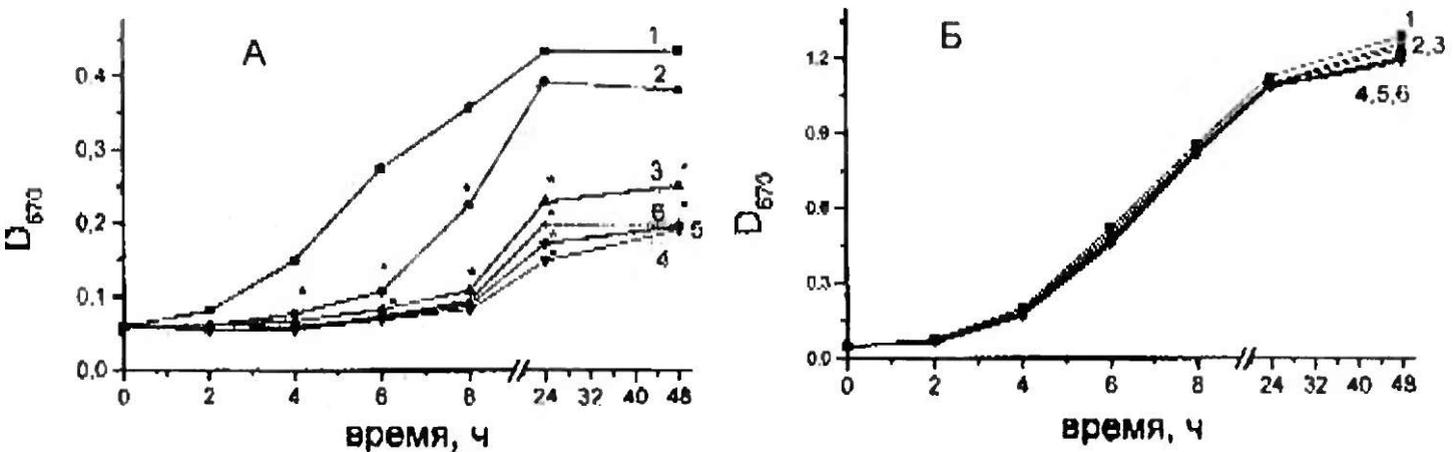


Рис. 1. Динамика роста *B. subtilis SK1* (А) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) при различных концентрациях ксенобиотика: 1 - контр. без ТНТ; 2 - ТНТ 20 мг/л; 3 - 50 мг/л; 4 - 100 мг/л; 5 - 150 мг/л; 6 - 200 мг/л. На этом и последующих рисунках достоверные отличия от контроля ($P < 0,05$) обозначаются *.

В отличие от чувствительной к токсическому действию ТНТ *B. subtilis SK1* известный штамм-деструктор *Ps. fluorescens B-3468* способен расти в присутствии всех исследованных нами концентраций нитроарила. Следует отметить, что рост штамма (увеличение оптической плотности среды культивирования и общего количества клеток) на средах с ксенобиотиком достоверно не отличался от роста культуры в контрольном варианте.

Несмотря на чувствительность *B. subtilis SK1* к токсическому действию ТНТ, она обладала способностью к элиминации ксенобиотика из среды культивирования - к 24 ч культивирования полностью при исходной концентрации 20 и 50 мг/л и к 48 ч на 40, 24 и 18 % при начальной концентрации 100, 150 и 200 мг/л соответственно. Штамм *Ps. fluorescens B-3468* так же к 24 ч полностью элиминировал ТНТ из среды

культивирования с исходной концентрацией 20 и 50 мг/л и к 48 ч на 93, 62 и 46 % при начальной концентрации 100, 150 и 200 мг/л соответственно. Скорость элиминации ТНТ из среды культивирования обоих штаммов не зависела от концентрации нитроарила. Причем следует отметить, что в первые 2 ч наблюдалось резкое снижение концентрации ТНТ в среде культивирования *B. subtilis SK1* при всех концентрациях ксенобиотика. Скорость элиминации ТНТ из среды культивирования *Ps. fluorescens B-3468* в этот промежуток времени приблизительно в 7 раз ниже, чем *B. subtilis SK1*. Это, вероятно, связано с тем, что удельная нитроредуктазная активность *B. subtilis SK1* (0.041 ± 0.002 ммоль \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$) в 2 раза выше удельной нитроредуктазной активности *Ps. fluorescens B-3468* (0.022 ± 0.003 ммоль \cdot мин $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$).

Принимая во внимание чувствительность *B. subtilis SK1* к токсическому действию ТНТ было определено влияние различных концентраций ксенобиотика на общее число и количество колониобразующих клеток исследуемого штамма (Рис. 2). Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о том, что элиминация ксенобиотика происходит в вариантах с концентрациями ТНТ (100, 150 и 200 мг/л), уменьшающими количество колониобразующих клеток при достоверно не изменяющемся их общем количестве. Следовательно, трансформировать ксенобиотик способны не только колониобразующие клетки. Во-вторых, рост значений оптической плотности сред культивирования, содержащих ТНТ в концентрациях, препятствующих увеличению общего количества клеток, не связан с ростом культуры.

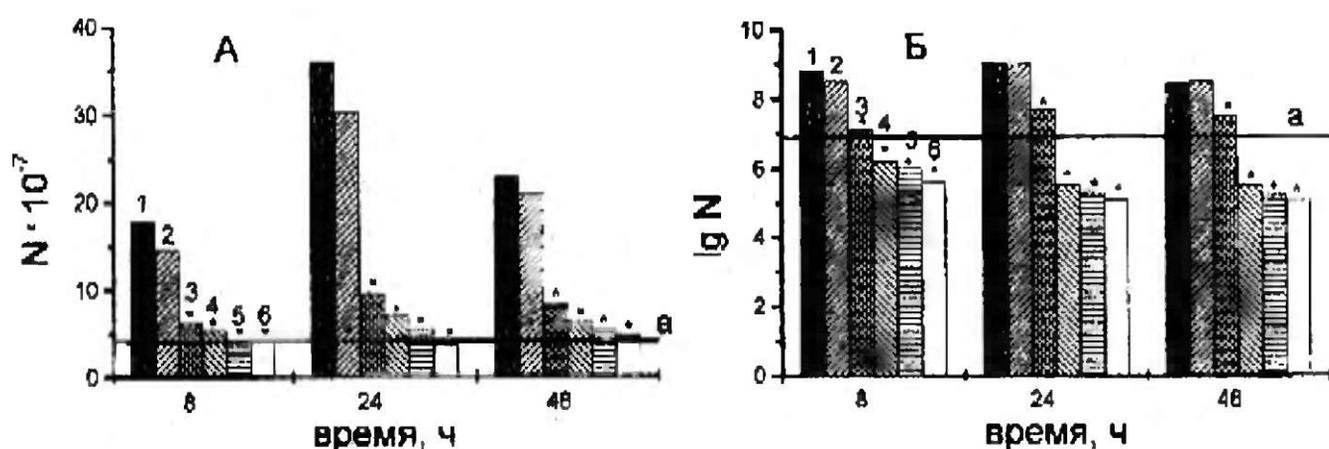


Рис. 2. Общее число (А) и количество колониобразующих клеток (Б) *B. subtilis SK1* при росте культуры на синтетической среде с различными концентрациями ТНТ: 1 - контр. без ТНТ; 2 - ТНТ 20 мг/л; 3 - 50 мг/л; 4 - 100 мг/л; 5 - 150 мг/л; 6 - 200 мг/л, а - количество клеток в нулевой момент времени.

Влияние ТНТ на морфологические и физические свойства клеток *B. subtilis SK1*. Чтобы объяснить увеличение оптической плотности при культивировании *B. subtilis SK1* в присутствии токсических концентраций ксенобиотика были опреде-

лены физические параметры клеток исследуемого штамма.

Из представленных на рис.3 данных видно, что в вариантах опыта с концентрацией ТНГ 100 - 200 мг/л размеры клеток достоверно ниже, чем в контроле. Наименьшие размеры характерны для клеток, культивируемых в среде с концентрацией ксенобиотика 150 и 200 мг/л.

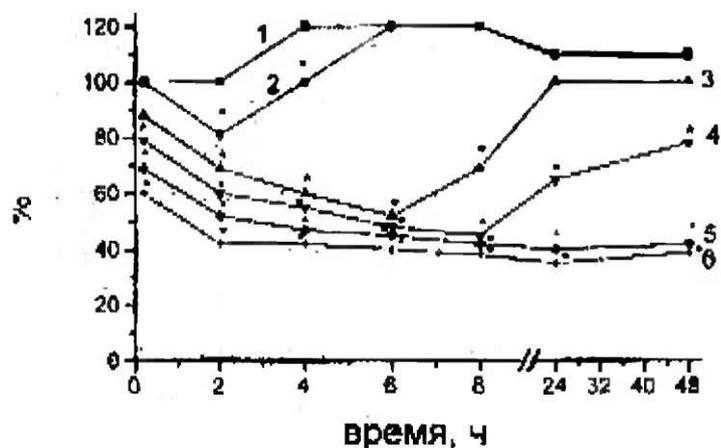


Рис. 3. Изменение размеров клеток *B. subtilis SK1* при росте культуры на синтетической среде с различными концентрациями ТНГ: 1 — контр. без ТНГ; 2 — ТНГ 20 мг/л; 3 — 50 мг/л; 4 — 100 мг/л; 5 — 150 мг/л; 6 — 200 мг/л. За 100% взят размер клеток инокулята.

Уменьшение размеров клеток в среде культивирования содержащей ТНГ в концентрациях 100 - 200 мг/л не согласуется с увеличением оптической плотности. В связи с этим был определен показатель преломления клеток (табл. 1). Из данных таблицы видно, что показатель преломления клеток, культивируемых с ТНГ, выше показателя преломления и удельной плотности клеток в контроле. При микроскопировании живых несокращенных препаратов в проходящем свете большинство клеток опытных вариантов более контрастны, чем клетки контроля.

Таблица 1.

Влияние ТНГ на показатель преломления и удельную плотность клеток *B. subtilis SK1*

Время, ч	Среда	Показатель преломления	Удельная плотность клетки, г/см ³
0,25	СС	1,390 ± 0,005	1,0778 ± 0,0002
	СС+ТНГ (200мг/л)	1,385 ± 0,001	1,0705 ± 0,0001
24	СС *	1,395 ± 0,001	1,0848 ± 0,0001
	СС+ТНГ (200мг/л)	1,408 ± 0,005	1,1028 ± 0,0007
	СС ₁	1,382 ± 0,002	1,0668 ± 0,0004

Примечание: СС — синтетическая среда; СС₁ — для репрессии спорообразования в синтетическую среду добавляли 20% МПБ и 6% глюкозы; * — наличие в пробе спор.

Известно, что споры обладают более высоким показателем преломления (удельной плотностью) по сравнению с вегетативными клетками (Фихман, 1967) и характеризуются высокой термостабильностью. Споры обнаруживались при микроскопировании препаратов, окрашенных для обнаружения спор в контроле на 24 ч и в средах с концентрацией ТНТ 20 – 50 мг/л на 48 ч культивирования. Поэтому небольшое увеличение коэффициента преломления и удельной плотности клеток в контроле на 24 ч культивирования, вероятно, обусловлено вкладом в эти показатели физических свойств спор. Это предположение подтверждается и тем, что показатель преломления и удельная плотность клеток, выращенных на среде репрессирующей спорообразование, ниже значений этих показателей клеток исходного инокулята. В вариантах опыта с ТНТ в концентрации 100-200 мг/л споры не были обнаружены вплоть до 48 ч культивирования. Тем не менее, мы сравнили термоустойчивость клеток *B. subtilis SK1* выросших в присутствии высоких концентраций ТНТ с клетками контроля. Из полученных данных следует, что уже на 6 ч клетки, культивируемые в присутствии 100 – 200 мг/л ТНТ более термоустойчивы по сравнению с клетками контроля, и в особенности с клетками, выросшими в условиях подавления спорообразования.

Таким образом, на примере грамположительного штамма *B. subtilis SK1* нами впервые установлено, что токсическое действие ТНТ сопровождается уменьшением размеров и увеличением показателя преломления (удельной плотности) и термостабильности клеток. Такие изменения клеток *B. subtilis SK1*, культивируемых в присутствии высоких концентраций ТНТ, а так же отсутствие спор при микроскопировании окрашенных препаратов, сближает их с так называемыми цистоподобными рефрактерными клетками (ЦРК) (Пронин с соавт., 1982; Мулюкин с соавт., 1996; Мулюкин, 1998). ЦРК, в том числе и ЦРК бацилл, образуются в неблагоприятных для роста бактерий условиях под действием внутри- и внеклеточных факторов анабиоза, имеющих структуру алкилоксибензолов (факторы d_1). Таким образом, представленные нами данные свидетельствуют о том, что токсическое действие ТНТ на клетки *B. subtilis SK1* нельзя характеризовать как тривиальное снижение жизнеспособности клеток. Описанные изменения в свойствах клеток носят скорее адаптивный характер и, возможно, являются следствием воздействия на клетки непосредственно ТНТ или индуцируемых им факторов.

Влияние ТНТ на некоторые физиологические показатели штаммов *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468*. Изучение влияния ксенобиотика на процесс потребления глюкозы велось на средах содержащих две крайние из испытанных ранее концентраций ТНТ (20 мг/л и 200 мг/л). Как видно из рис. 4 наиболее активное потребление глюкозы из среды отмечалось в течение первых двух часов культивирования *B. subtilis SK1*, затем скорость утилизации заметно снижалась. Начиная с 4 ч культивиро-

вания в среде с концентрацией ТНТ 200 мг/л глюкоза практически перестала утилизироваться. В среде с концентрацией ТНТ 20 мг/л скорость потребления глюкозы начиная с 6 ч (момента полной элиминации ТНТ и началом роста культуры) вновь возрастала. Потребление глюкозы штаммом *Ps. fluorescens B-3468* замедлялось в присутствии ТНТ в концентрации 200 мг/л. Однако, к 8 ч культивирования скорости потребления глюкозы в присутствии испытанных концентраций ТНТ были равны показателям контроля.

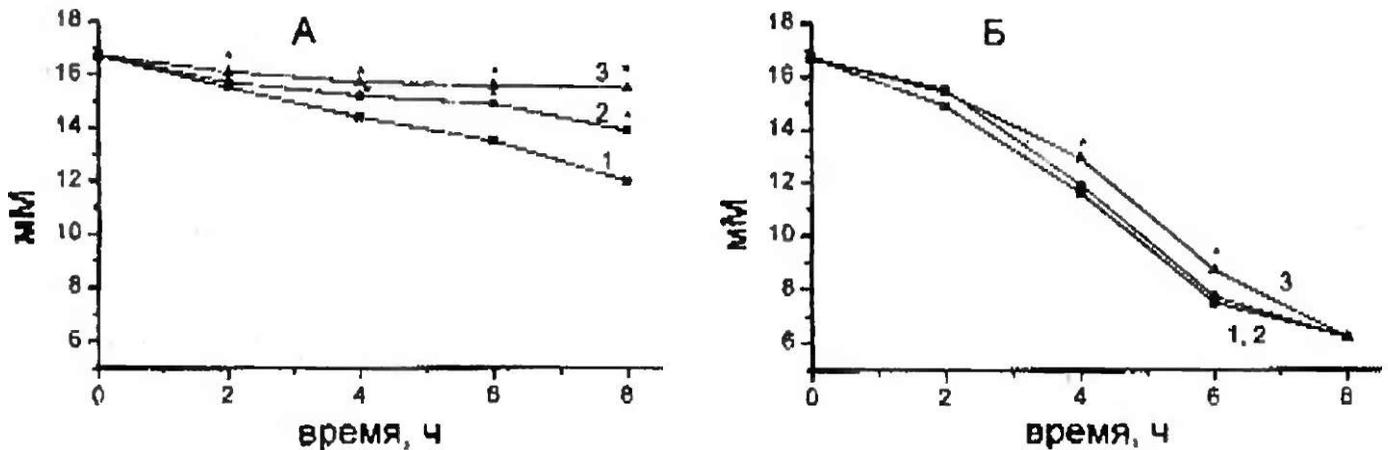


Рис. 4. Динамика утилизации глюкозы при росте *B. subtilis SK1* (А) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) на синтетической среде с различными концентрациями ТНТ: 1- контр. без ТНТ; 2- ТНТ 20 мг/л; 3 - 200 мг/л.

Также как и потребление глюкозы ТНТ подавлял и потребление кислорода *B. subtilis SK1*. Так эндогенное дыхание в присутствии 50 мг/л (удельная концентрация $1,25 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{M}/\text{кл.}$) и 100 мг/л (удельная концентрация $2,5 \cdot 10^{-7}$ $\mu\text{M}/\text{кл.}$) ниже, чем в контроле в среднем на 11% и 36 % соответственно. В отличие от *B. subtilis SK1* присутствие тех же концентраций ксенобиотика (50 и 100 мг/л) интенсифицировало потребление кислорода штаммом *Ps. fluorescens B-3468*. Так количество потребленного кислорода при этих концентрациях нитроарила за 90 мин выше на 26 и 29 % соответственно, чем в контроле (эндогенное дыхание).

Внесение в реакционную смесь в качестве субстрата глюкозы (4 μM) привело к интенсификации дыхания обоих штаммов: *B. subtilis SK1* в среднем на 75 % по сравнению с эндогенным дыханием, а *Ps. fluorescens B-3468* - на 102 % (Рис. 5). Присутствие в реакционной смеси ТНТ достоверно не снижало интенсивность дыхания нечувствительного к токсическому действию ксенобиотика *Ps. fluorescens B-3468*. В противоположность этому потребление кислорода *B. subtilis SK1* резко снижалось после внесения в реакционную смесь ТНТ.

Таким образом, ТНТ подавляет как утилизацию глюкозы, так и дыхание штамма *B. subtilis SK1*, стимулирует эндогенное дыхание *Ps. fluorescens B-3468* и не оказывает достоверного эффекта на дыхание штамма в присутствии экзогенной глюкозы.

Высокая концентрация ТНТ (200 мг/л) замедляет утилизацию глюкозы *Ps. fluorescens* B-3468.

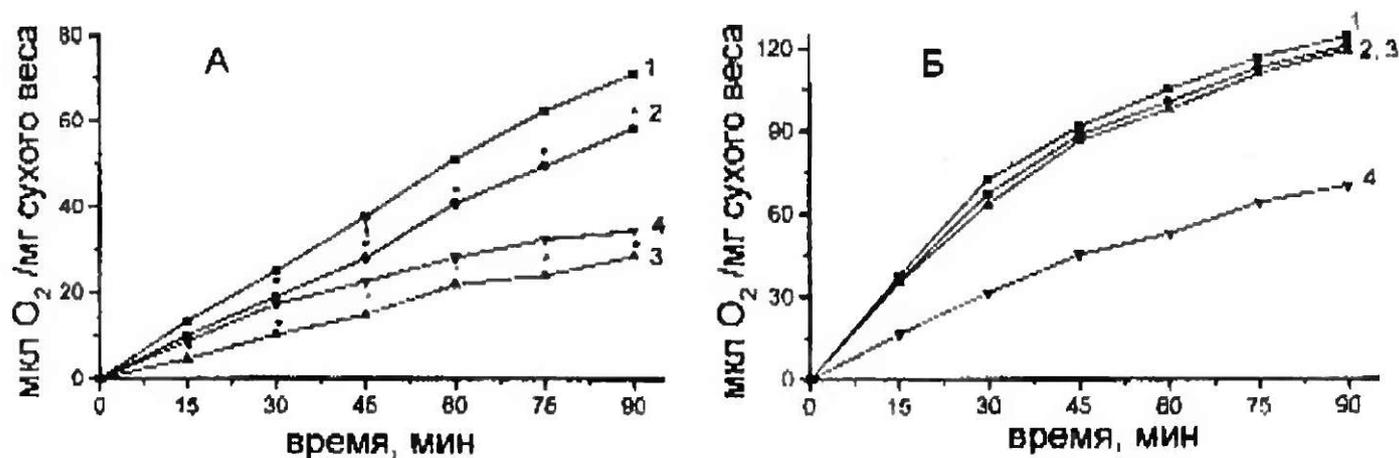


Рис. 5. Влияние ТНТ на потребление кислорода *B. subtilis* SK1 (А) и *Ps. fluorescens* B-3468 (Б) в присутствии глюкозы (4 μM): 1 - контр.(глюкоза); 2 - глюкоза + ТНТ 50 мг/л (удельная концентрация $1.25 \cdot 10^{-7}$ мкМ/кл); 3 - глюкоза + ТНТ 100 мг/л (удельная концентрация $2.5 \cdot 10^{-7}$ мкМ/кл); 4 - эндогенное дыхание; ↓ - ТНТ в среде не определяется.

Так как в процессах дыхания и утилизации глюкозы образуются восстановленный НАД (НАДФ) и окисленный ФАД (ФМН), а так же учитывая участие кофакторов в процессе трансформации ТНТ - образовании продуктов нитровосстановления (Наумова с соавт., 1983; Spain, 1995; Kalafut et al., 1998; Наумов с соавт., 1998, 1999) - в следующей серии экспериментов была определена их динамика в клетках *B. subtilis* SK1 и *Ps. fluorescens* B-3468, культивируемых в присутствии ТНТ.

Динамика исследуемых кофакторов в контрольных вариантах *B. subtilis* SK1 и *Ps. fluorescens* B-3468 характерна для метаболизирующей культуры в период активного роста (Евтодискко, Акименко, 1998) (Рис. 6). В присутствии 20 мг/л ТНТ интенсивность снижения количества восстановленного НАД (НАДФ) в клетках *B. subtilis* SK1 выше, чем в контроле, однако, при этом отмечалось и резкое снижение (вплоть до 4 ч культивирования) количества окисленного ФАД (ФМН) (Рис. 6 А). Такой характер динамики кофакторов в присутствии 20 мг/л ТНТ обусловлен, вероятно, тем, что в течение первых 4 ч культивирования восстановленный НАД (НАДФ) используется для образования продуктов нитровосстановления, при этом наблюдается также выраженное подавление системы окисления ФАД (ФМН). Последнее обстоятельство дает основание предполагать блокирование системы переноса водорода на хиноны дыхательной цепи. После элиминации ТНТ из среды культивирования содержание окисленного ФАД (ФМН) возрастало, что соответствует переходу культуры к активному росту и наряду с восстановлением потребления глюкозы свидетельствует об обратимости ингибирования активности ключевых дегидрогеназ окисления глюкозы и сис-

темы переноса водорода на хиноны дыхательной цепи.

В присутствии 200 мг/л ТНТ падение содержания восстановленного НАД (НАДФ) и окисленного ФАД (ФМН) еще более значительно. Подобная динамика кофакторов, более значительное подавление потребления глюкозы и уменьшение количества жизнеспособных клеток свидетельствуют о более сильном и длительном воздействии этой концентрации ТНТ на этапы редокс-системы, ингибируемые ксенобиотиком уже в концентрации 20 мг/л.

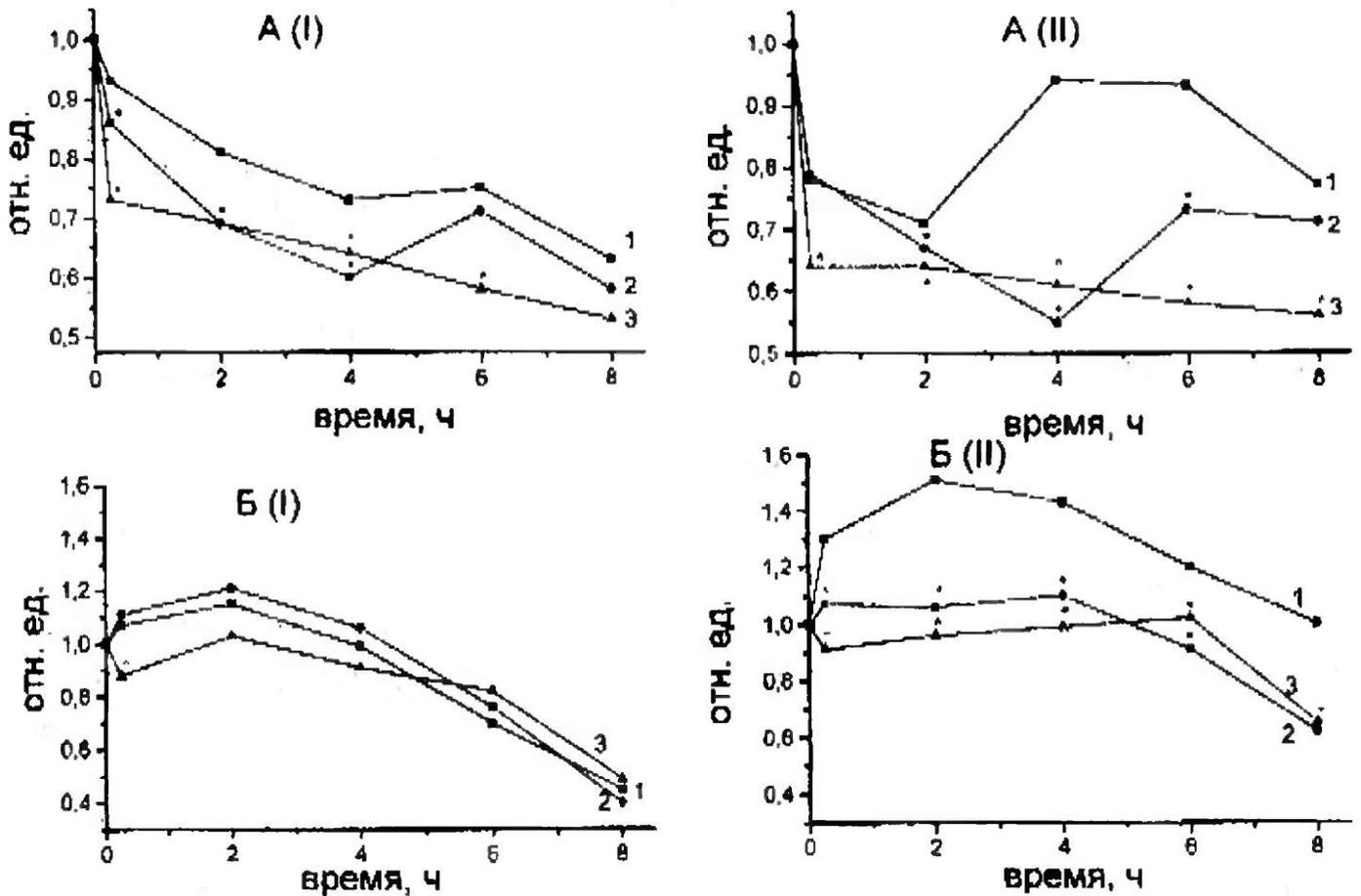


Рис. 6. Динамика восстановленного НАД (НАДФ) (I) и окисленного ФАД (ФМН) (II) в клетках *B. subtilis SK1* (A) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) при росте культур на синтетической среде с различными концентрациями ксенобиотика: 1- контр. без ТНТ; 2- ТНТ 20 мг/л; 3- 200 мг/л.

ТНТ в концентрации 20 мг/л не влиял на динамику восстановленного НАД (НАДФ) в клетках *Ps. fluorescens B-3468*, но даже в этой концентрации значительно снижал содержание окисленного ФАД (ФМН) по сравнению с контрольным вариантом (Рис. 4 Б). В присутствии ТНТ в концентрации 200 мг/л в первые 15 мин культивирования, так же как и у *B. subtilis SK1*, наблюдалось снижение как восстановленного НАД (НАДФ), так и окисленного ФАД (ФМН). Такую динамику кофакторов можно объяснить либо использованием восстановленного ФАД (ФМН) в процессе трансформации ТНТ, либо так же как и у *B. subtilis SK1* ингибированием системы переноса во-

дорода на хиноны дыхательной цепи. Отсутствие подавления дыхания не исключает использование части восстановленного ФАД (ФМН) на восстановление ТНГ. Так же как и в случае с *B. subtilis SK1* динамика кофакторов и динамика утилизации глюкозы соответствует росту культуры *Ps. fluorescens B-3468* в присутствии ТНГ.

Таким образом, внесение в среду культивирования ТНГ подавляет образование восстановленного НАД (НАДФ) и окисленного ФАД (ФМН), а так же утилизацию глюкозы и дыхание грамположительного штамма *B. subtilis SK1*. Это обстоятельство является косвенным свидетельством ингибирования ТНГ и (или) его метаболитами ключевых дегидрогеназ окисления глюкозы *B. subtilis SK1* о котором сообщалось ранее Паумовым с соавт. (1999) и Суворовой (1999) для лактобацилл.

Отсутствие подавления роста и потребления кислорода штаммом *Ps. fluorescens B-3468* в присутствии ТНГ можно было бы расценить как нечувствительность культуры к токсическому действию ксенобиотика. Однако замедление скорости потребления глюкозы и более низкое содержание восстановленного НАД (НАДФ) при концентрации ТНГ 200 мг/л и более низкое содержание окисленного ФАД (ФМН) во всем диапазоне концентраций ксенобиотика в среде культивирования является следствием токсического действия нитроарила и в отношении этой бактерии.

Определение продуктов, характеризующих стратегию трансформации различных концентраций ТНГ клетками *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468*. Обосновывая цель настоящего исследования мы высказали предположение, что концентрация ксенобиотика может играть решающее значение в процессе его трансформации той или иной ферментной системой клетки, что, возможно, и определяет особенности, так называемой, стратегии трансформации. Проверка этого предположения возможна путем сравнения относительных концентраций метаболитов, наиболее однозначно характеризующих стратегию трансформации различных концентраций ксенобиотика – продуктов нитровосстановления (ПНВ) и нитритов – при росте *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468* на среде с различными концентрациями ксенобиотика.

Из данных, представленных на рис. 7, видно, что при культивировании *B. subtilis SK1* в среде с начальной концентрацией ТНГ 20 и 50 мг/л в культуральной жидкости преобладали продукты нитровосстановления. При концентрации нитроарила 20 мг/л их количество достигало максимального значения к 4 ч, после чего начинало медленно снижаться. При концентрации ТНГ 50 мг/л максимальное количество ПНВ наблюдалось на 8 ч культивирования.

При культивировании *B. subtilis SK1* в среде с начальной концентрацией ТНГ выше 100 мг/л в культуральной жидкости, наоборот, преимущественно накапливались нитриты. Ко 2 ч в среде появлялось незначительное количество продуктов нитровосстановления, концентрация которых сохранялась на постоянном уровне в течение всего эксперимента.

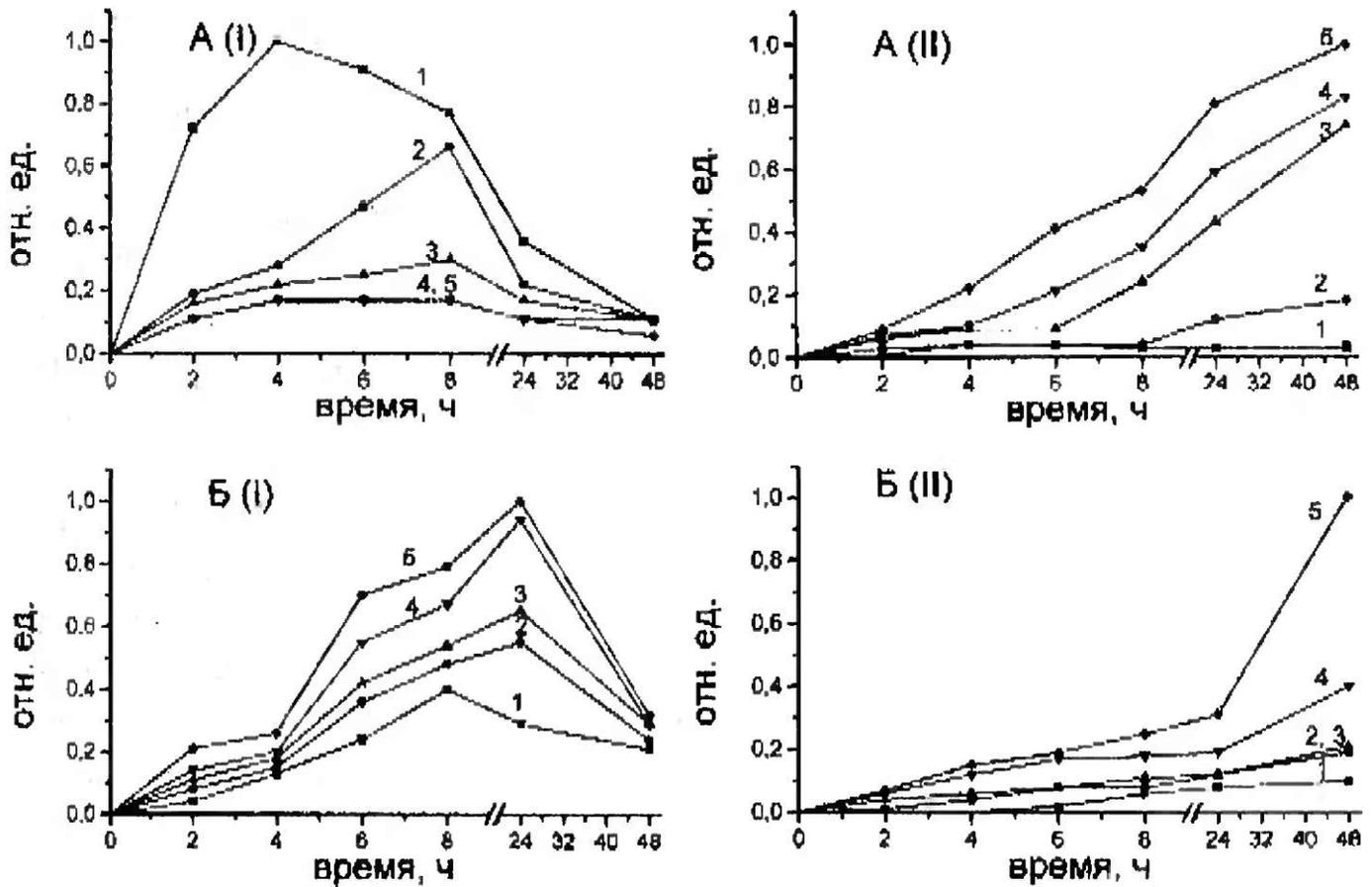


Рис. 7. Динамика образования ПНВ (I) и нитритов (II) при росте *B. subtilis SK1* (А) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) на синтетической среде с различными концентрациями ТНТ: 1- 20 мг/л; 2- 50 мг/л; 3- 100 мг/л; 4- 150 мг/л; 5- 200 мг/л.

Наиболее интенсивное уменьшение количества ПНВ на 8 ч культивирования отмечалось в диапазоне концентраций ТНТ от 50 мг/л до 100 мг/л. Очевидно, что в этом диапазоне концентраций происходило инактивирование (ингибирование) системы редукции *B. subtilis SK1*. С увеличением концентрации ксенобиотика количество нитритов возрастало, что свидетельствует об изменении стратегии трансформации ТНТ (в диапазоне концентраций 100 – 150 мг/л) с преимущественного образования ПНВ на образование продуктов трансформации не содержащих аминогрупп, образование которых сопровождается появлением свободных нитритов. Эти данные подтверждаются и тем фактом, что при хроматографическом разделении продуктов трансформации ТНТ на 8 ч культивирования в экстрактах проб с начальной концентрацией ксенобиотика 20 мг/л из двух известных моноаминопроизводных ТНТ обнаруживался лишь 2-амино-4,6-динитротолуол, а при начальной концентрации 200 мг/л - два не идентифицированных нами метаболита, R_f которых не совпадает ни с моноамино- с диаминопроизводными. Резкое падение количества колониеобразующих клеток (Рис.2Б) в диапазоне концентраций ТНТ 50 - 100 мг/л (при дальнейшем увеличении концентрации ксенобиотика снижение количества колониеобразующих клеток менее

выражено) находится в соответствии со снижением активности системы редукции и снижением способности к образованию ПНВ.

На 48 ч культивирования изменение стратегии трансформации происходит при более низких концентрациях нитроарила (около 50 мг/л). Это свидетельствует о том, что при более длительном контакте клеток с ксенобиотиком инактивация (ингибция) системы редукции смещается в область более низких концентраций ТНТ.

В отличие от чувствительного к токсическому действию ТНТ шт. *B. subtilis SK1*, при культивировании шт. *Ps. fluorescens B-3468* количество продуктов нитровосстановления увеличивалось в зависимости от начальной концентрации ТНТ в среде культивирования (Рис. 7Б). Их количество достигало максимума на 8 час культивирования при начальной концентрации ТНТ 20 мг/л и на 24 час при всех остальных концентрациях. Параллельно с накоплением ПНВ в культуральной жидкости обнаруживалось незначительное количество нитритов, концентрация которых достигла максимального значения на 48 час культивирования на среде с начальной концентрацией ТНТ 200 мг/л, когда культура находилась в стационарной фазе роста, а ТНТ в среде сохранялся (107 мг/л). Однако, количество свободных нитритов в среде культивирования *Ps. fluorescens B-3468* в абсолютных единицах в несколько раз меньше, чем при культивировании *B. subtilis SK1* при тех же концентрациях ксенобиотика. Так на 24 и 48 часы культивирования *B. subtilis SK1* на синтетической среде с начальной концентрацией ТНТ 200 мг/л в культуральной жидкости накапливалось $31,5 \pm 0,3$ и $39,0 \pm 0,2$ μM нитритов соответственно, в то время как при культивировании *Ps. fluorescens B-3468* при той же начальной концентрации ксенобиотика лишь $3,4 \pm 0,2$ и $10,3 \pm 0,2$ μM нитритов соответственно.

Факт образования нитритов в культуральной жидкости на 48 час культивирования *Ps. fluorescens B-3468* в среде с начальной концентрацией ТНТ 200 мг/л и накопление нитритов при высоких концентрациях ТНТ (100 – 200 мг/л) на протяжении всего времени культивирования *B. subtilis SK1* подтверждает наше предположение о том, что в образовании нитритов существенную роль играют неблагоприятные условия культивирования – токсические концентрации ТНТ в случае *B. subtilis SK1* или высокие концентрации ксенобиотика в сочетании с переходом культуры в стационарную фазу роста в случае *Ps. fluorescens B-3468*.

Ранее для *Pseudomonas savastanoi* уже была показана возможность использования той или иной стратегии трансформации ксенобиотика в зависимости от среды культивирования (Martin et al., 1997). В работе Заришова с соавторами (2002) на примере *Candida sp. AN-L14* была показана возможность реализации механизма восстановления нитрогруппы молекулы ТНТ с образованием 2- и 4- гидроксиламинодинитротолуолов и альтернативного механизма атаки молекулы ТНТ – восстановление ароматического кольца с образованием гидридного комплекса Мейзенгеймера (Н-ТНТ). Причем аэрация стимулировала продукцию Н-ТНТ, тогда как стационарные ус-

ловия способствовали накоплению гидроксиламинодинитротолуолов. Однако переключение стратегии трансформации с восстановительного пути на денитритацию, связанное с интенсивностью токсического пресса ксенобиотика, впервые описано нами для аэробной грамположительной бактерии. Изменение стратегии трансформации можно объяснить следующим образом. Во-первых, возможно система ферментов восстановительного пути трансформации каталитически более эффективна по сравнению с ферментами ведущими денитритацию. Поэтому в отсутствие токсического пресса трансформация ксенобиотика идет по восстановительному пути, что мы наблюдаем при культивировании *Ps. fluorescens B-3468* на всех исследуемых концентрациях ТНТ и *B. subtilis SK1* при низких концентрациях нитроарила (20 и 50 мг/л). Во-вторых, не исключено, что система редукции, обеспечивающая реализацию восстановительного пути трансформации (или ее отдельные элементы) более чувствительна к инактивирующему (ингибирующему) действию ТНТ или его метаболитов. На фоне токсических концентраций ксенобиотика, подавляющих активность системы редукции, к процессу трансформации ТНТ подключается менее эффективная, но более стабильная система денитритации ксенобиотика. Поэтому при высоких концентрациях нитроарила (выше 50 мг/л) в среде культивирования *B. subtilis SK1* наблюдается накопление нитритов в среде.

Известны четыре пути трансформации нитроариллов, формально удовлетворяющих феноменологии трансформации ТНТ *B. subtilis SK1* при высоких концентрациях ксенобиотика – трансформация с участием оксигеназ (Spain, 1995), редукционное отщепление нитрогруппы (Duque et. al., 1993), превращение ароматического кольца, сопровождающееся отщеплением нитрогруппы (Vorbeck et. al., 1998), редукционная денитритация с участием сульфгидрильных групп (Murphy et al., 1982; Renner, Nguyen, 1984). Какой из этих путей реализует *B. subtilis SK1* для высоких концентраций ТНТ неизвестно и требует дальнейших исследований. Однако, очевидно, что “выбор” стратегии трансформации с преимущественным образованием продуктов нитровосстановления или элиминацией нитрогруппы зависит от исходной концентрации ТНТ, от чувствительности ферментов системы редукции к токсическому действию ТНТ или продуктам его превращения и наличия ферментов (ферментных систем), способных обеспечить альтернативную стратегию трансформации ксенобиотика.

Влияние неспецифического стимулятора роста РНКазы *Bacillus intermedius* на рост *B. subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468* и на их способность трансформировать ТНТ. Принимая во внимание токсичность ксенобиотика и снижение способности клеток *B. subtilis SK1* его трансформировать была предпринята попытка снятия токсического эффекта ТНТ в отношении *B. subtilis SK1* и интенсификации процессов трансформации нитроарила исследуемыми штаммами с помощью стимуляции роста и метаболической активности клеток микроорганизмов внеклеточной щелочной РНКазой.

зой *Bacillus intermedius* (биназой), так как известно, что в зависимости от условий культивирования и физиологического состояния бактерий фермент способен стимулировать как рост (Колпакон, Куприянова-Ашина, 1992; Егоров с соавт., 1994; Куприянова-Ашина с соавт., 1995; Кипенская с соавт., 1998), так и специальные функции микроорганизмов (Егоров с соавт., 1995, 1996; Наумова с соавт., 1996; Егоров с соавт., 1999).

Формальный анализ кинетических параметров роста *B. subtilis SK1* в присутствии РНКазы позволяет интерпретировать их изменение основываясь на представлении об интенсификации ферментом метаболических процессов исследуемой культуры (Рис. 8). Изменения удельной и валовой скоростей роста культуры в присутствии фермента свидетельствуют о более интенсивном использовании жизненно необходимых компонентов среды. Об интенсификации биназой метаболических процессов говорит и факт стимуляции ферментом потребления кислорода и глюкозы.

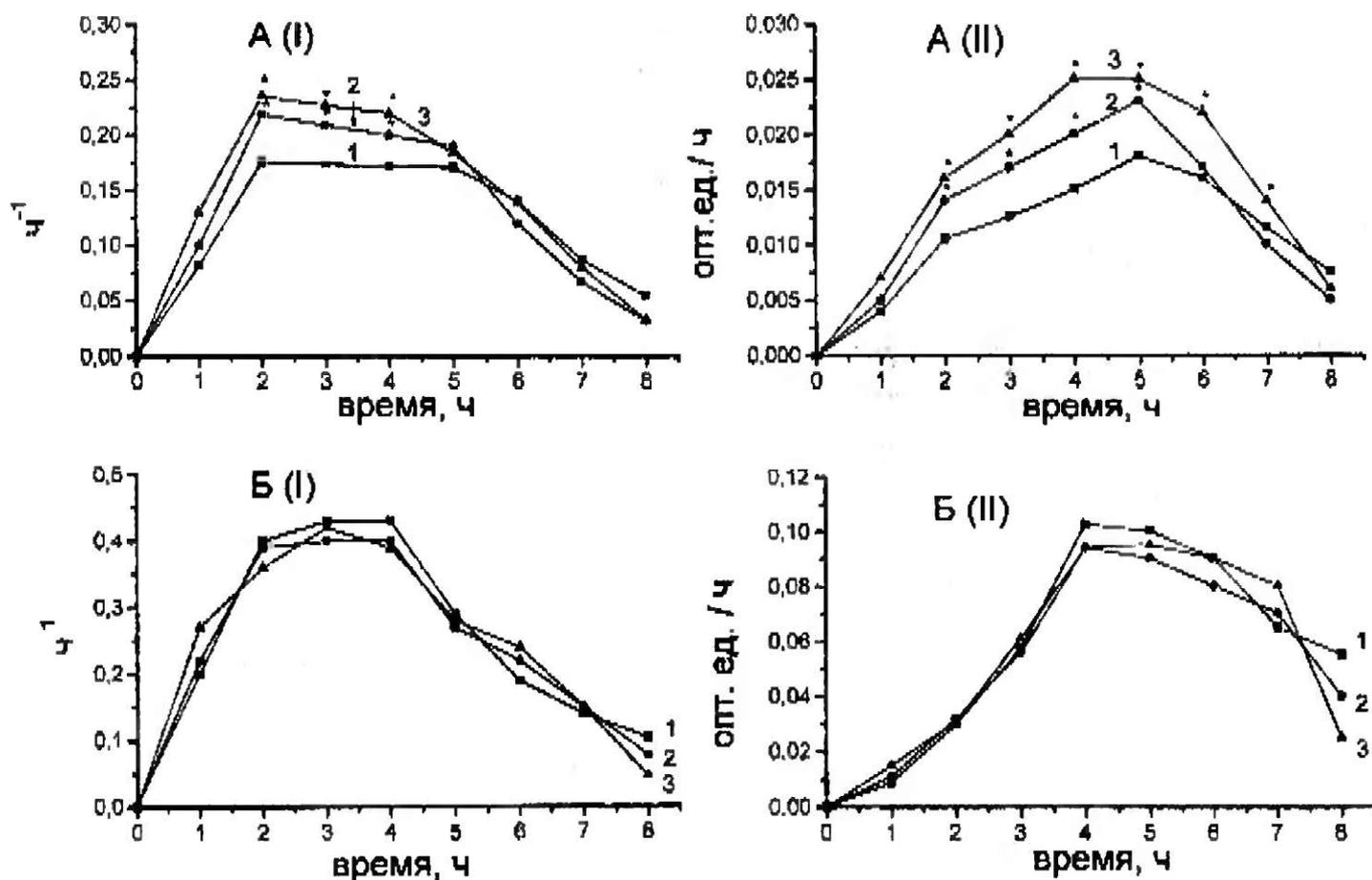


Рис. 8. Скорость роста *B. subtilis SK1* (А) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) на синтетической среде с различными концентрациями РНКазы: I- удельная скорость; II- валовая скорость; 1- контр. без РНКазы; 2- РНКазы 10⁻² мг/мл; 3- 10⁻¹ мг/мл.

В отличие от *B. subtilis SK1* внесение РНКазы в среду культивирования штамма *Ps. fluorescens B-3468* не оказывало существенного влияния на рост культуры. Из рис. 6 видно, что как удельная, так и валовая скорости роста в контрольном и в опытных вариантах достоверно не отличаются. Эти данные хорошо соответствуют отсутствию

влияния биназы на процесс потребления кислорода и глюкозы. Следовательно, в отличие от грамположительного штамма *B. subtilis SK1* РНКазы не оказывает стимулирующего действия на метаболические процессы клеток *Ps. fluorescens B-3468* и не стимулирует рост культуры.

Стимуляция роста *B. subtilis SK1*, а так же процессов дыхания и потребления глюкозы свидетельствует о стимуляции анаболических процессов и, как следствие, интенсификации метаболизма восстановленных кофакторов. Этот вывод предполагает возможность использования биназы в качестве стимулятора роста *B. subtilis SK1* в присутствии ксенобиотика и стимулятора её способности элиминировать ТНТ.

Внесение фермента в среду культивирования *B. subtilis SK1* с начальной концентрацией ТНТ 20 мг/л привело к стимуляции роста культуры в опытных вариантах (Рис. 9). Однако эта стимуляция отмечалась лишь начиная с 4 часа культивирования после элиминации ТНТ из среды.

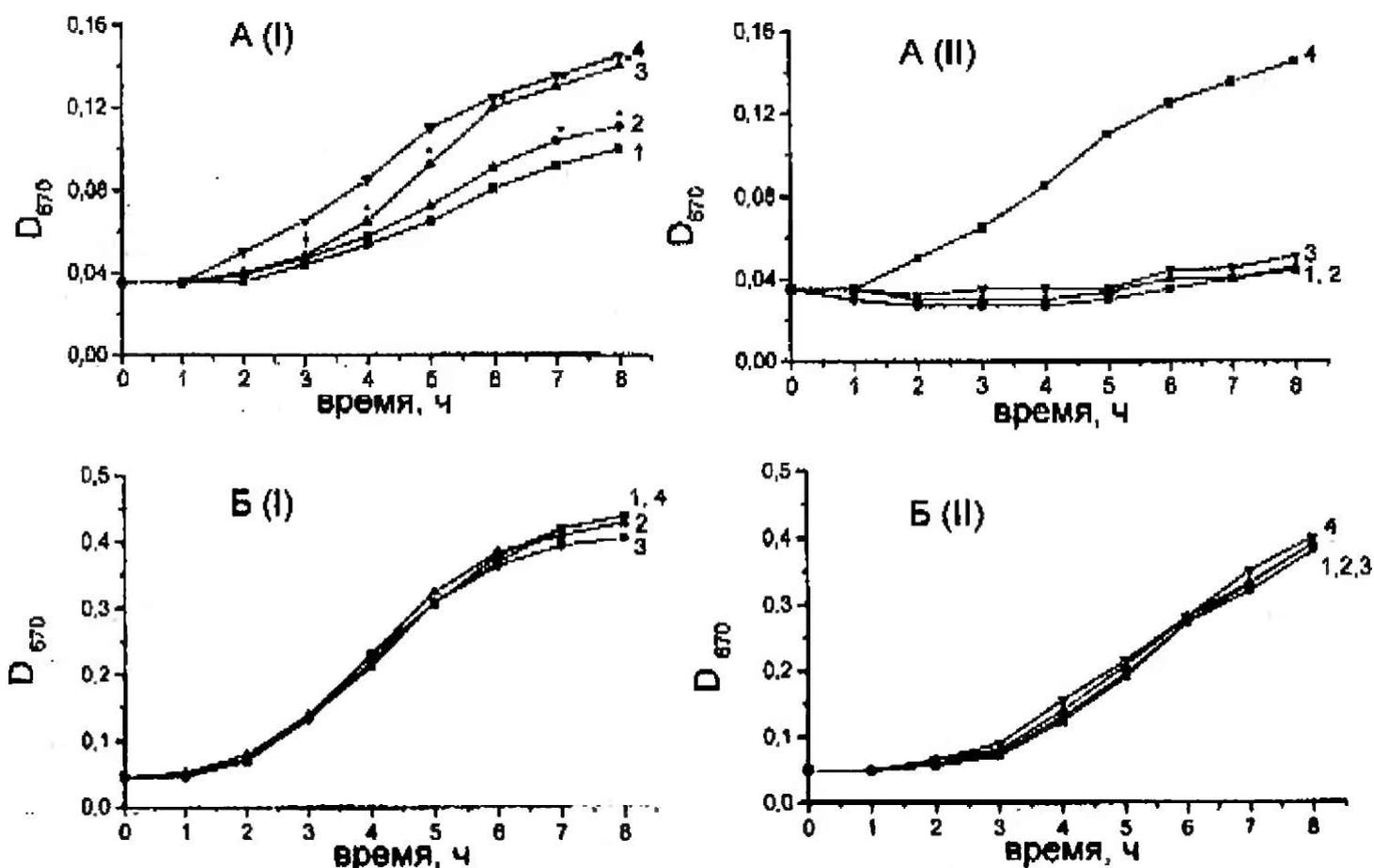


Рис. 9. Влияние РНКазы на рост *B. subtilis SK1* (А) и *Ps. fluorescens B-3468* (Б) на синтетической среде с различными концентрациями ТНТ: I - 20 мг/л; II - 200 мг/л; 1 - контр. (с ТНТ); 2 - ТНТ + РНКазы 10^{-2} мг/мл; 3 - ТНТ + РНКазы 10^{-1} мг/мл; 4 - контр. (без РНКазы и ТНТ); ↓ - ТНТ в среде не определяется.

Скорость элиминации ксенобиотика в присутствии фермента не изменялась. Характер роста культуры при концентрации ТНТ 200 мг/л в присутствии биназы не отличался от контроля, содержащего ТНТ. Это свидетельствует о том, что биназа не

снимает токсическое действие ТНТ в отношении штамма *B. subtilis SK1*, не влияет на скорость элиминации нитроарила и не способна контролировать ключевые реакции метаболизма в присутствии ксенобиотика.

Так же как и на среде без ТНТ, так и на среде с ксенобиотиком, внесение РНКазы не оказало стимулирующего действия на рост шт. *Ps. fluorescens B-3468* и не влияло на скорость элиминации ТНТ из среды культивирования.

Таким образом, как биназа, так и ТНТ оказывают влияние на ключевые этапы метаболизма клеток *Bacillus sp. SK1*. Однако при совместном действии на клетки эффекты ксенобиотика доминируют. Неспособность фермента отменить эти эффекты свидетельствует об отсутствии у него конкурентных взаимоотношений с ТНТ на уровне мишеней.

ВЫВОДЫ

1. 2, 4, 6 – тринитротолуол в концентрациях 20 - 200 мг/л ингибирует рост грамположительного штамма *Bacillus subtilis SK1*. Ингибирующий эффект ксенобиотика зависит от его концентрации. В отличие от чувствительного к токсическому действию 2, 4, 6 – тринитротолуола штамма *Bacillus subtilis SK1* известный грамотрицательный штамм-деструктор *Pseudomonas fluorescens B-3468* способен расти при всех исследованных концентрациях нитроарила.
2. На примере грамположительного штамма *Bacillus subtilis SK1* впервые установлено, что токсическое действие 2, 4, 6 – тринитротолуола сопровождается уменьшением размеров и увеличением показателя преломления (удельной плотности) и термостабильности клеток. Изменения физических параметров клеток требуют осторожности в оценке кинетических параметров роста культуры по оптической плотности в присутствии ксенобиотика.
3. 2, 4, 6 – тринитротолуол ингибирует потребление кислорода и глюкозы штаммом *Bacillus subtilis SK1*. Подавление потребления глюкозы в присутствии различных концентраций ксенобиотика совпадает с угнетением роста культуры. 2, 4, 6 – тринитротолуол не влияет на потребление кислорода штаммом *Pseudomonas fluorescens B-3468*. Концентрация ксенобиотика 200 мг/л замедляет скорость потребления глюкозы штаммом *Pseudomonas fluorescens B-3468*.
4. В присутствии 2, 4, 6 – тринитротолуола в клетках *Bacillus subtilis SK1* снижается количество восстановленных никотинамидадениндинуклеотидов и окисленных флавиновых кофакторов. Токсический эффект высоких концентраций 2, 4, 6 – тринитротолуола (200 мг/л) в отношении *Pseudomonas fluorescens B-3468* проявляется в снижении количества этих кофакторов в клетках штамма.
5. Штаммы *Bacillus subtilis SK1* и *Ps. fluorescens B-3468* способны трансформировать 2, 4, 6 – тринитротолуол. Скорость элиминации ксенобиотика из среды культивирования исследуемыми штаммами не зависит от начальной концентрации нитроарила.

Скорость элиминации 2, 4, 6 – тринитротолуола *Bacillus subtilis SK1* в первые часы культивирования превышает скорость элиминации ксенобиотика *Pseudomonas fluorescens B-3468*.

6. Впервые показана способность грамположительного штамма *Bacillus subtilis SK1* переключать стратегию трансформации 2, 4, 6 – тринитротолуола с восстановительного пути при низких концентрациях на элиминацию нитрогрупп при высоких концентрациях. Штамм *Pseudomonas fluorescens B-3468* элиминирует нитрогруппы только в стационарной фазе роста при высоких концентрациях ксенобиотика (200 мг/л).

7. Неспецифический стимулятор метаболизма бактерий – РНКаза *Bacillus intermedius* – не отменяет токсическое действие 2, 4, 6 – тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis SK1* и не стимулирует элиминацию ксенобиотика штаммами *Bacillus subtilis SK1* и *Pseudomonas fluorescens B-3468*.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Влияние токсических концентраций 2,4,6 – тринитротолуола на физические свойства и морфологию клеток *Bacillus subtilis SK1* // Прикл. биохим. и микробиол. -2003, № 2.
2. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Особенности токсического эффекта 2,4,6 – тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis SK1* // Прикл. биохим. и микробиол. - 2003, № 4.
3. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. 2,4,6 – тринитротолуол блокирует стимулирующее действие РНКазы *Bacillus intermedius* по отношению к штамму *Bacillus sp. SK1* // Деп. ВИНТИ, 14.01.2002, 60-В2002, - 15с.
4. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Влияние различных концентраций 2,4,6 – тринитротолуола на стратегию его трансформации штаммом *Bacillus sp. SK1* // Деп. ВИНТИ, 14.01.2002, 59-В2002, - 19с.
5. Яковлева Г.Ю., Абреимова Ю.В., Куриненко Б.М. Влияние экзогенной РНКазы *Bacillus intermedius* на рост *Bacillus megaterium* и ее способность трансформировать 2,4,6 – тринитротолуол // Сборник докладов XI Всероссийской конференции “Ферменты микроорганизмов”. – Казань, 1998. - С. 220-226.
6. Дениварова Н.А., Яковлева Г.Ю., Абреимова Ю.В., Куриненко Б.М. Влияние концентрации 2,4,6- тринитротолуола на использование *Bacillus sp.SK1* различных ферментативных систем его трансформации // Сборник докладов XII юбилейной конференции “Ферменты микроорганизмов”. – Казань, 2001. - С. 108-109.
7. Яковлева Г.Ю., Абреимова Ю.В., Дениварова Н.А., Зарипова С.К., Куриненко Б.М. Подавление стимулирующих эффектов рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 2,4,6-тринитротолуолом // Сборник докладов XII юбилейной конференции “Ферменты микроорганизмов”. Казань, 2001. - С. 127-129.

8. Зарипова С.К., Яковлева Г.Ю., Наумова Р.П. Бактериальное сообщество для очистки сточных вод от нитроароматических соединений / Тезисы докладов Всесоюзной конференции "Биотехнология и биофизика микробных популяций". - Алма-Ата, 1991. - С.59.
9. Зарипова С.К., Яковлева Г.Ю., Гарусов А.В. Биотехнология очистки сточных вод от нитроароматических соединений / Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума "Микробиология охраны биосферы в регионах Урала и Сев.Прикаспия". - Оренбург, 1991. - С.40.
10. Яковлева Г.Ю., Абреимова Ю.В. Влияние бактериальной РНКазы на рост и функциональную активность штамма *Pseudomonas fluorescens B-3468* / Тезисы докладов "II Республиканская научная конференция молодых ученых и специалистов". Книга I - Казань, 1996. - С.84.
11. Яковлева Г.Ю. Влияние экзогенной РНКазы *Bacillus intermedius* на рост и функциональную активность *Bacillus megaterium* / Тезисы докладов "III Республиканская научная конференция молодых ученых и специалистов". Книга I - Казань, 1998. - С.52.

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю НИЛ "Экологической биотехнологии и биомониторинга" д.б.н., проф. Наумовой Р.П. и к.б.н., с.н.с. Зариповой С.К. за плодотворное обсуждение некоторых этапов этой работы, к.б.н., с.н.с. Наумову А.В. за предоставление метчиков для хроматографии, а так же к.б.н., доц. кафедры микробиологи Захаровой Н.Г. за помощь при определении видовой принадлежности штамма *Bacillus subtilis SK1*.

