



ХИЛЯС ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

**БИОДЕГРАДАЦИЯ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА КЛЕТКАМИ
ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* В ПРИСУТСТВИИ
ФЕРРИГИДРИТА И В УСЛОВИЯХ ПОЛУНЕПРЕРЫВНОГО
РЕЖИМА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной
медицины и биологии Казанского федерального университета

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Зиганшин Айрат Мансурович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Чернов Владислав Моисеевич
(ФГБУН “Казанский институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН”, г.Казань)

кандидат биологических наук, доцент
Зарипова Сания Кашафовна
(ФГБОУ ВПО “Казанский национальный
исследовательский технологический
университет”, г.Казань)

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО “Пермский государственный
национальный исследовательский
университет”, г.Пермь

Защита диссертации состоится «28» марта 2013 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском федеральном
университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное
здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке
им. Н. И. Лобачевского при Казанском федеральном университете.

Автореферат разослан «22» февраля 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. В последнее время на состояние водных ресурсов оказывают значительное влияние не только разнообразные неблагоприятные природные явления, но и в большей мере промышленная деятельность человека, химизация сельского хозяйства, увеличение производства и применения химически синтезированных соединений, в частности нитроароматических ксенобиотиков. Масштабное использование данных соединений в технологических процессах ведет к увеличению количества отходов (Stenuit, Agathos, 2010; Singh et al., 2012).

Сброс нитроароматических соединений в реки, озера, пруды, лагуны значительно ухудшает их экологический статус, оказывая негативное влияние на живые организмы. Данные отходы могут обладать токсичностью и высокой кумулятивной способностью, а также мутагенным и канцерогенным эффектом (Frische et al., 2002; Lachance et al., 2004). Среди полинитроароматических соединений широкое распространение получил 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), который в местах производства и применения взрывчатых веществ сохраняется длительное время. В связи с этим, для снижения влияния ТНТ на объекты природной среды и человека, необходимо создание эффективных технологий локальной очистки концентрированных ТНТ-содержащих сточных вод (Wang et al., 2010; Singh et al., 2012).

Биологическая очистка является одним из универсальных методов удаления химических соединений из сточных вод. В связи с тем, что микроорганизмы, в том числе дрожжи, обладают различными ферментативными системами деструкции устойчивых ксенобиотиков, разрабатываются научные основы для их применения в процессах очистки загрязненных объектов. В последние годы большое внимание уделяется разработке биотехнологических методов обезвреживания загрязненных объектов, что в сочетании с физико-химическими подходами сопровождается снижением экологической нагрузки (Stenuit et al., 2005).

Кроме этого, объекты, загрязненные нитроароматическими ксенобиотиками, включают в себя разнообразные компоненты в состав которых может входить железо. В окружающей среде железо в основном представлено железосодержащими минералами, которые обязательно будут вовлечены в реакции трансформации в местах, загрязненных нитроароматическими ксенобиотиками (Borch et al., 2005; Hofstetter et al., 2006; Evers et al., 2008; Voparai et al., 2010). Однако недостаточно данных, показывающих микробную трансформацию ТНТ в присутствии Fe-содержащих минералов в аэробных условиях, хотя O_2 может оказывать существенное влияние на процессы окисления железа (Morgan, Lahav, 2007).

Известен ряд работ, посвященный биологической очистке ТНТ-загрязненных вод и в условиях полунепрерывного и непрерывного режимов культивирования (Rho et al., 2001; Pavlostathis, Jackson, 2002; Wang et al., 2010). Однако в данных работах имеется комплекс недостатков, в частности необходимость предварительной адаптации микроорганизмов к высоким концентрациям исходного ксенобиотика, а также отсутствие его глубокой

деструкции. В процессе биоремедиации ТНТ-загрязненных природных и сточных вод основное значение имеет степень деградации ТНТ, а также применимость реализуемых технологических схем к экологизации соответствующих промышленных производств.

Цель данной работы – оценить возможность биodeградации 2,4,6-тринитротолуола штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* AN-L15 в присутствии ферригидрита и разработать эффективный способ очистки вод, загрязненных 2,4,6-тринитротолуолом.

Основные задачи исследования:

- изучить влияние железосодержащего минерала ферригидрита на глубину деструкции 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*;
- охарактеризовать метаболиты биологической трансформации 2,4,6-тринитротолуола в присутствии и в отсутствие ферригидрита;
- выявить образование оксида азота (II) в ходе деструкции 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica* и оценить возможность его взаимодействия с активными формами кислорода;
- оценить возможность пространственного разделения и стабилизации последовательных стадий трансформации 2,4,6-тринитротолуола по пути восстановления его ароматического кольца дрожжами *Yarrowia lipolytica*;
- оптимизировать технологические параметры процесса многостадийного культивирования дрожжей и разработать эффективную схему очистки вод, загрязненных 2,4,6-тринитротолуолом, дрожжами *Yarrowia lipolytica*.

Научная новизна. В настоящей работе показано, что присутствие железосодержащего минерала ферригидрита в среде роста ведет к незначительному снижению скорости трансформации ТНТ штаммом дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15. Однако восстановление ароматического кольца ТНТ с одновременным образованием ТНТ-гидридных комплексов также протекает, как и в системах в отсутствие ферригидрита. Образование гидридных комплексов означает возможность отщепления нитрогрупп от молекулы ТНТ с последующей минерализацией исходного токсиканта. В противоположность исследованиям, в которых показано, что редукция нитрогрупп ТНТ ускорялась в присутствии экзогенного железа, в нашем случае увеличение потенциально токсичных метаболитов нитровосстановления не наблюдалось. Поэтому результаты данной работы означают, что трансформация ТНТ дрожжами через образование гидридных комплексов будет главным путем превращения исходного ксенобиотика даже в присутствии железосодержащих минералов, что будет способствовать минерализации ТНТ в объектах, содержащих повышенное количество Fe.

Методом ЭПР-спектроскопии удалось зафиксировать образование оксида азота (II) в ходе деструкции ТНТ клетками дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15. Кроме того, рост штамма в присутствии ТНТ сопровождался генерацией супероксидного радикала с возможным последующим формированием пероксинитрита и пероксиазотистой кислоты.

Для адекватного моделирования процесса биодеструкции ТНТ в условиях полунепрерывного культивирования возникла необходимость пространственного разделения и стабилизации последовательных стадий трансформации ТНТ по пути восстановления ароматического кольца. Пространственное разделение, коррелирующее со сдвигами рН среды и с визуализацией специфичных метаболитов, реализовано на базе установки, состоящей из трех биореакторов и соответствующего оборудования. Существенным отличием предлагаемого способа многостадийного культивирования штамма дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в присутствии ТНТ является высокая эффективность биodeградации ТНТ и его метаболитов за короткий промежуток времени.

Практическая значимость. Штамм дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 осуществляет деструкцию ТНТ в присутствии железосодержащего минерала ферригидрита, а также в условиях полунепрерывного режима культивирования, наиболее приближенного к условиям очистки промышленных сточных вод. Устойчивость штамма *Y. lipolytica* AN-L15 к высоким концентрациям ТНТ (до 880 мкМ) делает его перспективным для биологической очистки промышленных отходов, природных и сточных вод, грунтов, загрязненных нитроароматическими ксенобиотиками.

Применение предлагаемого способа способствует повышению качества и упрощению процесса биоочистки природных и сточных вод, загрязненных токсичными нитроароматическими соединениями (на примере особо устойчивого к разрушению ТНТ), сокращению времени биоремедиации, расширению области применения биотехнологий для очистки экологически опасных объектов, предотвращению загрязнения окружающей среды.

Связь работы с научными программами. Исследования поддержаны ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы” ГК 16.515.11.5043. Авторские исследования получили персональную поддержку: грант Президента РФ для обучения зарубежом (2010-2011), грант “Алгарыш” Правительства РТ (2010), именная стипендия мэра г.Казань за отличную учебу и успехи в научно-исследовательской работе (2008-2009), программа «УМНИК» (Фонд содействия малых форм предприятий в научно-технической сфере, 2011-2012).

Положения, выносимые на защиту.

1. Ферригидрит замедляет процесс трансформации 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*, однако не препятствует разрушению исходного ксенобиотика, что означает возможность осуществления биотехнологического процесса в объектах окружающей среды, обогащенных железом.
2. Установлено, что трансформация 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica* сопровождается генерацией NO и

супероксидного радикала с возможным последующим формированием пероксинитрита и пероксиазотистой кислоты.

3. Разработан эффективный многостадийный способ деструкции 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*, наиболее приближенный к условиям очистки промышленных сточных вод.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на международных научных конференциях «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии» (г.Пермь, 2007), «Ломоносов – 2007, 2009» (г.Москва, 2007, 2009), «История и достижения Казанской химической школы» (г.Казань, 2009), научно-практической конференции «Наука и инновации в решении актуальных проблем города» (г.Казань, 2009), всероссийской выставке научно-технического творчества молодежи «НТТМ-2010» (г.Москва, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность заслуженному профессору кафедры микробиологии КФУ Наумовой Римме Павловне. Автор выражает благодарность своему научному руководителю доценту кафедры микробиологии КФУ Зиганшину Айрату Мансуровичу за ценные идеи, внимательное отношение к работе, плодотворное обсуждение полученных результатов. Благодарность выражается профессору Центра инженерии биопленок Университета штата Монтана (США) Герлаху Робину за приглашение автора на стажировку по грантам Президента РФ и «Алгарыш» Правительства РТ, за предоставление экспериментального оборудования для выполнения части научно-исследовательской работы, за помощь в освоении приборов и методов, в интерпретации результатов. Благодарность выражается коллективу кафедры микробиологии КФУ за возможность получения бесценных навыков, инженеру кафедры радиоэлектроники Института физики Родионову А.А. за плодотворную работу в области ЭПР-спектроскопии, а также Имамутдинову Ф.Н. и Воробьеву Ю.Н.

Автор искренне признателен Министерством Образования и Науки Российской Федерации и Республики Татарстан за предоставление возможности выполнить часть экспериментальной работы в США. Автор выражает искреннюю благодарность семье за всестороннюю поддержку.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 26 рисунка. Цитируемая литература включает 163 источников, из них 159 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм дрожжей и условия культивирования. Эксперименты по динамике трансформации ТНТ проводили со штаммом дрожжей *Y. lipolytica*

AN-L15, выделенным из загрязненных нефтью торфяников (Лангепас, Западная Сибирь). Культуру дрожжей поддерживали в аэробных условиях на агаризованной среде Сабуро, содержащей (г/л дистиллированной воды): глюкозу – 10, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 0.25, агар – 20. Для изучения трансформации ТНТ использовали синтетическую среду, содержащую: глюкозу – 28 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7.6 мМ, MgSO_4 – 2 мМ. Фосфатный буфер (pH от 5.5 до 7.0) стерилизовали отдельно и вносили перед инокуляцией в конечной концентрации 16 мМ. ТНТ вносили из расчета 440 мкМ в растворе этанола (0.8 мл этанола в 30 мл среды). В отсутствие ТНТ в состав синтетической среды также входил этанол в том же количестве.

Для исследования динамики трансформации ТНТ дрожжи *Y. lipolytica* AN-L15 предварительно культивировали в жидкой среде Сабуро с соответствующим pH, клетки осаждали центрифугированием при $8000 \times g$ в течение 10 мин и дважды отмывали К-Na-фосфатным буферным раствором (с соответствующим pH) с последующей инокуляцией синтетических сред с тем же pH в колбах Эрленмейра на 100 мл при объеме среды 30 мл. Клетки дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 культивировали в аэробных условиях во встряхиваемых колбах (150 об/мин) при $+30^\circ\text{C}$.

Синтез ферригидрита и определение концентрации Fe. Ферригидрит ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) был синтезирован путем добавления 6 М раствора NaOH к 3.4% раствору FeCl_3 до достижения нейтральных значений pH (Borch et al., 2005). Суспензию ферригидрита вносили в синтетическую среду с ТНТ и без ТНТ в конечной концентрации 358 мг/л (пересчитанной по Fe) с доведением pH среды до конечных значений 5.5 или 7.0, используя 0.5 М HCl. Концентрацию растворенного Fe^{2+} определяли после фильтрования образцов через 0.2 мкМ фильтры (Spartan 13/0.2 RC; Whatman). 100 мкл отфильтрованного образца добавляли к 400 мкл 0.5 М HCl, перемешивали в течение 10 сек и далее инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем 20 мкл данного раствора вносили в лунку 96-луночного планшета, содержащего 200 мкл раствора феррозина. Изменение интенсивности окраски детектировали при длине волны 562 нм на спектрофотометре Biotek Synergy HT reader (BioTek, Synergy HT).

Установка для биологической очистки среды от ТНТ. На рис. 1 представлена установка для полунепрерывного культивирования дрожжей, где: 1 – первый биореактор; 2 – второй биореактор; 3 – третий биореактор; 4 – резервуар, содержащий жидкую среду с ТНТ; 5, 6, 7 – пробоотборники; 8, 9, 10 – воздухоотводы, оснащенные фильтрами; 11, 12, 13 – магнитные мешалки с подогревом; 14, 15, 16, 17 – система трубопроводов; 18, 19, 20, 21 – перистальтические насосы; 22, 23, 24 – система аэрации.

Установка состоит из однолитрового резервуара, содержащего жидкую очищаемую синтетическую среду с ТНТ (440 мкМ), и трех однолитровых стеклянных биореакторов, обернутых алюминиевой фольгой для уменьшения воздействия света. Резервуар и биореакторы последовательно соединены системой трубопроводов и оборудованы перистальтическими насосами

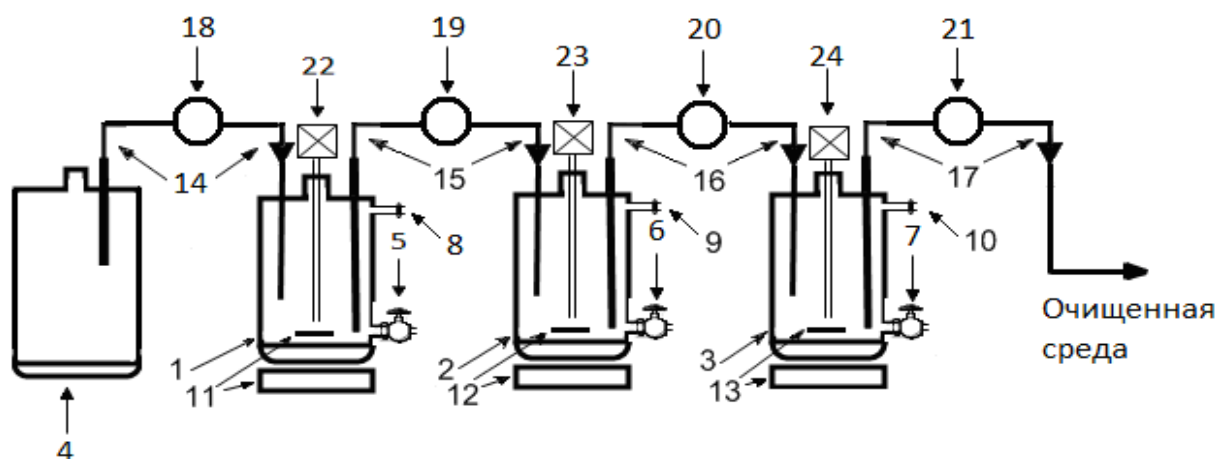


Рис. 1. Установка для очистки ТНТ-загрязненной среды.

(Masterflex Cole-Parmer) для перекачивания очищаемой среды. Каждый из биореакторов содержал около 200 мл очищаемой среды. После инициации, процесс биотрансформации ТНТ переводили в полунепрерывные условия. Очищаемую жидкость перекачивали по 10 мл в каждый биореактор каждые 2 ч в течение 2 мин. Все биореакторы оснащены системой аэрации, обеспечивающей подачу стерильного воздуха, отводящими воздух каналами с 0.22 мкМ фильтрами, пробоотборниками. Перемешивание очищаемой среды осуществляли магнитными мешалками; процесс биоочистки проводили при температуре +30°C.

Спектрофотометрия в видимой области. Спектрофотометрические измерения проводили на сканирующем двухлучевом спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, USA). Биомассу оценивали по изменению оптической плотности среды с клетками при длине волны 600 нм. Контролем служила лишенная клеток среда.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. ТНТ и продукты его трансформации анализировали высокоэффективной жидкостной хроматографией на хроматографе Series 200 (Perkin Elmer, USA) в обращеннофазовом варианте с использованием колонки Supelcosil octyl C-8 (150 × 4.6 мм; 5 мкМ) с детекцией при 254 и 476 нм (Borch et al., 2004).

Ионная хроматография. Нитрит- и нитрат-ионы определяли с помощью ионного хроматографа Dionex (USA), оснащенного предколонкой IonPac® AG9-HC (4 × 50 мм) и разделительной колонкой IonPac® AS9-HC (4 × 250 мм). Элюцию проводили 9 мМ раствором Na₂CO₃ со скоростью 1 мл/мин. В качестве стандартов для построения калибровочных графиков использовали NaNO₂ и NaNO₃.

Электронная парамагнитная резонансная спектроскопия. Оксид азота (II) (NO) определяли в среде с дрожжевыми клетками после внесения NaДЭТК (натрия N,N-диэтилдитиокарбамат; 5.8 мМ) и FeSO₄ (2.6 мМ). Затем инкубировали смесь в течение 30 мин при 37°C. Далее смесь охлаждали и добавляли 0.2 мл свежеперегнанного и предварительно насыщенного водой этилацетата. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение 3 мин и осаждали центрифугированием при 6000×g в течение 8 мин. После этого

органическую фазу вносили в кварцевые трубки с внутренним диаметром 1 мм (Sigma-Aldrich) и регистрировали спектры ЭПР на спектрометре ESP-300 (Bruker, Германия) при комнатной температуре на частоте 9,68 ГГц, мощности СВЧ излучения 50 мВт, амплитуде высокочастотной модуляции 5 Г (Fujii, Berliner, 1999). Контролем служила среда с дрожжами без ТНТ.

Детекцию супероксидного радикала ($O_2^{\cdot -}$), генерируемого при трансформации ТНТ, осуществляли с использованием гидрофобной свежеприготовленной спиновой ловушки 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-пирролидин-3,4-дикарбоновой кислоты, которую вносили в синтетическую среду с клетками дрожжей в конечной концентрации 1 мМ. Регистрацию спектров ЭПР проводили через 5 мин после внесения ловушки в образец при комнатной температуре на спектрометре ESP-300 (9.78 ГГц, 50 мВт, 1 Г). Среда без ТНТ и клеток была использована в качестве контроля. Супероксиддисмутазу использовали для подавления генерации $O_2^{\cdot -}$ в образце. Ксантин-ксантинооксидазную реакцию использовали в качестве стандартной системы для генерации $O_2^{\cdot -}$.

Рентгеновская дифрактометрия (XRD). Кристаллическую структуру синтезированного минерала ферригидрита, а также изменение структуры ферригидрита в присутствии клеток дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 определяли с использованием рентгеновского дифрактометра Scintag XGEN 4000 с трубкой Cu K α (45 кВ и 40 мА). Образцы фильтровали через целлюлозно-ацетатный фильтр (0.45 мкм) с помощью вакуумного насоса в анаэробном боксе. После фильтрации мембранные фильтры с образцами высушивали в анаэробных условиях в течение 24 ч. Далее высушенные образцы растирали пестиком в керамической ступке до получения однородного порошка. Полученные образцы сканировали от 5° до 75° со скоростью 0.8°/мин (образцы без клеток дрожжей) и 0.2°/мин (образцы, содержащие клетки дрожжей).

Сканирующая электронная микроскопия. Для визуальной оценки адсорбции ферригидрита на поверхности клеток дрожжей образцы с суспензией клеток *Y. lipolytica* отбирали после 1 ч, 10 ч и 24 ч эксперимента. Затем суспензию клеток дрожжей отмывали деионизированной водой, наносили на предметное стекло и высушивали в течение 15-20 мин. Далее образец фиксировали в смеси 2% параформальдегида и 2.5% глутаральдегида в 0.08 М PIPES буферном растворе (рН 6.8) в течение 12-15 ч при комнатной температуре. После фиксации предметные стекла промывали деионизированной водой 4 раза и дегидратацию клеток проводили поэтапно с использованием серии водно-спиртовых растворов (25%, 50%, 75%, 95% и 100%) (каждый этап 5 мин). После покрытия иридием образцы анализировали на сканирующем электронном микроскопе Zeiss Supra 55VP (Germany). Изображения высокого разрешения получали при ускоряющем напряжении 1 кВ и рабочем расстоянии 3-5 мм.

Химические реактивы. В работе использовали хроматографически чистые препараты ТНТ, 2,4-динитротолуола (2,4-ДНТ), гидроксиламино-

динитротолуолов (2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ), amino-динитротолуолов (2-АДНТ и 4-АДНТ) (химические соединения фирмы “AccuStandard”, New Haven, США). Все другие химические соединения были приобретены у компании Sigma-Aldrich.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы электронных таблиц. Результаты выражены в виде средних значений плюс-минус стандартное отклонение ($n=3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Трансформация ТНТ клетками дрожжей *Y. lipolytica* в присутствии ферригидрита

Известно, что среда с низким значением рН является оптимальной для роста дрожжей *Y. lipolytica* (Finogenova et al., 2005), поэтому влияние ферригидрита на трансформацию ТНТ клетками *Y. lipolytica* AN-L15 изначально оценивали в условиях начального рН 5.5. Так, независимо от присутствия ферригидрита фаза задержки роста *Y. lipolytica* AN-L15 наблюдалась в ТНТ-содержащей среде в сравнении со средой в отсутствие исходного ксенобиотика (рис. 2А и 3А). Оптическая плотность культуры достигла значений 3.1 (A_{600}) после 14 ч культивирования в среде, содержащей минерал и ТНТ (рис. 2А). В отсутствие ферригидрита к 14 ч культивирования оптическая плотность культуры достигла сходных значений (A_{600} 2.9) в ТНТ-содержащей среде (рис. 3А).

Ранее было показано, что *Y. lipolytica* продуцирует ряд органических кислот в процессе утилизации глюкозы и этанола (Finogenova et al., 2005; Ziganshin et al., 2010). В наших экспериментах, внесение ферригидрита в синтетическую среду сопровождалось задержкой снижения рН среды, что, вероятно, было связано с увеличением буферной емкости среды и/или подавлением синтеза органических кислот клетками дрожжей в присутствии ферригидрита. Однако, несмотря на это, значения рН среды как в присутствии минерала, так и в его отсутствие достигли одинаковых значений к 24 ч культивирования штамма (рис. 2А и 3А).

Биотрансформация ТНТ в присутствии и в отсутствие ферригидрита дрожжами *Y. lipolytica* AN-L15 приводила к образованию гидридных комплексов Мейзенхеймера (1-Н⁻-ТНТ, изомеров 3-Н⁻-ТНТ и 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺) с последующей их трансформацией и глубокой деструкцией, а также формированию ГАДНТ и АДНТ. Однако присутствие ферригидрита замедляло скорость трансформации ТНТ (рис. 2 и 3). Метаболиты трансформации ТНТ были установлены методами ВЭЖХ и ионной хроматографии; времена удерживания метаболитов соответствовали таковым химических стандартов.

Основной путь трансформации ТНТ в присутствии железосодержащего минерала протекал через редукцию его ароматического кольца и приводил к аккумуляции 3-Н⁻-ТНТ с последующим формированием его изомеров 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺ и 2,4-ДНТ. Максимальная концентрация 3-Н⁻-ТНТ в присутствии

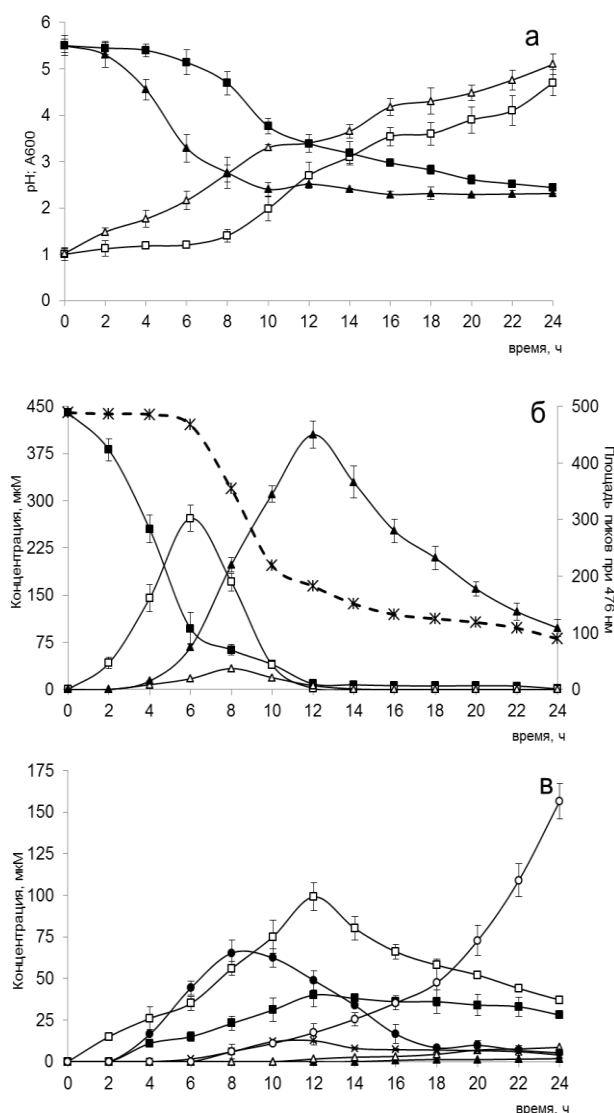


Рис. 2. Образование продуктов трансформации ТНТ в процессе роста дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в присутствии ферригидрита. Символы: (А) □, рост и ■, динамика рН в присутствии ТНТ; △, рост и ▲, динамика рН в отсутствие ТНТ. (Б) ■, ТНТ; □, 3-Н-ТНТ (мкМ); △, 1-Н-ТНТ; ▲, сумма других гидридных комплексов, выраженная как общая площадь их ВЭЖХ-пиков (при 476 нм); ж – сумма ТНТ, 3-Н-ТНТ, ГАДНТ, АДНТ и 2,4-ДНТ. (В) ■, 2-ГАДНТ; □, 4-ГАДНТ, ▲, 2-АДНТ; △, 4-АДНТ; ×, 2,4-ДНТ, ●, нитрит-ион, ○, нитрат-ион (мкМ).

минерала была обнаружена после 6 ч эксперимента и достигла 272 ± 21 мкМ, тогда как в отсутствие минерала количество 3-Н-ТНТ достигло 285 ± 18 мкМ на 4 ч культивирования дрожжей (рис. 2Б и 3Б). Образование другого С-1 моногидридного комплекса (1-Н-ТНТ) также было установлено, но его концентрация в сравнении со всеми другими комплексами оставалась очень низкой (рис. 2Б и 3Б). Кроме того, в среде с ферригидритом был обнаружен новый ТНТ-гидридный комплекс, однако, его концентрация оставалась очень низкой в сравнении с другими обнаруженными метаболитами.

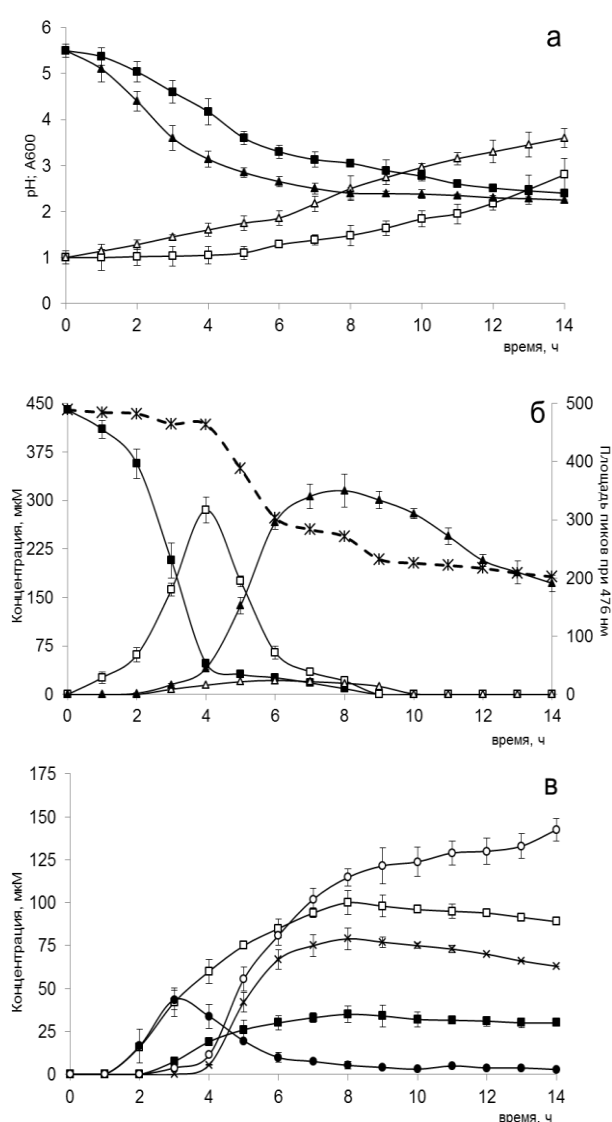


Рис. 3. Образование продуктов трансформации ТНТ в процессе роста дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в отсутствие ферригидрита. Символы: (А) □, рост и ■, динамика рН в присутствии ТНТ; △, рост и ▲, динамика рН в отсутствие ТНТ. (Б) ■, ТНТ; □, 3-Н-ТНТ (мкМ); △, 1-Н-ТНТ; ▲, сумма других гидридных комплексов, выраженная как общая площадь их ВЭЖХ-пиков (при 476 нм); ж – сумма ТНТ, 3-Н-ТНТ, ГАДНТ и 2,4-ДНТ. (В) ■, 2-ГАДНТ; □, 4-ГАДНТ, ×, 2,4-ДНТ, ●, нитрит-ион, ○, нитрат-ион (мкМ).

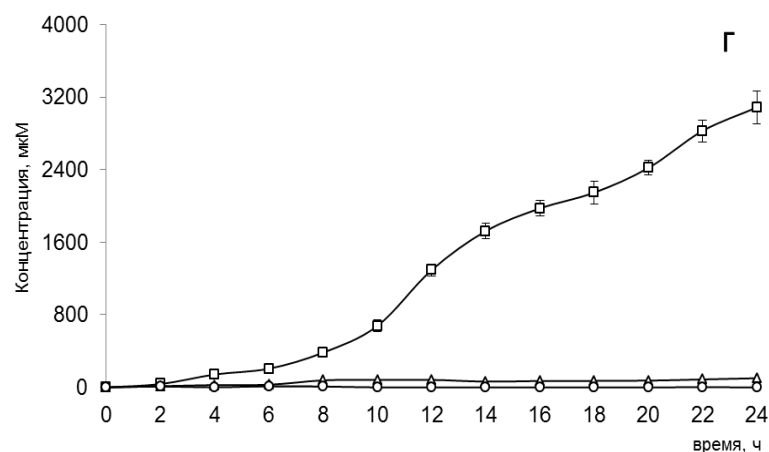


Рис. 4. Изменение концентрации Fe^{2+} (мкМ) в ходе редукции ферригидрита. Символы: $\square$, Fe^{2+} в присутствии ТНТ и клеток, $\triangle$, Fe^{2+} в отсутствие ТНТ и в присутствии клеток; $\circ$, Fe^{2+} в присутствии ТНТ и в отсутствие клеток.

Продолжительное культивирование сопровождалось конверсией 3-Н-ТНТ в 3,5-2Н-ТНТ·Н⁺ и 2,4-ДНТ. Однако ингибирование накопления 2,4-ДНТ (13 мкМ) наблюдалось в Fe-содержащей среде по сравнению с экспериментами в отсутствие экзогенного железа, где концентрация 2,4-ДНТ достигала 79 мкМ (рис. 2В и 3В).

Формирование 2,4-ДНТ из 3-Н-ТНТ и деструкция изомеров 3,5-2Н-ТНТ·Н⁺ были ассоциированы с выделением NO_2^- и его последующей конверсией в NO_3^- при низких значениях рН среды. Так, на 8 ч роста дрожжей в присутствии ТНТ и минерала образовалось 65 мкМ NO_2^- . При снижении рН среды ниже 4.5 образовавшийся NO_2^- подвергся окислению в NO_3^- (рис. 2В). Дальнейшее разрушение изомеров 3,5-2Н-ТНТ·Н⁺ при низких значениях рН среды протекало одновременно с накоплением NO_3^- ; его максимальная концентрация (156 мкМ) была зафиксирована на 24 ч эксперимента (рис. 2В). В отсутствие ферригидрита максимальные количества NO_2^- (44 мкМ) и NO_3^- (143 мкМ) были обнаружены после 3 ч и 14 ч роста дрожжей, соответственно (рис. 3В).

Трансформация ТНТ по пути восстановления нитрогрупп сопровождалась накоплением ГАДНТ. После 12 ч роста дрожжей (в присутствии ферригидрита) было обнаружено 40 мкМ 2-ГАДНТ и 99 мкМ 4-ГАДНТ; сходные результаты в экспериментах без минерала были получены на 8 ч культивирования (35 мкМ 2-ГАДНТ и 100 мкМ 4-ГАДНТ) (рис. 2В и 3В). В присутствии Fe-содержащего минерала также были обнаружены АДНТ в небольших количествах (рис. 2В).

На рис. 4 показано, что ферригидрит (в форме Fe^{3+}), внесенный в ТНТ-содержащую среду в отсутствие клеток дрожжей, не подвергался восстановлению до Fe^{2+} . Низкий уровень Fe^{2+} (0.1 мкМ после 24 ч эксперимента) был зафиксирован в присутствии клеток дрожжей в среде без ТНТ. Напротив, значительное количество Fe^{2+} накапливалось в процессе трансформации ТНТ клетками дрожжей *Y. lipolytica*. Максимальная концентрация Fe^{2+} в таких условиях достигала 3.1 мМ в течение 24 ч эксперимента (рис. 4). Одним из возможных механизмов образования Fe^{2+}

является индукция ферментов в присутствии ТНТ, его метаболитов или других органических соединений. Альтернативный путь редукции Fe^{3+} – накопление в среде метаболитов глубокой деструкции ТНТ, способных восстанавливать Fe^{3+} абиотически.

Наши исследования показывают, что внесение ферригидрита в среду снижало темпы преобразования ТНТ штаммом *Y. lipolytica* AN-L15. Однако в отличие от многих исследований, в которых увеличивалось восстановление нитрогрупп ТНТ в присутствии железа (Hofstetter et al., 1999; Borch et al. 2005), в наших условиях увеличение потенциально токсичных продуктов нитровосстановления не происходило. Основной путь трансформации ТНТ протекал через редукцию ароматического кольца ТНТ, а образование неорганических метаболитов анионной природы являлось прямым доказательством разрушения исходного ксенобиотика.

Таким образом, результаты нашего исследования означают, что трансформация ТНТ дрожжами через формирование гидридных комплексов продолжает оставаться мажорным путем превращения исходного токсиканта даже в присутствии минералов железа. Это будет способствовать полному разрушению ТНТ в водах и почвах, обогащенных железом.

2. Образование оксида азота (II) в процессе деструкции ТНТ клетками *Y. lipolytica*

С использованием метода ЭПР-спектроскопии в данной работе впервые удалось установить образование NO в ходе трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica* AN-L15, что указывает на возможность конверсии выделившегося нитрит-иона не только в нитрат-ион, но и также в газообразные формы азота. Контрольные эксперименты при варьировании pH среды не приводили к генерации NO (рис. 5).

Генерация NO в процессе трансформации ТНТ клетками дрожжей происходила в условиях снижения pH среды (в результате экскреции органических кислот дрожжами). Мы предполагаем, что выделение NO является процессом абиотическим и обусловлено реакцией диспропорционирования нитрит-иона с одновременным образованием NO и нитрат-иона при низких значениях pH среды (Cai et al., 2001). Таким образом, совокупность биотических и абиотических факторов приводила к образованию NO_2^- , NO_3^- и NO в качестве азотсодержащих продуктов биотрансформации ТНТ.

3. Рентгеноструктурный анализ ферригидрита

Ферригидрит ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) широко распространен в окружающей среде и существует в виде наночастиц размером 2-7 нм. Выделяют две модификации минерального ферригидрита – 2-линейчатый и 6-линейчатый ферригидрит, которые идентифицируются по числу рентгеновских пиков. Обе формы ферригидрита являются кристаллическими. Методом рентгеновской дифрактометрии можно определить кристаллическую структуру частиц и поведение минерала в определенных условиях

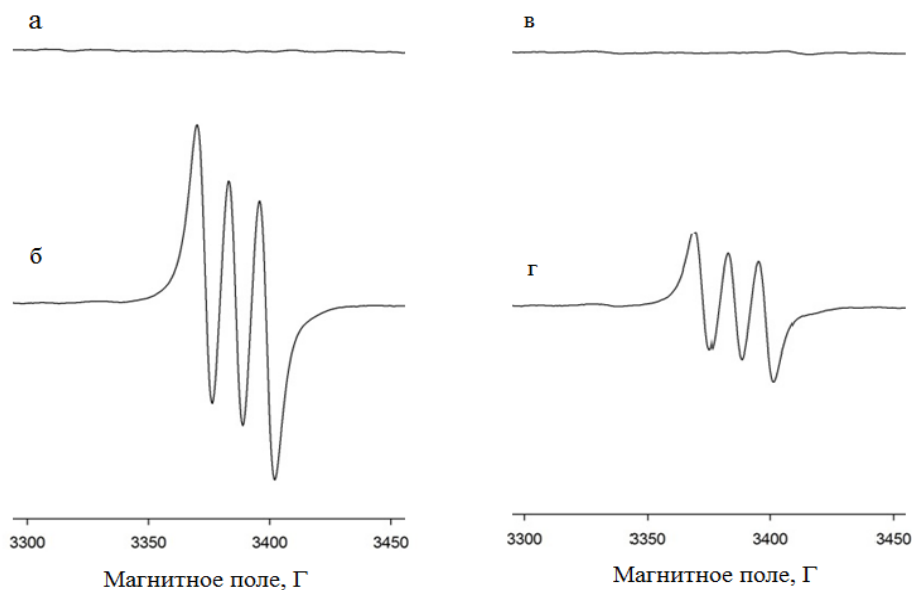


Рис. 5. Спектры ЭПР комплекса $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{NO})(\text{ДЭТК})_2$, полученные в ходе экспериментов. А – синтетическая среда с клетками дрожжей *Y. lipolytica* без ТНТ и ферригидрита (контроль); Б – после 5 ч трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica* в отсутствие ферригидрита (начальный pH 5.5); В – синтетическая среда с клетками дрожжей *Y. lipolytica* без ТНТ и с ферригидритом (контроль); Г – после 8 ч трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica* в присутствии ферригидрита (начальный pH 5.5). Параметры: частота 9,68 ГГц, мощность СВЧ излучения 50 мВт, амплитуда высокочастотной модуляции 5 Г.

окружающей среды. По положению пиков дифрактограммы определяют кристаллические фазы, присутствующие в образце (Jambor, Dutrizac, 1998; Rhoton, Bigham, 2009).

Метод Ловли и Филлипса (Lovley, Phillips, 1987) позволяет синтезировать ферригидрит 2-линейчатой структуры с характерными двумя мажорными пиками (между 30° - 40° и 55° - 65°). В нашем случае рентгеновская дифрактометрия показала, что 2-линейчатый ферригидрит был основной фазой после его синтеза (рис. 6А). Дополнительный пик, детектируемый в диапазоне 10° - 20° в образцах свежесинтезированного ферригидрита, означает изменение структуры некоторой части минерала на начальных этапах его синтеза (рис. 6А). Наличие данного пика может свидетельствовать как о частичном транзитном переходе 2-линейчатого в 6-линейчатый ферригидрит, так и о параллельном синтезе других оксигидроксидных минералов. Однако их концентрация в сравнении с синтезированным ферригидритом была незначительна.

Рентгеноструктурный анализ ферригидрита, проинкубированного в синтетической среде (pH 7.0) в отсутствие клеток дрожжей в течение 24 ч, позволил выявить образование дополнительных пиков на дифрактограмме (рис. 6Б). Образование данных пиков с одновременным поддержанием мажорной части ферригидрита в форме 2-линейчатой структуры, по-видимому, свидетельствует о дальнейшем транзитном переходе 2-линейчатого ферригидрита в 6-линейчатый ферригидрит и образовании других оксигидроксидов железа со временем (рис. 6Б). Кроме того,

образование дополнительных пиков может быть ассоциировано и с реакцией синтезированного ферригидрита с катионами и анионами, входящими в состав синтетической среды.

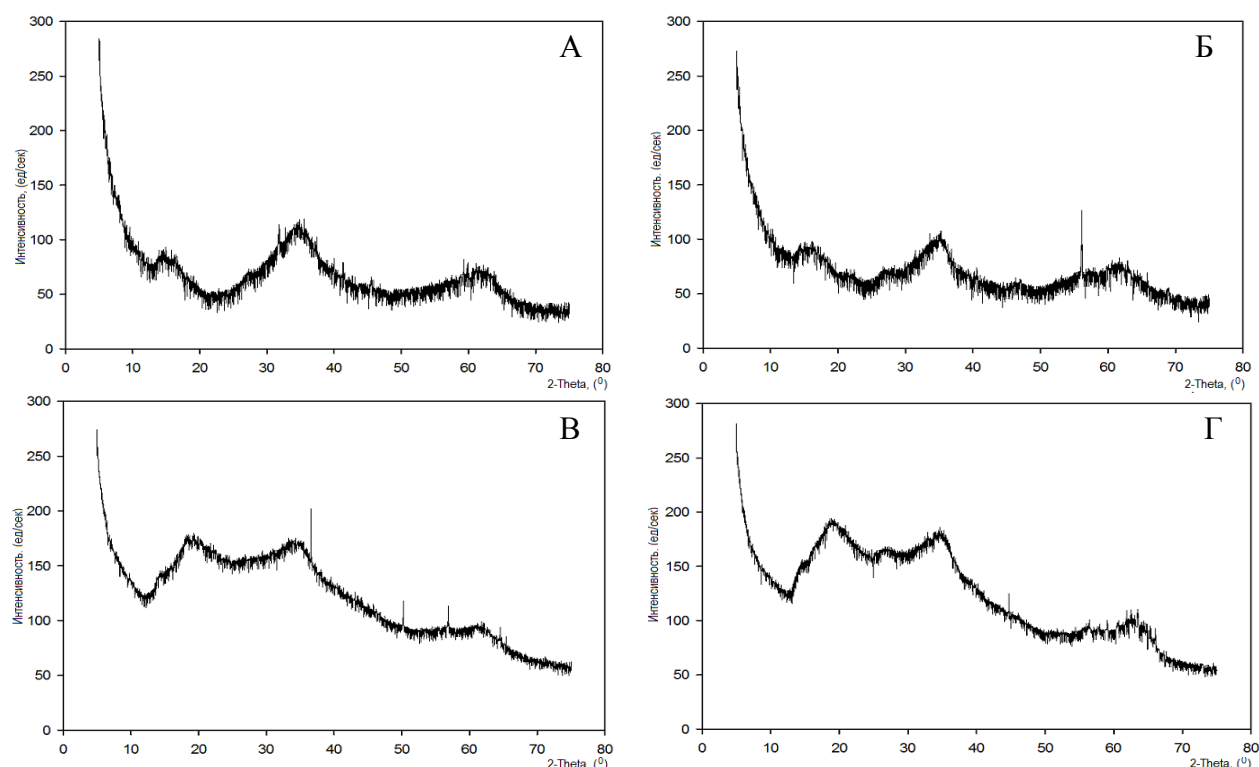


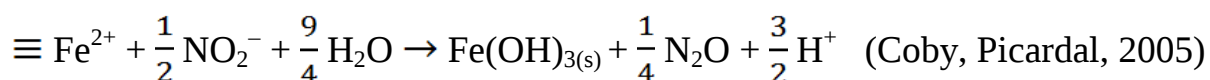
Рис. 6. Рентгеноструктурный анализ. (А) свежесинтезированный ферригидрит, (Б) ферригидрит, проинкубированный в синтетической среде (рН 7.0) в отсутствие клеток дрожжей *Y. lipolytica* (24 ч), (В) ферригидрит, проинкубированный в присутствии клеток *Y. lipolytica* (24 ч), (Г) ферригидрит, проинкубированный в присутствии клеток *Y. lipolytica* и ТНТ (24 ч).

Культивирование дрожжей *Y. lipolytica* в присутствии исходного минерала повлияло на состояние некоторой части внесенного ферригидрита (рис. 6В). Новые пики на дифрактограмме свидетельствуют о его частичном переходе в другие железосодержащие минералы. Это может быть связано, например, со снижением рН среды в результате продукции органических кислот дрожжами, что могло отражаться на структурных изменениях минерала. Дополнительные пики могли принадлежать гётиту, гематиту, маггемиту, а также магнезиоферриту. Визуально наблюдалось изменение окраски минерала с красно-коричневого цвета, характерного для ферригидрита, до преобладания оранжевых оттенков. Это является дополнительным подтверждением образования других железосодержащих минералов.

Появление дополнительных пиков на дифрактограмме после 24 ч инкубирования ферригидрита в среде роста в процессе трансформации ТНТ клетками дрожжей *Y. lipolytica* может быть связано с образованием других железосодержащих минералов (рис. 6Г). Это может быть объяснено, например, влиянием продуктов биотрансформации ТНТ на ферригидрит, а также его редукцией с образованием Fe(II).

4. Электронная микроскопия клеток дрожжей *Y. lipolytica*, проинкубированных в присутствии ферригидрита

По данным некоторых авторов (Coby, Picardal, 2005), инкубация бактериальных клеток *Shewanella putrefaciens* 200 в анаэробных условиях в присутствии различных оксигидроксидов железа, а также NO_2^- и NO_3^- ведет к ингибированию редукции последних и к повышенному образованию оксида азота (I) (N_2O). Авторы предположили, что данный процесс – это результат взаимодействия некоторой части биогенного Fe(II) (полученного при восстановлении Fe(III)) с NO_2^- с последующим формированием микрооболочек оксигидроксида железа на поверхности клеток микроорганизмов.



В связи с этим, для определения возможности образования микрооболочек железосодержащих минералов на поверхности строго аэробных дрожжевых клеток *Y. lipolytica*, осуществляющих трансформацию ТНТ с образованием NO_2^- и NO_3^- , были проведены электронно-микроскопические исследования. Оказалось, что дрожжи овальной формы, расположенные отдельными или почкующимися клетками, в данных условиях не сорбировали на своей поверхности ферригидрит или двухвалентное железо, образованное в процессе редукции исходного минерала.

Кроме того, в наших экспериментах не было зафиксировано выделение N_2O в процессе биотрансформации ТНТ, что было подтверждено методом газовой хроматографии.

5. Генерация супероксидного радикала в процессе трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica*

Процесс трансформации ТНТ клетками штамма *Y. lipolytica* AN-L15 протекал с образованием как метаболитов восстановления ароматического кольца, так и нитрогрупп. Первая стадия восстановления нитрогрупп ТНТ сопряжена с образованием ГАДНТ, которые обладают повышенной токсичностью и потенциальной мутагенностью по отношению к живым объектам (Berthe-Corti et al., 1998). Исследования продуктов нитровосстановления ТНТ на цитотоксичность показали, что 2-АДНТ, 4-АДНТ, 2,4-ДАНТ и 2,6-ДАНТ являются менее токсичными, чем исходный ксенобиотик (Lachance et al., 1999). В тесте Эймса на клетках *Salmonella* spp. ТНТ и продукты его нитровосстановления оказались потенциально мутагенными соединениями (Lachance et al., 1999).

В работе Науменко с соавторами (2008) были исследованы процессы генерации супероксидного радикала в ходе трансформации ТНТ бактериальным штаммом *Bacillus cereus* ZS18. В связи с токсичностью метаболитов нитроредукции ТНТ, нами была предпринята попытка

идентификации формирования супероксида в процессе биodeградации исходного поллютанта и дрожжевым штаммом *Y. lipolytica* AN-L15.

На рис. 7 показана динамика образования супероксида во внеклеточном пространстве в процессе биотрансформации ТНТ клетками дрожжей *Y. lipolytica* в отсутствие ферригидрита (исходная A_{600} 0.3). Временная зависимость интенсивности сигнала ЭПР аддукта спиновой ловушки (1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-пирролидин-3,4-дикарбоновой кислоты) с $O_2^{\cdot -}$ коррелировала с формированием метаболитов. Так, начальный этап трансформации ТНТ, инициируемый после внесения клеток дрожжей в среду с ТНТ, сопровождался постепенной аккумуляцией 2-ГАДНТ, 4-ГАДНТ, а также 3-Н-ТНТ и характеризовался низкой интенсивностью сигнала ЭПР. Наибольшая интенсивность сигнала аддукта спиновой ловушки с $O_2^{\cdot -}$ наблюдалась на 12-18 ч культивирования клеток *Y. lipolytica* с постепенным его снижением к 21 ч. На пик интенсивности генерации супероксида приходилось значительное накопление 2-ГАДНТ, 4-ГАДНТ, 3-Н-ТНТ и NO_2^- . Дальнейшее культивирование клеток сопровождалось аккумуляцией изомеров 3,5-2Н-ТНТ·Н⁺ и их последующим разрушением, а также окислением нитрит-иона в нитрат-ион, что коррелировало со снижением интенсивности сигнала ЭПР (рис. 7).

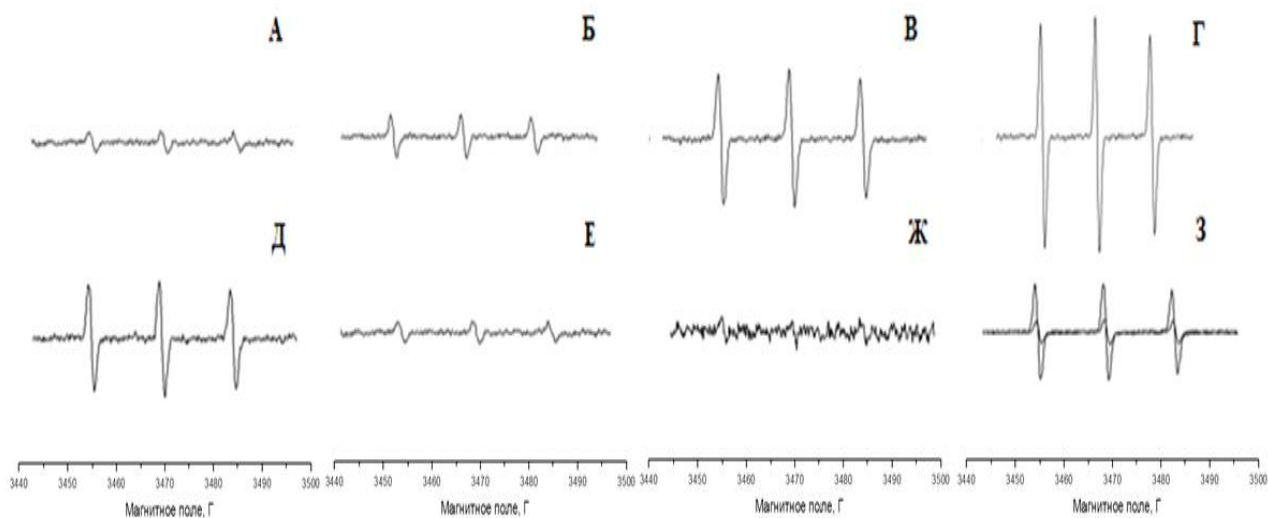


Рис. 7. (А-Е) Спектры ЭПР аддуктов спиновой ловушки с $O_2^{\cdot -}$, генерируемым в процессе трансформации ТНТ дрожжами в отсутствие ферригидрита. Спектры записаны через (А) 30 мин, (Б) 3 ч, (В) 6 ч, (Г) 12 ч, (Д) 18 ч, (Е) 21 ч от момента внесения клеток дрожжей в ТНТ-содержащую среду; (Ж) после внесения СОД на 6 ч; (3) эталонный спектр аддукта спиновой ловушки с $O_2^{\cdot -}$, полученным в ходе ксантин-ксантинооксидазной реакции (высокая интенсивность); после внесения СОД в реакцию смесь (низкая интенсивность).

Для подтверждения принадлежности линий спектров, полученных в ходе биотрансформации ТНТ, именно к аддукту спиновой ловушки с $O_2^{\cdot -}$ была поставлена стандартная ксантин-ксантинооксидазная реакция, в которой генерируется супероксид (рис. 73). Внесение супероксиддисмутазы (СОД) как к стандартной реакционной смеси, так и к экспериментальным образцам приводило к ингибированию сигнала (рис. 7Ж и 3). СОД участвует в

реакциях дисмутации супероксида с образованием перекиси водорода и кислорода (Kelm et al., 1997).

Спектры аддукта спиновой ловушки и супероксид аниона указывают на генерацию $O_2^{\cdot -}$ во внеклеточной среде в ходе трансформации ТНТ. Предположительно, генерация $O_2^{\cdot -}$ – это результат взаимодействия клеток дрожжей с токсичными соединениями, ТНТ и продуктами его трансформации, сопровождающийся ТНТ-опосредованным оксидативным стрессом. Известно также, что ТНТ может участвовать в образовании активных форм кислорода через образование нитроанионного радикала (Spain, 1995; Kumagai et al., 2004). Генерация супероксида в культуральной жидкости означает возможность участия $O_2^{\cdot -}$ в редукции ферригидрита с образованием Fe(II) (Fujii et al., 2006). Возможно также, что NO, образовавшийся в результате реакции диспропорционирования, взаимодействовал с $O_2^{\cdot -}$ с формированием более сильного окислителя – пероксинитрита ($ONOO^-$) (Vásquez-Vivar et al., 1997).

Схема возможных путей трансформации ТНТ и восстановления ферригидрита в присутствии дрожжевых клеток *Yarrowia lipolytica* AN-L15 представлена на рис. 8.

6. Многостадийный процесс трансформации ТНТ клетками *Y. lipolytica*

Для адекватного моделирования процесса биодеструкции ТНТ клетками *Y. lipolytica* в условиях полунепрерывного и непрерывного режимов культивирования возникла необходимость пространственного разделения и стабилизации последовательных стадий трансформации ТНТ по пути восстановления его ароматического кольца. Пространственное разделение, коррелирующее со сдвигами pH среды и с визуализацией специфичных метаболитов, реализовано на базе установки, схема которой представлена на рис. 1.

В процессе трансформации ТНТ дрожжевой культурой в условиях полунепрерывного режима культивирования часть среды с клетками удаляли из биореакторов, а освободившийся объем в первом ферментере заполняли свежей ТНТ-содержащей синтетической средой, тогда как в следующие два ферментера поступала очищаемая среда. Таким образом, функционировала сливно-доливная система.

6.1. Первый этап биотехнологического процесса: инициация полунепрерывного культивирования дрожжей в присутствии ТНТ

Деструкцию ТНТ штаммом дрожжей проводили в два этапа. На первом этапе все три биореактора наполняли на 1/5 (~200 мл) синтетической средой (pH 7.0), содержащей ТНТ в концентрации 440 мкМ. Затем включали магнитные мешалки (100-250 об/мин) и систему аэрации (10-50 мл/мин). Во все биореакторы через систему трубопроводов вносили суточную культуру дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 и культивировали в течение 11-12 ч.

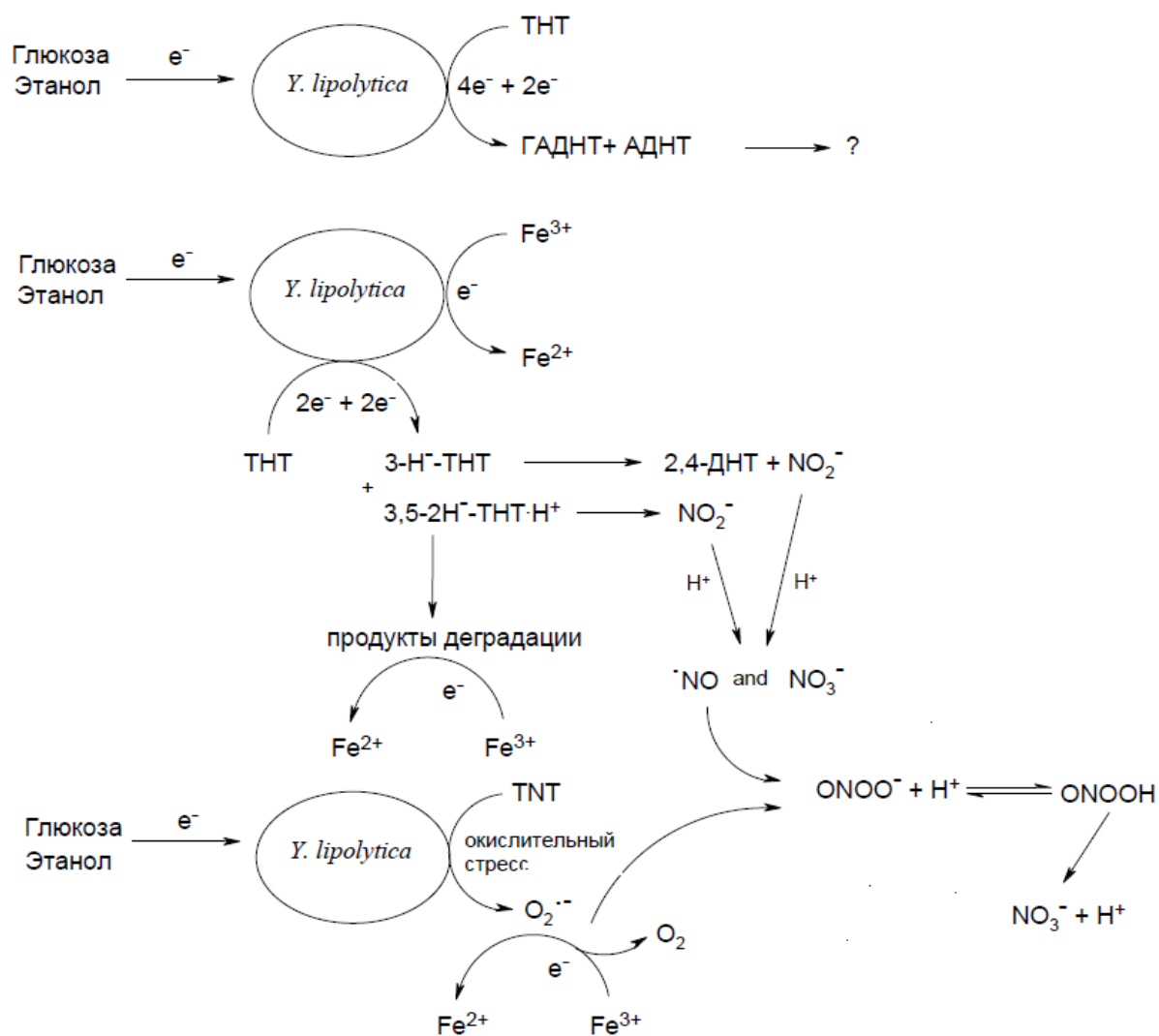


Рис.8. Схема возможных путей трансформации ТНТ и восстановления ферригидрита в присутствии дрожжевых клеток *Yarrowia lipolytica* AN-L15.

Внесение клеток до конечной A_{600} 0.3 в первый биореактор вело к убыли ТНТ и накоплению главного метаболита красного цвета – 3-Н-ТНТ. Максимальное количество образовавшегося 3-Н-ТНТ было зафиксировано на уровне 266-285 мкМ из 376-382 мкМ трансформированного ТНТ через 11-12 ч эксперимента. В первом биореакторе происходило также частичное превращение 3-Н-ТНТ в ряд других ТНТ-гидридных комплексов, однако, в данном случае их концентрация оставалась незначительной (в диапазоне 25-35 absorbance units и была выражена через сумму площадей их ВЭЖХ-пиков). В первом биореакторе на начальном этапе также происходило образование небольшого количества нитрит-иона, концентрация которого варьировала в диапазоне 12-18 мкМ. Из метаболитов нитроредукции ТНТ были обнаружены 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ, концентрация которых достигала 15-20 и 37-45 мкМ, соответственно. При этом рН очищаемой среды поддерживался в диапазоне от 7.0 до 6.5.

Одновременно с началом работы биореактора первой ступени, во второй биореактор, также изначально содержащий среду с ТНТ, вносили

дрожжевую культуру до конечной A_{600} 1.2. В данных условиях максимальное образование 3-Н⁻-ТНТ (266-285 мкМ) происходило через 6-7 ч культивирования. Следующие 5 ч эксперимента связаны с превращением образовавшегося 3-Н⁻-ТНТ в желто-оранжевые дигидридные комплексы.

В данных условиях концентрация 3-Н⁻-ТНТ варьировала в диапазоне 32-45 мкМ, а максимальное количество других гидридных комплексов составило 270-342 absorbance units (выражено через сумму площадей их ВЭЖХ-пиков). Из других продуктов трансформации ТНТ обнаружены 2,4-ДНТ, NO₂⁻, NO₃⁻, ГАДНТ и 4-АДНТ. Во втором биореакторе происходило снижение pH очищаемой среды до уровня 5.6-5.2 вследствие интенсивной продукции дрожжами органических кислот, в частности лимонной, янтарной и пировиноградной кислот. При достижении необходимых условий трансформацию ТНТ клетками *Y. lipolytica* в биореакторе 2 переводили в полунепрерывный режим.

Одновременно с началом работы двух первых биореакторов в третий биореактор, содержащий среду с ТНТ, вносили дрожжи до конечной A_{600} 2.5. Присутствие повышенной биомассы в третьем биореакторе ускоряло биологический процесс, что сопровождалось быстрой и эффективной трансформацией ТНТ в 3-Н⁻-ТНТ (максимальное количество на 3-4 ч) и далее 3-Н⁻-ТНТ в другие гидридные комплексы Мейзенхеймера (максимальное количество на 8-9 ч). Дальнейшая трансформация ТНТ-гидридных комплексов в биореакторе сопровождалась осветлением очищаемой среды и накоплением нитрат-иона (130-153 мкМ), являющегося мажорным азотсодержащим неорганическим продуктом деструкции токсичного ТНТ. В третьем биореакторе происходило снижение pH среды до 3.3 вследствие интенсивного синтеза и экскреции дрожжами органических кислот.

На этом завершали выполнение первого этапа процесса.

6.2. Второй этап биотехнологического процесса: полунепрерывный режим культивирования дрожжей в присутствии ТНТ

На втором этапе биодеструкцию ТНТ проводили в условиях полунепрерывного культивирования дрожжей (после 11-12 ч). Перистальтические насосы позволяли перекачивать ТНТ-загрязненную очищаемую среду из резервуара в последовательно соединенные между собой биореакторы. Обновление среды в биореакторах проходило за 40 ч, что позволяло эффективнее осуществлять деградацию ТНТ. Пространственное разделение гидридных комплексов Мейзенхеймера вело к большей эффективности деградации ТНТ и уменьшению образования продуктов альтернативного пути – ГАДНТ.

Скорость потока очищаемой среды через биореакторы устанавливали, сохраняя стабильность биологических процессов и обеспечивая пространственное разделение ТНТ-гидридных комплексов в трех биореакторах. Процесс контролировали путем отбора проб через пробоотборники и их последующего анализа и корректировали путем

изменения скорости поступления среды и интенсивности перемешивания (50-250 об/мин). В случае отклонения от допустимого диапазона pH, в среду вносили небольшое количество 10% раствора NaOH или H₂SO₄, поддерживая оптимальные значения pH в реакторах.

В первом биореакторе формирование мажорного продукта трансформации ТНТ – 3-Н⁻-ТНТ – проходило при слабом росте клеток *Y. lipolytica* и слабом снижении pH среды (7.0-6.5). Одновременно с образованием 3Н⁻-ТНТ было зафиксировано незначительное накопление суммы других гидридных комплексов. Кроме того, параллельно образовывались и интермедиаты нитроредукции исходного ксенобиотика – ГАДНТ. Однако восстановление ароматического кольца ТНТ клетками дрожжей превалировало над редукцией нитрогрупп ТНТ. Так, концентрация 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ в первом реакторе варьировала в диапазоне 15-22 мкМ и 36-44 мкМ, соответственно, в сравнении с 270-288 мкМ 3-Н⁻-ТНТ в течение 60 ч культивирования дрожжей в условиях полунепрерывного режима. Для этой стадии многостадийного процесса было характерно накопление низкой концентрации нитрит-иона (в пределах 12-20 мкМ). Остаточная концентрация ТНТ в первом биореакторе составила 55-60 мкМ.

Благодаря поддержанию слабокислого и нейтрального значения pH среды в первом реакторе подобраны оптимальные условия для максимального формирования 3-Н⁻-ТНТ, соединения, поддающегося биоминерализации.

Ранее нами было показано, что 3-Н⁻-ТНТ подвергался спонтанному разложению с обратным образованием ТНТ при низких значениях pH среды. Поэтому, для предотвращения его конверсии обратно в ТНТ при постоянном снижении pH среды в результате жизнедеятельности дрожжей (экскреции органических кислот), была необходима вторая стадия, позволяющая полностью трансформировать 3-Н⁻-ТНТ в остальные более стабильные ТНТ-гидридные комплексы. Для этого во втором реакторе поддерживали необходимое значение pH среды (в диапазоне 5.6-5.2), стимулирующее образование других гидридных комплексов. В случае изменения pH среды от указанного диапазона, необходимый pH поддерживали внесением небольшого количества 10% раствора NaOH или H₂SO₄. В случае снижения pH среды ниже указанных значений, 3-Н⁻-ТНТ частично превращался обратно в ТНТ с последующим образованием исключительно продуктов нитроредукции (ГАДНТ), что уменьшало эффективность биотехнологической схемы деструкции исходного токсиканта.

Третья стадия трансформации ТНТ необходима для полной деструкции всех гидридных комплексов Мейзенгеймера, окисления образовавшегося нитрит-иона в нитрат-ион, а также ковалентного связывания некоторой части ГАДНТ с макромолекулами клеток *Y. lipolytica*, что в последующем ведет к снижению токсичности. Оптимальный pH среды в третьем биореакторе составил 3.8-3.3, что способствовало полной деградации дигидридных производных с накоплением нитрат-иона (142-175 мкМ).

Разработанный многостадийный процесс трансформации и деструкции 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжевого штамма *Yarrowia lipolytica* AN-L15 способен решать проблемы обезвреживания стоков промышленных предприятий, загрязненных токсичными и устойчивыми к минерализации полинитроароматическими ксенобиотиками. Данный способ наиболее приближен к условиям постадийной очистки сточных вод и может быть применен в природоохранной деятельности.

На сегодняшний день данные по непрерывным процессам культивирования микроорганизмов в присутствии ТНТ остаются весьма ограниченными. Из литературных источников известен способ очистки среды от ТНТ иммобилизованными клетками гриба *Phanerochaete chrysosporium* ВКМ-F-1767 в биореакторе для непрерывного культивирования (Rho et al., 2001). Однако культура *P. chrysosporium* нуждалась в продолжительном периоде адаптации к исходному токсиканту и средний уровень минерализации ТНТ (при его исходной концентрации 50 мг/л) известным грибом достигал всего лишь 15,3% после 41 суток культивирования.

В другой работе (Tope et al., 1999) исследована трансформация ТНТ свободными и иммобилизованными клетками *Arthrobacter* sp. 8929. Авторы показали, что процесс трансформации ТНТ (60 мг/л) протекал в течение 24-36 ч с образованием устойчивых аминопроизводных ТНТ без их последующего разрушения. Поэтому для деградации образовавшихся метаболитов необходим подбор других микроорганизмов.

Известен способ удаления ТНТ из биореакторов путем непрерывного культивирования микробных сообществ в жидкой ТНТ-содержащей среде в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях (Gunnison et al., 1997). Однако в процессе непрерывного культивирования микробных сообществ в очищаемой среде образовывались ГАДНТ, АДНТ, ДАНТ и азоксинитротолуолы, которые не подвергались биологическому разрушению и накапливались в окружающей среде.

Таким образом, не один из известных способов не ведет к глубокой деструкции исходного ксенобиотика, тогда как в представленной работе процесс биодеградации ТНТ штаммом *Y. lipolytica* AN-L15 осуществлялся с высокой степенью эффективности. Поэтому исследованный штамм может быть использован для очистки природных и сточных вод, загрязненных соединениями нитроароматической природы.

ВЫВОДЫ

1. Ферригидрит замедлял процесс трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами *Yarrowia lipolytica*, однако, не препятствовал разрушению исходного ксенобиотика.
2. Методом ВЭЖХ идентифицированы продукты восстановления бензольного кольца 2,4,6-тринитротолуола – моно- и дигидридные комплексы Мейзенхеймера, метаболиты нитроредукции – гидроксиламино-динитротолуолы и аминоксиды-динитротолуолы, а также 2,4-

динитротолуол. Методом ионной хроматографии обнаружены нитрит-ион и нитрат-ион.

3. Методом ЭПР-спектроскопии удалось зафиксировать образование оксида азота (II) в ходе деструкции 2,4,6-тринитротолуола клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Кроме этого, рост клеток *Yarrowia lipolytica* в присутствии 2,4,6-тринитротолуола сопровождался генерацией супероксидного радикала с возможным последующим формированием пероксинитрита и пероксиазотистой кислоты.
4. Удалось пространственно разделить и стабилизировать последовательные стадии трансформации 2,4,6-тринитротолуола по пути редукции его ароматического кольца дрожжами *Yarrowia lipolytica*.
5. Пространственное разделение моногидридных и дигидридных комплексов Мейзенхеймера позволило разработать эффективный способ обезвреживания вод, загрязненных 2,4,6-тринитротолуолом, клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Хиляс И.В.** Биodeградация 2,4,6-тринитротолуола гемiasкомицетными дрожжами в условиях непрерывного режима культивирования / И.В. Хиляс, Л.Ф. Сафиуллина, А.А. Родионов, А.М. Зиганшин // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2010. – Т. 152, № 4. – С. 179–189 (Список ВАК – авт. 0.35 п.л.).
2. **Khilyas I.V.** Effect of ferrihydrite on 2,4,6-trinitrotoluene biodegradation by an aerobic yeast / I.V. Khilyas, A.M. Ziganshin, A.J. Pannier, R. Gerlach // Biodegradation. – 2012. – DOI 10.1007/s10532-012-9611-4. – P. 1–14 (Список ВАК – авт. 0.5 п.л.).
3. Патент РФ № 2437930. Биосенсор для определения 2,4,6-тринитротолуола. Авторы: **Хиляс И.В.**, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова. Заявка № 2010132746. Дата заявки 04.08.2010. Положительное решение от 20.07.2011.
4. Патент РФ № 2451066. Штамм дрожжей *Geotrichum* sp., осуществляющий биологическую деградацию 2,4,6-тринитротолуола. Авторы: Зиганшин А.М., **И.В. Хиляс**, О.Н. Ильинская. Заявка № 2010132747. Дата заявки 04.08.2010. Положительное решение от 09.11.2011.
5. Патент РФ № 2453508. Способ биологической очистки воды от 2,4,6-тринитротолуола. Авторы: **Хиляс И.В.**, А.М. Зиганшин. Заявка № 2010132748. Дата заявки 04.08.2010. Положительное решение от 03.02.2012.
6. **Хиляс И.В.** Гидридное восстановление 2,4,6-тринитротолуола несовершенными грибами родов *Candida* и *Geotrichum* / И.В. Хиляс, Е.А. Науменко, А.П. Ложкин, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Биология – Наука XXI века. 11-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Пущино: 2007. – С. 51.
7. **Хиляс И.В.** Микроорганизмы – деструкторы химических загрязнений в условиях смешанного загрязнения осадков и почв / И.В. Хиляс,

- Е.А. Науменко // Ломоносов - 2007. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва: 2007. – С. 123.
8. **Хиляс И.В.** Редукция ароматического кольца 2,4,6-тринитротолуола – как путь, ведущий к его разрушению / И.В. Хиляс, А.М. Зиганшин, Е.А. Науменко, Р.П. Наумова // Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии. Региональная конференция с международным участием. Екатеринбург - Пермь: 2007. – С. 29–30.
9. **Хиляс И.В.** Образование восьми различных гидридных комплексов Мейзенгеймера при трансформации 2,4,6-тринитротолуола низшими эукариотами / И.В. Хиляс, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Международный экологический форум. Вестник Российской военно-медицинской академии. Санкт-Петербург: 2008. – С. 167.
10. Safiullina L.F. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene through the aromatic ring reduction / L.F. Safiullina, A.M. Ziganshin, A.P. Lozhkin, **I.V. Khilyas**, R.P. Naumova // First Interuniversity Conference on Modern Biology «Bio-news». - Kazan: 2008. – Р. 36.
11. **Хиляс И.В.** Трансформация 2,4,6-тринитротолуола низшими эукариотами в условиях непрерывного культивирования / И.В. Хиляс, Л.Ф. Сафиуллина, А.М. Зиганшин // Ломоносов - 2009. XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва: 2009. – С. 174–175.
12. **Хиляс И.В.** Способ биodeградации ТНТ-загрязненных сточных вод и создание установки для его осуществления / И.В. Хиляс, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Наука и инновации в решении актуальных проблем города. Конференция студентов и аспирантов. Казань: 2009. – С. 26–27.
13. **Хиляс И.В.** Микробный биосенсор для экспресс-детекции токсичных нитроароматических соединений / И.В. Хиляс, Л.Ф. Сафиуллина, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Становление и достижения биохимической школы Казанского Университета. Научно-практическая конференция биохимиков, посвященная памяти проф. В. Г. Винтера (1939-2005). Казань: 2009. – С. 118.
14. **Хиляс И.В.** Оценка токсичности в процессе деструкции 2,4,6-тринитротолуола дрожжами в условиях непрерывного режима культивирования / И.В. Хиляс, Л.Ф. Сафиуллина, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов “Симбиоз-Россия 2010”. – Нижний Новгород, 2010. – С. 80–81.
15. **Хиляс И.В.** Биodeградация 2,4,6-тринитротолуола клетками *Yarrowia lipolytica* в присутствии ферригидрита / И.В. Хиляс, А.Р. Багманова, Р. Герлах, А.М. Зиганшин // Высокие технологии, экономика, промышленность. – 2012. – Т. 1. – С. 252.

Е-mail автора: irina.khilyas@gmail.com