

*На правах рукописи*

*А.З.М.*

**ЗИГАНШИН АЙРАТ МАНСУРОВИЧ**

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКОГО КОЛЬЦА  
2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА КАК ПУТЬ ЕГО ДЕГРАДАЦИИ**

03.00.07 – микробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань-2007

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

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Наумова Римма Павловна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор  
Госманов Рауис Госманович  
(Казанская государственная академия  
ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана,  
г.Казань)

доктор биологических наук, профессор  
Мелентьев Александр Иванович  
(Институт биологии УНЦ РАН, г.Уфа)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики  
КНЦ РАН, г.Казань

Защита диссертации состоится «29» ноября 2007 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном 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 государственном университете.

Автореферат разослан « 24 » октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



З. И. Абрамова

**Актуальность проблемы.** Производство и использование различных высокоустойчивых синтетических соединений приводит к загрязнению окружающей среды. Среди них большую опасность представляет 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ, тротил), наиболее часто применяемое взрывчатое вещество, синтез и использование которого приводит к загрязнению почв, воздуха, поверхностных и грунтовых вод. ТНТ и продукты его нитровосстановления относятся к числу токсичных, потенциально мутагенных и устойчивых загрязнителей, способных длительное время циркулировать в природных системах (Rieger, Knackmuss, 1995; Spain et al., 2000). Агентство по защите окружающей среды США отнесло ТНТ к числу наиболее опасных загрязнителей биосферы, и, в связи с этим, предотвращение контаминации и ремедиация ТНТ-загрязненных территорий признаны необходимыми в местах его производства и использования (Fiorella, Spain, 1997).

Обезвреживание объектов, загрязненных взрывчатыми веществами, прежде всего ТНТ, базируется на применении физических, химических и биологических методов. К примеру, сжигание является одним из наиболее эффективных, радикальных методов уничтожения ТНТ в загрязненных почвах, однако этот подход относится к наиболее энергоемким. Кроме того, его реализация сопряжена с дополнительными экологическими проблемами, в частности, с полной деградацией почвы, с выбросом в окружающую среду оксидов азота (Rodgers, Bunce, 2001).

Основные преимущества биоремедиации заключаются в ее экологичности и низкой стоимости (Rodgers, Bunce, 2001).

Известны два альтернативные пути биологической трансформации ТНТ микроорганизмами. Первый из них затрагивает восстановление нитрогрупп ТНТ и ведет к генерации высокотоксичных соединений, в частности гидроксиламино-динитротолуолов (ГАДНТ) в качестве основных метаболитов (Hughes et al., 1998; Наумов с соавт., 1999; Zaripov et al., 2002; Зарипов с соавт., 2004). В то время как данный путь биотрансформации ТНТ является почти универсальным не только для прокариот, но и для высших эукариот, альтернативный механизм обнаружен лишь у довольно узкого круга. В этом случае восстановительная атака направлена не на нитрогруппы, а на ароматическое кольцо ксенобиотика, причем редукция основана на присоединении гидрид-ионов с образованием ТНТ-гидридных комплексов (Vorbeck et al., 1998; Williams et al., 2004). Принципиальное значение имеет тот факт, что именно гидридное восстановление ТНТ может сопровождаться элиминацией нитрогрупп, что означает переключение на пути метаболизма гораздо менее устойчивых соединений, с сокращенным количеством нитрогрупп. Недостатком большинства работ данного направления (Kim, Song, 2000; Jain et al., 2004; Williams et al., 2004) является то, что образующиеся нитриты анализировались только колориметрическим методом, основанным на реакции Грисса, что означает необходимость подтверждения полученных данных с применением более специфичных методов.

Очевидно, что применение микроорганизмов, способных к гидридной редукции ТНТ и последующей деградации образовавшихся комплексов при обезвреживании ТНТ-загрязненных объектов, перспективно с точки зрения эффективности биоремедиации.

ТНТ, помимо экологических аспектов его трансформации, представляет интерес как модель поведения нитроариллов в организме высших эукариот, поскольку они не только контактируют с этим веществом в условиях промышленных производств военного профиля, но и находятся под воздействием лекарств и пестицидов, молекулы которых содержат нитроароматические фрагменты.

**Цель данной работы** – осуществить идентификацию и разностороннюю характеристику совокупности гидридных комплексов – интермедиатов восстановительной атаки 2,4,6-тринитротолуола дрожжами. Оценить роль внешних физико-химических факторов с точки зрения глубины деструкции 2,4,6-тринитротолуола.

**Основные задачи исследования:**

- выделить из природных и антропогенных источников обитания микроорганизмы, способные к гидридной атаке молекулы 2,4,6-тринитротолуола и денитрации образовавшихся гидридных комплексов;
- изучить влияние аэрации на рост изолятов, трансформирующих 2,4,6-тринитротолуол по пути редукции его ароматического кольца, и связанную с этим глубину разложения ксенобиотика;
- охарактеризовать углеродсодержащие метаболиты трансформации 2,4,6-тринитротолуола выделенными штаммами с применением нового ВЭЖХ-диодного метода в сочетании с масс-спектрометрией;
- выявить неорганические продукты денитрации 2,4,6-тринитротолуола и расширить представления о механизме отщепления нитрогрупп от исходного ксенобиотика;
- оценить возможность превращения индивидуальных гидридных комплексов 2,4,6-тринитротолуола как в абиотических условиях, так и под действием клеток дрожжей, реализующих механизм редукции токсиканта по пути присоединения гидрид-ионов к его бензольному кольцу;
- оценить возможности использования выделенных и изученных в данной работе изолятов с точки зрения биоремедиации объектов, загрязненных 2,4,6-тринитротолуолом.

**Научная новизна.** В результате широкого скрининга микроорганизмов в настоящей работе выделены 2 штамма дрожжей – *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4, которые восстанавливают ТНТ по пути присоединения гидрид-ионов к его ароматическому кольцу и одновременно отщепляют нитрогруппы от образовавшихся метаболитов. На основе способности дрожжей к трансформации исходного токсиканта по данному пути впервые обнаружены восемь гидридных комплексов ТНТ, тогда как ранее в литературе сообщалось о существовании лишь пяти форм. Выявлен и охарактеризован также дигидридный комплекс ТНТ, существование

которого раньше базировалось только на предположениях. Все обнаруженные интермедиаты в данной работе охарактеризованы с применением усовершенствованных аналитических методов, что позволило представить их хроматографические, спектрофотометрические и масс-спектральные характеристики.

Установлена способность дрожжей к разрушению трех ТНТ-гидридных комплексов с промежуточной аккумуляцией нитрит-ионов. Впервые доказано образование нитрат-иона как результата окисления дрожжами ранее выделившегося нитрит-иона. Способность к денитрации ТНТ в сочетании с окислением нитрит-иона в нитрат-ион изучаемыми дрожжами уникальна и представляет интерес с точки зрения биоремедиации ТНТ-загрязненных объектов.

Выявлено стимулирующее влияние аэрации и снижения pH среды на деградацию ТНТ-гидридных комплексов дрожжами *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4.

Впервые осуществленная ВЭЖХ-очистка восьми гидридных форм ТНТ позволила продемонстрировать возможность их взаимного абиотического превращения. Доказано непосредственное участие дрожжей в элиминации нитрогрупп из интермедиатов гидридного восстановления ТНТ.

**Практическая значимость.** Способность детектировать метаболиты превращения ТНТ по альтернативным путям его восстановления очень важна с позиций оценки эффективности ремедиации ТНТ-загрязненных объектов. Совершенствование методов обнаружения данных интермедиатов, несомненно, способствует пониманию более глубоких механизмов трансформации исходного взрывчатого вещества. Так, примененный в данной работе новый ВЭЖХ-диодный метод разделения продуктов нитроредукции ТНТ, разработанный коллегами из Университета штата Монтана (США) под руководством профессора Р. Герлаха, позволил разделить и идентифицировать углеродсодержащие метаболиты восстановления ароматического кольца, что не было достигнуто ни в одной из предшествующих работ. Наша работа позволила по-новому взглянуть на механизм трансформации ТНТ низшими эукариотами, обнаружить нитрит- и нитрат-ионы, которые являются индикаторами частичной минерализации исходного токсиканта. Раскрытие данного механизма в будущем должно повысить эффективность технологий по обезвреживанию ТНТ-загрязненных территорий.

Дрожжи *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4, выделенные нами из нефтезагрязненных торфяников и отходов нефтехимии, являются доминирующими микроорганизмами в этих антропогенных местообитаниях. Их поистине удивительная способность выживать и доминировать в таких экстремальных условиях, в сочетании с уникальным механизмом деградации ТНТ, делает данные штаммы перспективными с точки зрения биоремедиации промышленных отходов, загрязненных взрывчатыми веществами.

**Связь работы с научными программами.** Исследования поддержаны федеральными программами “Развитие научного потенциала высшей школы”

РНП.2.1.1.1005, РНП.2.1.1.3222 и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники” ГК 02.434.11.3020, ГК 02.512.11.2050, ГК ФЦКП КГУ 02.451.11.7019, Комиссией Европейских Сообществ, грант ICA2-СТ-2000-10006. Авторские исследования получили персональную поддержку Магистерской/Аспирантской Программы Фулбрайта (США) (Institute of International Education Grantee ID: 15061570).

**Положения, выносимые на защиту.**

1. С применением усовершенствованных физико-химических методов идентифицированы и охарактеризованы восемь гидридных комплексов, которые являются интермедиатами трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4.
2. Установлена возможность взаимного абиотического превращения индивидуальных гидридных форм 2,4,6-тринитротолуола, не сопровождающегося элиминацией нитрогрупп.
3. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола штаммами *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4 через образование промежуточных гидридных комплексов ведет к минерализации исходного ксенобиотика.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации представлены на школах-конференциях молодых ученых “Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии” (Пушино-Тула, 2006) и “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2003, 2005, 2006), научных конференциях “Биотехнология – охране окружающей среде” (Москва, 2006) и “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004), международной конференции “Issues and solutions in discovery and use of novel biomolecules: biodiversity and environment” (Pushchino, 2004).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ.

**Благодарности.** Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору кафедры микробиологии КГУ Наумовой Римме Павловне за предоставление интересной темы диссертационной работы, за ценные идеи в процессе ее выполнения. Благодарность выражается профессору Герлаху Робину (Center for Biofilm Engineering, Montana State University, USA) за приглашение автора в рамках Магистерской/Аспирантской Программы Фулбрайта, за предоставление экспериментального оборудования для выполнения научно-исследовательской работы, за помощь в освоении приборов и методов, в интерпретации результатов. Автор признателен к.б.н. Наумову А. В. за предоставление уникальных штаммов микроэукариот (*Candida* spp), за помощь в создании базовых позиций в изучении малоизвестного пути превращения ТНТ. На первых этапах освоения ВЭЖХ-анализа большую помощь автору оказали к.х.н. Гарусов А. В. (кафедра микробиологии КГУ), к.б.н. Шурхно Р. А. и Абдульханов А. Г. (Тат НИИСХ).

Автор искренне признателен Программе Фулбрайта (США) за предоставление уникальной возможности выполнить часть экспериментальной работы в университете Соединенных Штатов и также

считает своим приятным долгом принести благодарность аспирантам и студентам НИЛ ЭББ КГУ, особенно Науменко Е. А. и Хиляс И. В.

**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 122 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 22 рисунка. Цитируемая литература включает 150 источников, из них 143 иностранных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Источники и условия выделения микроорганизмов.** Для скрининга микроорганизмов, способных к гидридному восстановлению ароматического кольца ТНТ в сочетании с его денитрацией, использовали 428 изолятов, предварительно полученных в НИЛ ЭББ КГУ при посевах воды водоемов – рек Волги и Казанки (в пределах города Казани), активного ила аэротенков, очищающих сточные воды химического и нефтехимического комплексов, незагрязненных черноземных почв, нефтезагрязненных почв нефтедобывающего региона Татарстана, замазученных торфяников Западной Сибири, твердых отходов нефтехимии, на агаризованные среды: мясо-пептонный агар для аэробных гетеротрофов и среду Сабуро для дрожжей.

Предварительный скрининг чистых культур изолятов на способность трансформировать ТНТ по альтернативным путям осуществляли с использованием десятикратно разбавленных мясо-пептонного бульона и жидкой среды Сабуро, содержащих ТНТ в концентрации 0.22 мМ. О функционировании того или иного пути свидетельствовало характерное окрашивание сред: темно-красное в случае гидридного пути, ведущего к образованию ТНТ-моногидридных комплексов, и светло-зеленое в случае мононитровосстановления, сопряженного с аккумуляцией ГАДНТ. Содержание нитрит- и нитрат-ионов оценивали (как указано ниже) у тех штаммов, которые продуцировали ТНТ-гидридные комплексы.

**Идентификация дрожжей.** Родовая и видовая принадлежность дрожжей, выделенных в результате вышеуказанного скрининга, была проведена с использованием определителя Барнета (Barnett et al., 1983). Видовая принадлежность дрожжей была уточнена по результатам секвенирования D2 региона большой субъединицы рРНК в лаборатории MIDILABS ([www.midilabs.com](http://www.midilabs.com)).

**Культивирование дрожжей.** Эксперименты по динамике трансформации ТНТ проводили со штаммами дрожжей: *Yarrowia lipolytica* AN-L15, выделенным из загрязненных нефтью торфяников (Лангепас, Западная Сибирь), и *Geotrichum candidum* AN-Z4, выделенным из нефтешлама – отхода нефтехимического предприятия “Нижнекамск-нефтехим” (Нижнекамск, Татарстан). В отдельных опытах использовали *Candida* spp. AN-L7, AN-L13, AN-L14, AN-L20 – изоляты, выделенные в прежней работе (Zaripov et al., 2002) из нефтезагрязненных торфяников Западной Сибири.

Дрожжи поддерживали в аэробных условиях на агаризованной среде Сабуро, содержащей (г/л дистиллированной воды): глюкозу – 10.0, пептон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 0.25, агар – 20.0. Для изучения трансформации ТНТ использовали синтетическую среду, содержащую (мМ): глюкозу – 28,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 7.6,  $\text{MgSO}_4$  – 2. Фосфатный буфер (рН 6.0-7.0) стерилизовали отдельно и вносили перед инокуляцией в конечной концентрации 16 мМ. ТНТ вносили из расчета 440 мкМ в растворе этанола (0.8 мл 95.6% этанола в 50 мл среды). В отсутствие ТНТ (контроль) в состав синтетической среды также входил этанол в том же количестве.

При изучении динамики превращения ТНТ дрожжи предварительно культивировали в жидкой среде Сабуро с соответствующим рН (AN-L15 в течение одних, AN-Z4 – двух суток), клетки осаждали центрифугированием при 8000g в течение 5 мин и дважды отмывали фосфатным буфером (с соответствующим рН) с последующей инокуляцией синтетических сред с тем же рН в конических колбах на 250 мл при объеме среды 50 мл. Культивировали в аэробных условиях во встряхиваемых колбах (150 об/мин), в статических (без встряхивания) и строго анаэробных условиях (в анаэробном боксе) при 30°C. Исходная оптическая плотность клеток после инокуляции дрожжей соответствовала  $A_{600}$  0.2.

**Световая микроскопия.** При микроскопировании клеток дрожжей применяли микроскоп Nikon Eclipse E-800, оснащенный охлажденной CCD флюоресцентной камерой и программным обеспечением MetaVue (Universal Imaging Corporation).

**Определение способности дрожжей к гетеротрофной нитрификации.** Способность выделенных штаммов микроэукариот окислять ионы аммония с образованием нитроанионов была исследована на среде, содержащей (мМ): глюкозу – 28;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 7.6;  $\text{MgSO}_4$  – 2;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1.94;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 14.06 (рН 6.0). Способность дрожжей к окислению нитрит-иона была испытана на аналогичной среде с дополнительно внесенным  $\text{NaNO}_2$  в количестве 0.24 мМ. Дрожжи инокулировали до конечной  $A_{600}$  1.0 и культивировали аэробно во встряхиваемых колбах (150 об/мин) при 30°C.

**Спектрофотометрия.** Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, USA). Клеточную массу оценивали, измеряя оптическую плотность при 600 нм. Контролем служила освобожденная от клеток культуральная жидкость.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография.** ТНТ и метаболиты альтернативных путей его восстановления анализировали на хроматографе Agilent 1100 Series HPLC, оснащенном автоматическим пробоотборником, инжектором, коллектором фракций, диодным детектором, предколонкой Supelcosil LC-8 и колонкой Supelcosil octyl C-8 (150 x 4.6 мм; 5мкМ). УФ-видимые спектры каждого пика были получены при их сканировании в диапазоне 190-700 нм; детекция при 254, 476 нм. Разделение интермедиатов проводили при 36°C и 50°C после фильтрации проб через 0.2 мкМ фильтры (Spartan 13/0.2 RC, Whatman) и их введения в хроматограф в

количестве 10 мкл. Метод, применявшийся в данной работе, был разработан коллегами из Университета штата Монтана (США) (Borch, Gerlach, 2004).

Хроматография при 36°C позволяла хорошо разделить 2-гидроксиламино-4,6-динитротолуол (2-ГАДНТ) и 4-гидроксиламино-2,6-динитротолуол (4-ГАДНТ), однако сопровождалась коэлюцией 4-амино-2,6-динитротолуола (4-АДНТ) и 2,4-динитротолуола (2,4-ДНТ). Повышение температуры от 36°C до 50°C приводило к четкому разделению 4-АДНТ и 2,4-ДНТ, но вело к частичной коэлюции 4-ГАДНТ и ТНТ. В связи с этим пробы анализировали при двух указанных температурах.

**Масс-спектрометрия.** Масс-спектрометрический анализ методом негативной химической ионизации при атмосферном давлении (НХИ-МС) ТНТ и его интермедиатов проводили на Ion Trap Mass Spectrometer 6300 Series Agilent SL. НХИ-МС анализ метаболитов осуществляли после получения их отдельных фракций с последующим введением в масс-спектрометр. Параметры масс-спектрометрии: газовый поток азота варьировали в диапазоне 1-7 л/мин, температура сухого газа и испарителя 350°C, поток короны 30000 нА, капиллярное напряжение 1800 В.

**Хромато-масс-спектрометрия.** Для дополнительной идентификации 2,4-ДНТ использовали хромато-масс-спектрометрию на приборе 6890N Network GC System, оснащенный массовым детектором 5973 Network, автоматическим пробоотборником 7683 Series, инжектором 7683B Series (Agilent Technologies), колонкой 30 м x 0.25 мм с толщиной пленки 0.25 мкм (Elite-5MS). Подвижная фаза – гелий, скорость потока 37 см/сек. Температуры инжектора и детектора 240°C и 250°C, соответственно. Температуру повышали от 120°C до 240°C со скоростью 6°C/мин.

Пробы анализировали после полной экстракции этиловым эфиром неполярных компонентов из 10 мл культуральной жидкости. Полученный экстракт выпаривали в вакууме, сухой остаток перерастворяли в 0.1 мл ацетона, доводили гексаном до 1 мл и вводили в прибор в количестве 1 мкл.

**Ионная хроматография.** Нитрит- и нитрат-ионы анализировали с помощью ионного хроматографа Dionex (USA), оснащенного градиентным насосом GP40, детектором проводимости CD20, автоматическим пробоотборником AS40, предколонкой IonPac® AG9-НС (4 x 50 мм) и разделительной колонкой IonPac® AS9-НС (4 x 250 мм). Элюцию проводили 9 мМ раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> со скоростью 1.0 мл/мин. В качестве стандартов для построения калибровочных графиков использовали NaNO<sub>2</sub> и NaNO<sub>3</sub>.

Органические кислоты, экскретируемые дрожжами, анализировали ионной хроматографией с использованием разделительной колонки IonPac® AS11 (4mm, 10-32, P/N 44076). Элюцию проводили в градиентном режиме со скоростью 1 мл/мин системой растворителей: бидистиллированная вода, 1 мМ NaOH и 100 мМ NaOH. В первые 2 мин хроматографии мобильная фаза состояла из 90% бидистиллированной воды и 10% 1 мМ NaOH. В следующие 3 мин количество 1 мМ NaOH повышали до 100%, а в последующие 10 мин снижали содержание 1 мМ NaOH до 65% и увеличивали количество 100 мМ

NaOH до 35%. В течение следующей 1 мин градиент возвращали к первоначальному уровню и оставляли неизменным еще 6 мин.

**Статистическая обработка результатов.** В работе использовали стандартный пакет программ “Microsoft Office Excel 2003”. Представление результатов в графиках: среднее арифметическое и стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Выделение микроорганизмов, способных к гидридной атаке ТНТ

Выявление микроорганизмов, способных к возможно более глубокой деградации ТНТ, представляет интерес с фундаментальных позиций, а также в качестве научной основы соответствующих природоохранных технологий. В связи с этим, скрининг на способность трансформировать данный токсикант по пути его гидридного восстановления и разложения сформировавшихся комплексов позволил ранжировать широкий круг микроорганизмов с точки зрения встречаемости этой биохимической активности.

Подавляющее большинство (426 из 428) изолятов, независимо от их происхождения, атаковали ТНТ только по пути нитровосстановления, и лишь два штамма дрожжей (идентифицированные как *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4) проявили в качестве доминирующего механизма альтернативную биохимическую активность, хотя и менее выраженную по сравнению с таковой *Candida* sp. AN-L13 в плане гидридного восстановления ТНТ (Zaripov et al., 2002).

Для сравнительного анализа продукции нитрит- и нитрат-ионов на синтетической среде с ТНТ были привлечены все дрожжи, восстанавливающие ТНТ по ароматическому кольцу, включая 4 изолята, выделенные ранее из торфяников (Zaripov et al., 2002): *Candida* spp. AN-L7, AN-L13, AN-L14, AN-L20. При этом наибольшая аккумуляция нитрит- и нитрат-ионов, освобожденных из молекулы ТНТ, выявлена у штаммов AN-L15 и AN-Z4, что и предопределило их выбор в качестве моделей для последующих экспериментов.

### 2. Трансформация ТНТ штаммами дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4

Эффективность технологий ремедиации ТНТ-загрязненных территорий зависит от методологической основы детекции продуктов биологической и абиотической трансформации ТНТ в природных системах. Недавние попытки наших партнеров из Университета штата Монтана (США) под руководством профессора Р. Герлаха привели к разработке усовершенствованного ВЭЖХ-диодного метода разделения и идентификации интермедиатов конверсии нитрогрупп ТНТ (Borch, Gerlach, 2004). В частности, варьируя температуру хроматографического разделения и композиции элюентов, авторы усовершенствовали режим разделения изомерных 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ, тогда как в работах других исследователей в попытках разделения данных метаболитов не была преодолена их

коэлюция (Michels, Gottschalk, 1994; Vorbeck et al., 1998; Наумов с соавт., 1999; Hawari et al., 1999).

Основная часть нашей работы выполнена в рамках сотрудничества кафедры микробиологии КГУ и Центра инженерии биопленок Университета штата Монтана (США). Основываясь на применении нового метода ВЭЖХ-разделения нитроароматических соединений в сочетании с химическим ионизационным масс-спектрометрическим анализом более детально изучен механизм, затрагивающий редукцию ароматического кольца ТНТ на примере дрожжевых штаммов *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4.

Доминирующий путь превращения ТНТ изучаемыми дрожжами основан на присоединении гидрид-ионов к бензольному кольцу. Нам впервые удалось показать, что гидридное восстановление ксенобиотика сопряжено с образованием восьми различных ТНТ-моно- и дигидридных комплексов, четкое ВЭЖХ-разделение которых представлено на рис. 1 (на примере штамма AN-L15). В ранее опубликованных работах обнаружены лишь пять гидридных форм ТНТ (Vorbeck et al., 1998; Pak et al., 2000; Williams et al., 2004).

Все восемь метаболитов, обнаруженных и изученных в нашей работе, отнесены к ТНТ-гидридным комплексам на основе УФ-видимых спектров, молекулярных масс и на основе их способности к взаимной трансформации, в том числе в абиотических условиях (в отсутствие дрожжевых клеток). Их времена удерживания в условиях ВЭЖХ, УФ-видимые максимумы и молекулярные массы приведены в табл. 1.

Анализ фрагментов, образовавшихся при химической ионизации органических интермедиатов ионной структуры (ТНТ-гидридные комплексы), позволил дифференцировать их следующим образом, в зависимости от  $m/z$  главных ионов: с  $m/z$  227 (С-1 моногидридный комплекс (1-Н<sup>-</sup>-ТНТ, соединение 8); С-3 моногидридный комплекс (3-Н<sup>-</sup>-ТНТ, соединение 7); два изомера 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ (соединения 1 и 5); потеря протона во время НХИ-МС), с  $m/z$  228 (С-3,С-5 дигидридный комплекс (3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТ, соединение 4); потеря протона во время НХИ-МС) и с  $m/z$  230 (три протонированных изомера С-3,С-5 дигидридного комплекса (изомеры 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТН<sup>+</sup>, соединения 2, 3, 6)).

Если существование 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ и трех комплексов с молекулярной массой 230 было известно ранее (Vorbeck et al., 1998; Pak et al., 2000; Williams et al., 2004), то соединения 1 и 5, по-видимому, являются изомерами 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ, которые не были обнаружены ранее. Их спектральные и хроматографические характеристики впервые представлены в данной работе. Нами также впервые был идентифицирован и охарактеризован 1-Н<sup>-</sup>-ТНТ (табл. 1).

В связи с тем, что и ТНТ, и его моногидридные комплексы образуют главный ион с  $m/z$  227 во время масс-спектрометрического анализа, главное отличие масс-спектра ТНТ от масс-спектров гидридных комплексов – это отсутствие ионов с  $m/z$  181-183. Сходные результаты были получены и в другой работе (Yinon et al., 1995), авторы которой проанализировали ТНТ и

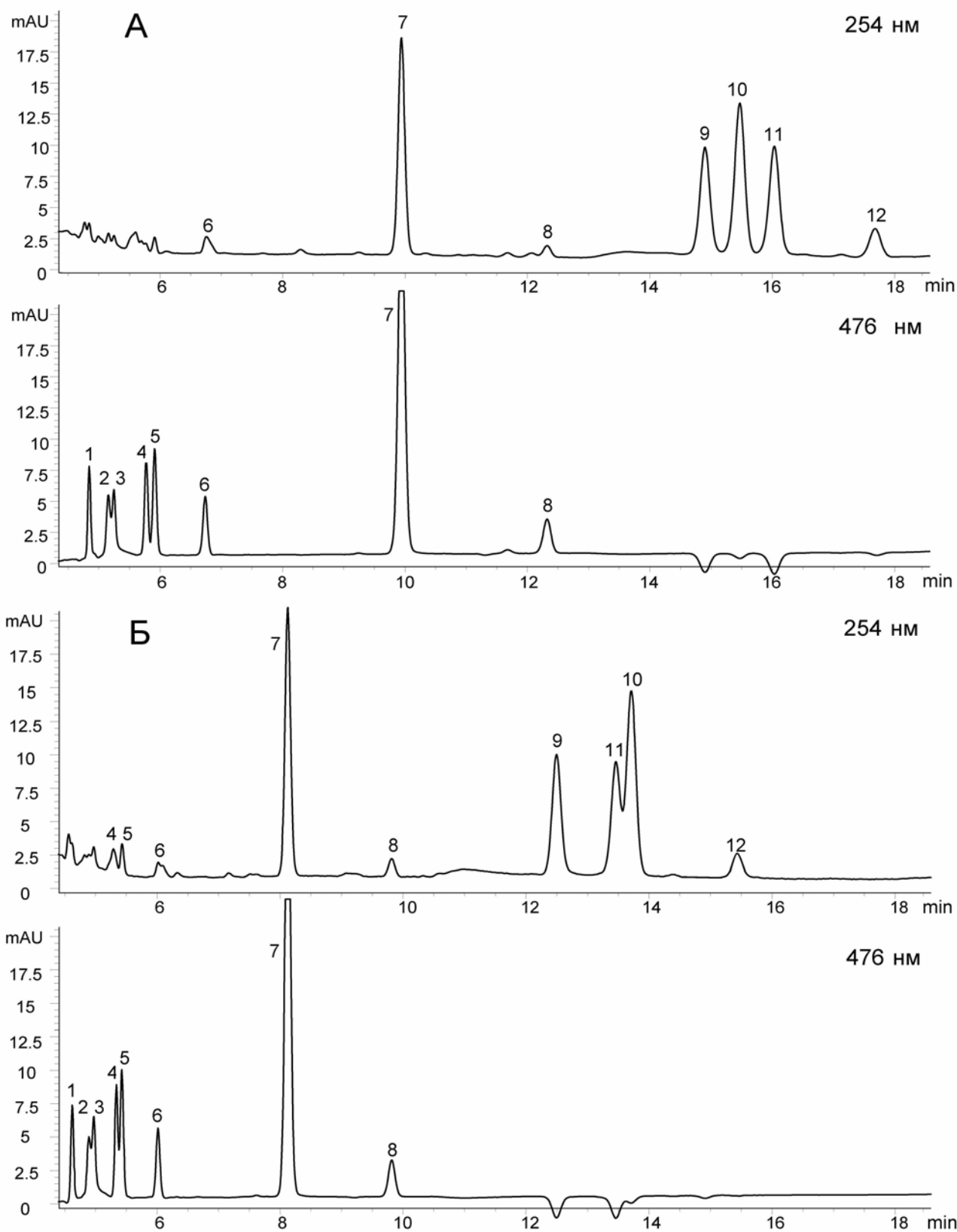


Рис. 1. Разделение метаболитов, образуемых дрожжами *Y. lipolytica* AN-L15 при трансформации ТНТ. ВЭЖХ-хроматограммы получены при 36°C (А) и 50°C (Б), детекция при 254 и 476 нм. Численные обозначения на пиках соответствуют соединениям, представленным в табл. 1. Амино-динитротолуолы (АДНТ) и гидроксиламино-мононитротолуолы (ГАМНТ) не представлены на хроматограмме, так как они никогда не наблюдались совместно со всеми ТНТ-гидридными комплексами.

Таблица 1

Метаболиты, обнаруженные на разных этапах при варьировании условий трансформации ТНТ штаммами *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4

№	Соединение	НХИ-МС <sup>a</sup>	ВЭЖХ 36°С, мин <sup>b</sup>	ВЭЖХ 50°С, мин <sup>b</sup>	Спектро- фотометрия <sup>c</sup>
1	Изомер 3-Н <sup>-</sup> -ТНТ	<b>227</b>	4.8	4.6	261, 445
2	3,5-2Н <sup>-</sup> -ТНТН <sup>+</sup>	<b>230</b>	5.2	4.8	266, 426
3	3,5-2Н <sup>-</sup> -ТНТН <sup>+</sup>	<b>230</b>	5.3	4.9	263, 478
4	3,5-2Н <sup>-</sup> -ТНТ	<b>228</b>	5.7	5.3	325, 512
5	Изомер 3-Н <sup>-</sup> -ТНТ	<b>227</b>	5.9	5.4	262, 465
6	3,5-2Н <sup>-</sup> -ТНТН <sup>+</sup>	<b>230</b>	6.7	6.0	263, 491
7	3-Н <sup>-</sup> -ТНТ	<b>227</b>	9.9	8.1	256, 480, 550
8	1-Н <sup>-</sup> -ТНТ	<b>227</b>	12.3	9.8	251, 478, 551
9	2-ГАДНТ	<b>212</b>	14.8	12.4	228, 265, 356
10	ТНТ	<b>227</b>	15.4	13.7	230
11	4-ГАДНТ	<b>212</b>	16.0	13.4	232, 350
12	2,4-ДНТ	<b>181</b>	17.7	15.4	250
13	2-АДНТ	<b>196</b>	17.0	14.4	232, 274, 385
14	4-АДНТ	<b>196</b>	17.6	14.9	235, 372
15-16	ГАМНТ	<b>167</b>	10.9/11.1	-	-

<sup>a</sup> Главные ионы, обнаруженные во время масс-спектрометрического анализа.

<sup>b</sup> Времена удерживания в условиях ВЭЖХ при двух температурах разделения.

<sup>c</sup> УФ-видимые максимумы поглощения.

### 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ (соединение 7) методом НХИ-МС.

Применение усовершенствованного метода разделения нитроароматических соединений позволило нам впервые идентифицировать 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТ. В то время как ранее существование данного метаболита базировалось лишь на предположениях (Vorbeck et al., 1998), нами было достигнуто его отделение от трех изомеров 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТН<sup>+</sup>, что позволило впервые получить его истинные масс-, УФ-видимый спектры.

Трансформация ТНТ штаммами *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4 вела не только к синтезу восьми гидридных комплексов ТНТ, но и к редукации нитрогрупп с образованием 2-ГАДНТ, 4-ГАДНТ, 2-амино-4,6-динитротолуола (2-АДНТ) и 4-амино-2,6-динитротолуола (4-АДНТ) (табл. 1). Времена удерживания, масс- и УФ-видимые спектры биологически образовавшихся ГАДНТ и АДНТ при конверсии ТНТ полностью соответствовали таковым, полученным при анализе химических стандартов.

Начальный этап трансформации ТНТ, независимо от условий эксперимента (аэрации и исходного рН среды), сопровождался как аккумуляцией темно-красных ТНТ-моногидридных комплексов, так и продуктов мононитроредукации исходного токсиканта. Внесение клеток штамма AN-L15 до конечной А<sub>600</sub> 0.2 в среду (рН 6.0), содержащую ТНТ (440

мкМ), на начальном этапе вело к доминирующему накоплению 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ и к минорным метаболитам –1-Н<sup>-</sup>-ТНТ, 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ (рис. 2).

После 10 ч роста штамма *Y. lipolytica* AN-L15 происходило частичное превращение 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ в ряд других ТНТ-гидридных комплексов, однако на данном этапе эксперимента их концентрация оставалась незначительной (рис. 2А). На данном этапе начиналась и аккумуляция нитритов, что было надежно подтверждено ионной хроматографией (рис. 2Б).

Второй этап культивирования дрожжей, наряду с увеличением концентрации ГАДНТ, сопровождался убылью 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ и одновременным масштабным синтезом еще 6 ТНТ-моногидридных и дигидридных комплексов. К тому же, стадия убыли 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ сопровождалась и аккумуляцией 2,4-ДНТ (58 мкМ) и нитрат-иона (рис. 2). Время удерживания 2,4-ДНТ в условиях ВЭЖХ представлено в табл. 1, оно идентично таковому коммерческого препарата; УФ спектры и масс-спектры обоих соединений также были сходными (табл. 1). Образование 2,4-ДНТ было подтверждено также хромато-масс-спектрометрией, время его удерживания в условиях газовой хроматографии 7.5 мин.

Продукция 2,4-ДНТ дрожжами начиналась исключительно на стадии убыли 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ и продолжалась вплоть до его полного исчезновения. Параллельно ионная хроматография выявила аккумуляцию нитрат-иона, тогда как концентрация нитрит-иона, увеличиваясь очень медленно, оставалась на низком уровне. Образование нитрат-иона продолжалось и после полного исчезновения из среды 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ, то есть на стадии постепенной убыли изомеров 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТН<sup>+</sup>, что свидетельствует о существовании и другого механизма отщепления нитрогрупп от молекулы ТНТ (рис. 2). В контрольном варианте, в отсутствие ТНТ, появления NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> не обнаружены, что свидетельствует в пользу непосредственного участия ТНТ в их образовании.

Дальнейшее культивирование *Y. lipolytica* AN-L15 вело к снижению концентрации динитротолуола и появлению еще двух дополнительных пиков в условиях ВЭЖХ с временами удерживания 10.9 и 11.1 мин (анализ образцов при 36°С) (табл. 1). НХИ-МС обоих метаболитов выявила образование доминирующего иона с m/z 167, что позволило отнести их к продуктам мононитроредукции 2,4-ДНТ – 2-гидроксиамино-4-мононитротолуолу (2-ГАМНТ) и 4-гидроксиамино-2-мононитротолуолу (4-ГАМНТ). Данные метаболиты выделялись в среду и при замене ТНТ на 2,4-ДНТ, что говорит о непосредственном участии 2,4-ДНТ в их образовании. В свою очередь, такие возможные продукты разложения 2,4-ДНТ как мононитротолуолы или их производные отсутствовали среди метаболитов.

Интересно, что на стадии превращения 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ в изомеры 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТН<sup>+</sup> и 2,4-ДНТ, трансформация оставшегося ТНТ шла преимущественно по пути нитроредукции с образованием 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ, при этом концентрация 4-ГАДНТ превышала количество его изомера примерно в 2 раза (рис. 2). Концентрация же ГАДНТ, образовавшихся на стадии убыли 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ, была несколько выше остаточного ТНТ как источника ГАДНТ, что

позволяет предполагать возможное абиотическое превращение некоторой части 3-Н-ТНТ обратно в ТНТ с его уже последующей конверсией в продукты мононитроредукции.

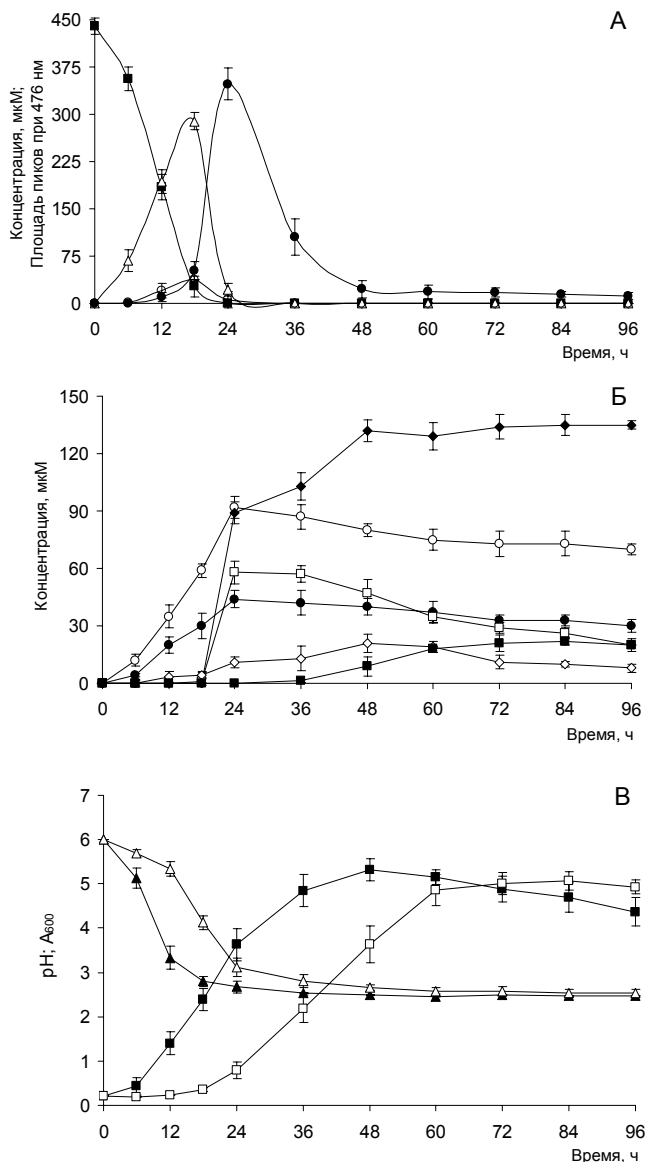


Рис. 2. Образование метаболитов при трансформации ТНТ штаммом *Y. lipolytica* AN-L15 в аэробных условиях роста (рН 6.0; принудительная аэрация). Символы: (А) ■, ТНТ; △, 3-Н-ТНТ (мкМ); ○, 1-Н-ТНТ; ●, сумма соединений 1, 2, 3, 4, 5 и 6, выраженная как площадь их ВЭЖХ-пиков. (Б) ●, 2-ГАДНТ; ○, 4-ГАДНТ; ◇, нитрит-ион; ◆, нитрат-ион; □, 2,4-ДНТ; ■, ГАМНТ. (В) Изменение рН среды во время роста *Y. lipolytica* AN-L15. Символы: ■, рост и ▲, динамика рН в отсутствие ТНТ; □, рост и △, динамика рН в присутствии ТНТ.

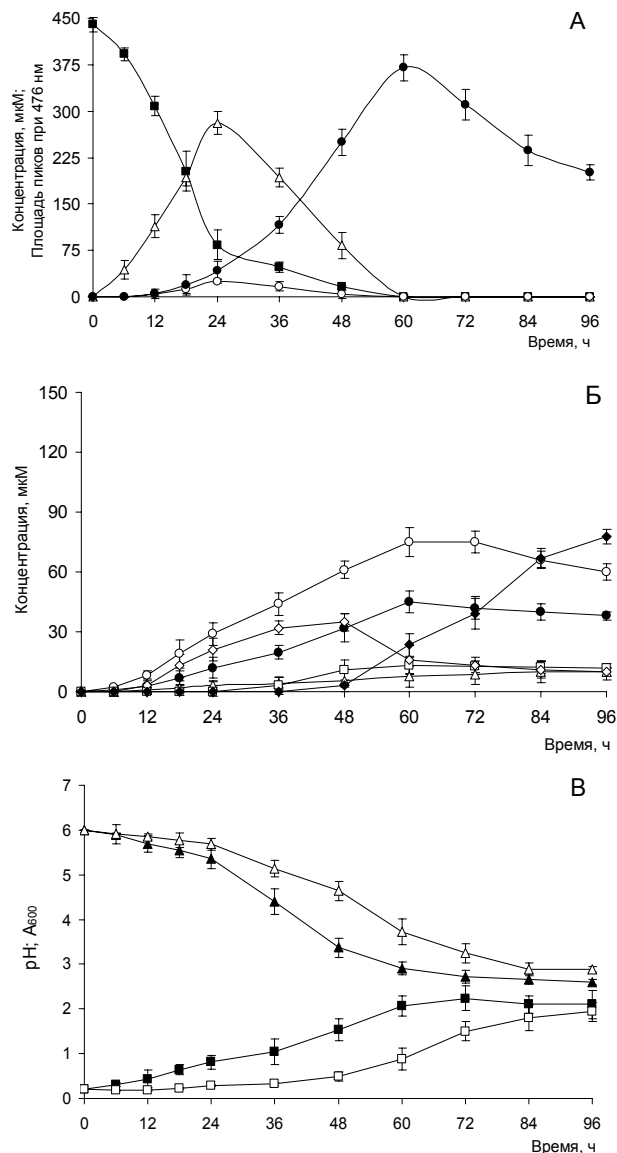


Рис. 3. Образование метаболитов в ходе трансформации ТНТ штаммом *Y. lipolytica* AN-L15 в статических условиях роста (рН 6.0; без встряхивания). Символы: (А) ■, ТНТ; △, 3-Н-ТНТ (мкМ); ○, 1-Н-ТНТ; ●, сумма соединений 1, 2, 3, 4, 5 и 6, выраженная как площадь их ВЭЖХ-пиков. (Б) ●, 2-ГАДНТ; ○, 4-ГАДНТ; ◇, нитрит-ион; ◆, нитрат-ион; □, 2,4-ДНТ; △, 4-АДНТ. (В) Изменение рН среды во время роста *Y. lipolytica* AN-L15. Символы: ■, рост и ▲, динамика рН в отсутствие ТНТ; □, рост и △, динамика рН в присутствии ТНТ.

В связи с известным фактом продуцирования многими дрожжами органических кислот (Anastassiadis et al., 2002), необходимо было оценить динамику pH ростовой среды во время роста *Y. lipolytica* AN-L15.

Инокуляция среды до  $A_{600}$  0.2 в отсутствие ТНТ вела к быстрой инициации роста, тогда как присутствие ТНТ ингибировало начальный рост изучаемого штамма (рис. 2В), когда рост активизировался исключительно на стадии масштабного превращения 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ в ТНТ-гидридные формы и 2,4-ДНТ. Конечная же биомасса в данных условиях через 60 ч достигала примерно одного уровня с вариантом в отсутствие ТНТ.

Измерение pH показало резкое подкисление среды в процессе роста *Y. lipolytica* AN-L15, причем присутствие ТНТ ингибировало также и синтез органических кислот. Следует отметить, что продукция 2,4-ДНТ и образование NO<sub>3</sub><sup>-</sup> начинались только после снижения pH среды с 6.0 до 4.2 (рис. 2Б, В). Анализ образцов ионной хроматографией показал наличие в них цитрата, сукцината и пирувата, выделение которых обусловило резкое подкисление среды в присутствии дрожжей.

Первоначальный этап превращения ТНТ в ростовой среде (pH 7.0) штаммом *Y. lipolytica* AN-L15 был сходен с таковым в условиях исходного pH 6.0 в тот же период времени. Убыль 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ (285 мкМ) также сопровождалась снижением pH среды (до 5.5) и появлением в среде 2,4-ДНТ и аккумуляцией нитрита. Количество же динитросоединения составило лишь 12 мкМ при концентрации нитрит-иона на уровне 84 мкМ. Дальнейший рост клеток вел к резкому падению pH среды до 3.7 и одновременному превращению NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в нестехиометрическое количество NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, максимальное количество которого составило 68 мкМ.

На стадии превращения нитрит-иона обнаружен 4-АДНТ (6 мкМ), время удерживания которого в условиях ВЭЖХ, данные спектрофотометрии и НХИ-МС представлены в табл. 1 и соответствовали таковым химического стандарта. Максимальные зафиксированные концентрации 2-ГАДНТ и 4-ГАДНТ составили 51 и 76 мкМ, соответственно.

Рост дрожжей также активизировался только на стадии снижения концентрации 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ; конечная же биомасса достигала уровня, отмеченного в отсутствие ТНТ, однако с замедлением на 36 ч.

Сопоставление результатов, полученных при разных значениях pH среды роста, свидетельствует о том, что сдвиг pH всего лишь на единицу существенно влияет на темпы преобразования ТНТ-гидридных комплексов. Очень важно, что смещение pH в нейтральную область ведет к снижению темпов частичной минерализации.

Рис. 3 иллюстрирует динамику трансформации ТНТ, появления метаболитов и изменение pH среды во время роста *Y. lipolytica* AN-L15 при начальном pH 6.0 в статических условиях. Отсутствие активной аэрации несколько замедляло трансформацию ксенобиотика в 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ, а последнего в гидридные формы и 2,4-ДНТ. Однако общие тенденции конверсии ТНТ данным штаммом в этих условиях были сходны с рассмотренными выше. На стадии уменьшения количества 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ (точнее, при снижении pH среды с

5.7 до 3.7) также наблюдалась продукция небольшого количества 2,4-ДНТ (до 13 мкМ). Нитрит-ион появился уже на начальных этапах трансформации ТНТ. Интересно отметить, что снижение рН среды ниже 4.2, как и в условиях активной аэрации, сопровождалось окислением выделившихся нитритов, хотя темпы и масштабы продукции нитрат-иона несоизмеримо меньше.

Рост *Y. lipolytica* AN-L15 в присутствии ТНТ активизировался, также как и в выше рассмотренных случаях, на стадии убыли 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ. Однако сниженная аэрация среды сильно отразилась на способности изучаемого штамма расти как в отсутствие, так и в присутствии ТНТ. Так, конечный урожай клеточной массы в обоих случаях достиг примерно одного уровня, но был ниже таковых, полученных в аэробных условиях (рН 6.0) (рис. 2В, 3В).

Смещение рН среды в область 7.0 привело к аналогичным динамикам убыли ТНТ и в дальнейшем сформировавшегося доминирующего 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ (263 мкМ) во время роста *Y. lipolytica* AN-L15 с таковыми, описанными выше для начального рН среды 6.0 в статических условиях.

Данные условия, наряду с продукцией 2-ГАДНТ (47 мкМ), 4-ГАДНТ (56 мкМ) и 4-АДНТ (15 мкМ), привели к появлению в среде небольшого количества 2-АДНТ (8 мкМ) (результаты ВЭЖХ-диодного анализа и масс-спектрометрии представлены в табл. 1).

Однако в этих условиях такой продукт отщепления от молекулы 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ как 2,4-ДНТ обнаружен не был, отсутствовал также и нитрат-ион. Отсутствие последних двух метаболитов можно объяснить слабым подкислением среды (с рН 7.0 до 4.8 в течение 96 ч эксперимента) в статических условиях, что, по-видимому, и является главным условием образования 2,4-ДНТ и окисления NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Максимальная концентрация нитрит-иона была зафиксирована на уровне 95 мкМ.

Ростовые кривые, полученные в данных условиях, были сходными с описанными выше при исходном рН 6.0 в статических условиях.

Сходные результаты получены и для штамма *G. candidum* AN-Z4 за исключением увеличения количества продуктов нитроредукции в статических условиях.

Предполагаемые пути трансформации ТНТ штаммами дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4 приведены на рис. 4.

Трансформация молекулы ТНТ по пути редукции нитрогрупп штаммом AN-L15 являлась менее масштабной, так как общее количество продуктов восстановления нитрогрупп никогда не превышало 30% от суммы всех образовавшихся метаболитов. В случае штамма AN-Z4 гидридный путь также являлся доминирующим, но количество интермедиатов нитроредукции увеличивалось в статических условиях (с 33% до 45%). Концентрации же 4-ГАДНТ и 4-АДНТ превышали количества их изомеров (2-ГАДНТ и 2-АДНТ), что сходно с результатами других исследователей о преимущественной ориентации биологического восстановления нитрогрупп ТНТ, направленного на NO<sub>2</sub>-группу в *para* положении (Hawari et al., 1998; Esteve-Nunez et al., 2001; Borch et al., 2005).

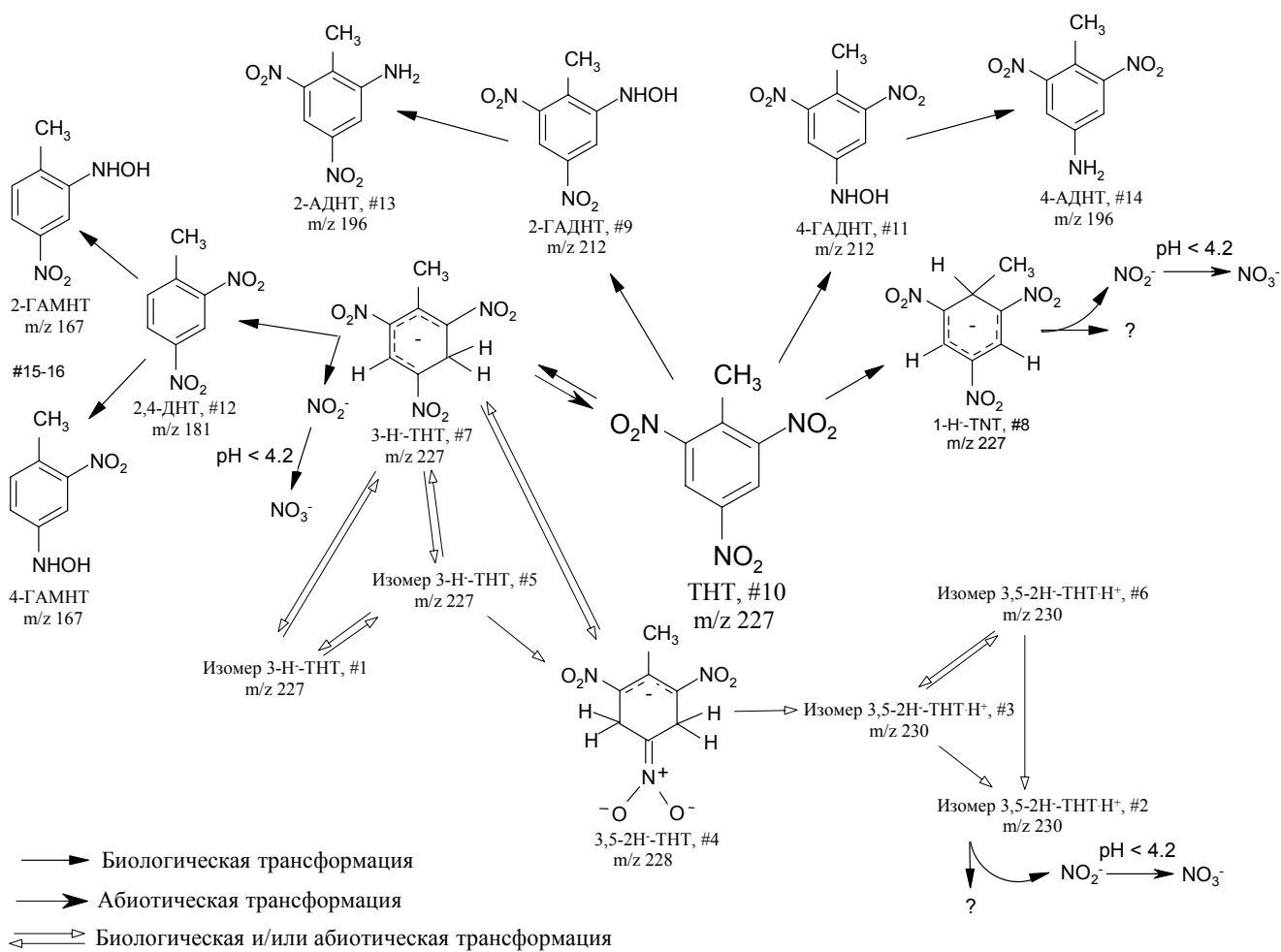


Рис. 4. Предполагаемые пути трансформации ТНТ штаммами дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4 и возможная абиотическая конверсия сформировавшихся ТНТ-гидридных комплексов.

Восстановление ароматического кольца ТНТ изученными штаммами дрожжей, помимо образования метаболитов органической природы, вело и к аккумуляции неорганических соединений азота, что согласуется с позицией ряда исследователей (Kim, Song, 2000б; Jain et al., 2004; Williams et al., 2004), считающих данный путь “продуктивным” путем трансформации ТНТ. В связи с тем, что выявление нитритов и их количественное определение имеет исключительное значение для оценки эффективности механизма и глубины деструкции ТНТ, критику Ворбек с соавторами (Vorbeck et al., 1998) в адрес работ с использованием колориметрического метода, дающего ложноположительную реакцию на нитриты в сложных средах, в частности, в присутствии 3-Н-ТНТ, следует адресовать и к результатам работ данных авторов.

Так как штаммы *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4 относятся к дышащим дрожжам, неспособным сбраживать сахара, их рост, кислотообразование и трансформация ТНТ в большой мере зависели от аэрации среды. Так, слабая аэрация (статические условия) вела к торможению роста, низкому выходу клеточной массы, слабому подкислению среды и замедленной трансформации ТНТ.

Заслуживает внимания то, что рост дрожжей в ТНТ-содержащей среде начинался только на стадии формирования дигидридных комплексов ТНТ. Это может быть результатом токсичности ТНТ, его моногидридных форм или соединений, образующихся во время их продукции и деградации.

### 3. Превращение нитрит-иона в присутствии и в отсутствие дрожжевых клеток

В нашей работе впервые показана способность микроэукариот *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4 к окислению нитрит-иона с образованием нитрат-иона (рис. 5). Этот механизм функционировал как при окислении  $\text{NO}_2^-$ , выделявшегося в среду роста в результате разрушения ТНТ-гидридных комплексов, так и при превращении экзогенного нитрита, вносимого к растущей культуре дрожжей. pH-зависимость данного процесса указывает на существование фермента, катализирующего данный процесс (этот механизм инициировался при снижении pH среды ниже 4.2).

В литературе имеются сведения о способности некоторых дрожжей и грибов к гетеротрофной нитрификации (Kuenen, Robertson, 1994; Falih, Wainwright, 1995). Гетеротрофные нитрификаторы окисляют широкий ряд восстановленных азотсодержащих соединений, однако неспособность получать энергию из этих реакций требует присутствия органических источников редуцирующих эквивалентов. Субстратами для нитрификации грибами в большинстве случаев являются ионы аммония и алифатические азотсодержащие соединения. Имеются сообщения и о вовлечении нитрита в гетеротрофную нитрификацию у грибов. К примеру, *Aspergillus wentii* был способен окислять нитрит-ион в нитрат-ион (Kuenen, Robertson, 1994).

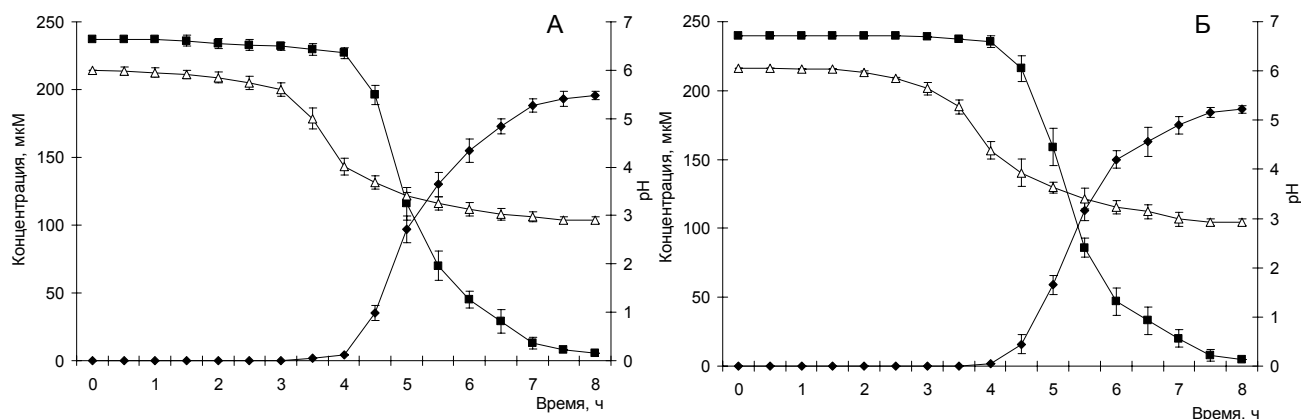


Рис. 5. Окисление нитрит-иона штаммами *Y. lipolytica* AN-L15 (А) и *G. candidum* AN-Z4 (Б) в отсутствие ТНТ. Символы: ■, нитрит-ион; ◆, нитрат-ион; △, изменение pH.

До нашего исследования в литературе не была известна способность дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Geotrichum candidum* окислять нитрит-ион с образованием нитрат-иона. Ввиду того, что нитрит-ион токсичен для дрожжей в связи с образованием азотистой кислоты при низких значениях pH среды (Бабьева, Голубев, 1979), не исключено функционирование

механизма защиты клеток от этого метаболита, результатом чего является его постепенное превращение в нитрат-ион.

Наши исследования показали также возможность абиотического превращения нитрит-иона, проявляющуюся исключительно при значениях pH ниже 4.5. Неустойчивость азотистой кислоты в водных растворах с образованием нитрат-иона и окиси азота – известный науке факт (Беляев, 2003):



В нашем случае количество образовавшегося нитрат-иона в отсутствие клеток дрожжей было гораздо ниже такового, образующегося в их присутствии, что может свидетельствовать об участии биологического фактора в реализации данного механизма.

#### 4. Трансформация ВЭЖХ-очищенных ТНТ-гидридных комплексов

В нашей работе впервые изучена зависимость стабильности ВЭЖХ-очищенного 3-Н-ТНТ от pH среды в отсутствие дрожжевых клеток. Установлено, что подкисление способствует, наряду с обратной трансформацией 3-Н-ТНТ в исходный ксенобиотик, продукции его двух потенциальных изомеров и 3,5-2Н-ТНТ (рис. 6). Масштабы образования этих же метаболитов в абиотических условиях в сравнении с их продукцией дрожжевыми клетками были очень низкими. В связи с тем, что pH среды в присутствии клеток снижается очень быстро, нельзя исключить и абиотическое превращение части 3-Н-ТНТ как обратно в ТНТ, так и в соединения 1, 4 и 5.

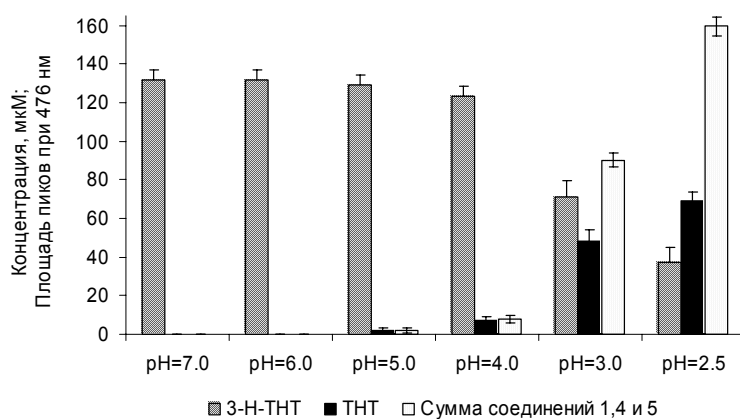


Рис. 6. Абиотическая трансформация ВЭЖХ-очищенного 3-Н-ТНТ при различных значениях pH (после 30 мин). Концентрация 3-Н-ТНТ и ТНТ выражена в мкМ, количество соединений 1, 4 и 5 – как общая сумма их ВЭЖХ-пиков (детекция при 476 нм).

ВЭЖХ-разделение и очистка метаболитов в сочетании с высушиванием в вакууме позволили исследовать индивидуальные ТНТ-гидридные комплексы. С позиций теоретических представлений о механизмах гидридного восстановления ТНТ серьезный интерес представляет выявленное нами сочетание биологических и чисто химических превращений интермедиатов данного восстановления. Если ранее при спонтанном абиотическом превращении химически синтезированного 3-Н-ТНТ единственным обнаруженным продуктом был ТНТ (Vorbeck et al., 1998; Pak

et al., 2000), то наша работа наряду с этим демонстрирует способность 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ абиотически превращаться в его изомеры (соединения 1 и 5) и 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТ. Нами выявлена способность и других пяти гидридных форм ТНТ (за исключением изомера 3,5-2Н<sup>-</sup>-ТНТ<sup>-</sup>Н<sup>+</sup> (соединения 2) и 1-Н<sup>-</sup>-ТНТ) к взаимопревращениям в отсутствие клеток дрожжей (табл. 2, рис. 4). Принципиально важно, что все небиологические реакции протекали без элиминации нитрогрупп.

Таблица 2

Абиотическая конверсия ТНТ-гидридных комплексов								
<i>a</i>								
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8
# 1	70%	–	–	–	67.5%	–	1.5%	–
# 2	–	95%	29%	3%	–	15%	–	–
# 3	–	–	57%	2%	–	69%	–	–
# 4	–	–	–	76%	2%	–	1%	–
# 5	23%	–	–	–	20%	–	1%	–
# 6	–	–	14%	–	–	16%	–	–
# 7	7%	–	–	18%	9%	–	11%	–
# 8	–	–	–	–	–	–	–	98%
ТНТ	–	–	–	1%	1.5%	–	85.5%	–

<sup>a</sup> Метаболиты очищены и собраны автоматическим коллектором фракций во время ВЭЖХ-диодного анализа, высушены в вакууме, перерастворены в фосфатном буфере (рН 7.0) и инкубированы в отсутствие клеток в течение 24 ч при 30°C.

<sup>b</sup> Метаболиты, обнаруженные после 24 ч инкубации.

Инкубация индивидуальных ТНТ-гидридных комплексов (за исключением 1-Н<sup>-</sup>-ТНТ) в присутствии изучаемых микроэукариот вела к аккумуляции соединения 2 и его постепенному исчезновению и параллельно с накоплением нитрит-иона, в дальнейшем окисляющегося в нитрат-ион. По-видимому, дрожжевым штаммам *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4, помимо первого механизма элиминации нитрогрупп из 3-Н<sup>-</sup>-ТНТ с одновременным образованием 2,4-ДНТ, свойственен и путь деградации исходного ксенобиотика, протекающий через разрушение соединения 2.

Третий путь отщепления нитрогруппы от ТНТ включал предшествующее образование 1-Н<sup>-</sup>-ТНТ.

Дрожжи *Y. lipolytica* AN-L15 и *G. candidum* AN-Z4, выделенные нами из нефтезагрязненных торфяников и нефтешламов, относятся к числу доминирующих микроорганизмов в этих антропогенных местообитаниях. Способность выживать и доминировать в таких экстремальных условиях, в сочетании с уникальным механизмом деградации ТНТ, делает данные

микроорганизмы перспективными с точки зрения биоремедиации промышленных отходов, загрязненных взрывчатыми веществами.

## ВЫВОДЫ

1. Из антропогенных экосистем выделены два дрожжевых штамма *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4, оказавшиеся способными к доминирующему превращению 2,4,6-тринитротолуола по пути атаки его бензольного кольца и денитрации образовавшихся гидридных комплексов. Изучаемые дрожжи способны, хотя и в меньшей мере, и к альтернативному превращению исходного ксенобиотика – восстановлению его нитрогрупп.
2. Выявлено решающее значение аэрации для роста изучаемых дрожжей, а также вызываемого ими кислотообразования и связанной с ними глубины деструкции молекулы 2,4,6-тринитротолуола.
3. ВЭЖХ-диодный и масс-спектрометрический анализ интермедиатов трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами по пути восстановления ароматического кольца позволил обнаружить восемь гидридных комплексов, три из которых выделены и охарактеризованы впервые. Наряду с этим идентифицирован дигидридный комплекс, формирование которого раньше основывалось лишь на предположениях. В качестве метаболитов, образующихся при реализации механизма двухэлектронного нитровосстановления, обнаружены изомерные гидросиламино-динитротолуолы и аминок-динитротолуолы. В числе органических интермедиатов идентифицированы 2,4-динитротолуол и продукты его нитроредукции – гидросиламино-мононитротолуолы.
4. Денитрация 2,4,6-тринитротолуола происходила на уровне двух его моногидридных и одного протонированного дигидридного комплексов. В качестве продукта отщепления нитрогруппы выявлен нитрит-ион, дальнейшее биоокисление которого в кислой среде вело к аккумуляции нитрат-иона.
5. Абиотическая трансформация шести из восьми индивидуальных гидридных комплексов выявила возможность их взаимопревращений без денитрации, тогда как присутствие дрожжей вело к их деструкции и накоплению нитрит-иона с последующим его окислением в нитрат-ион.
6. Штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* AN-L15 и *Geotrichum candidum* AN-Z4, в связи с их уникальной способностью к углубленной деградации 2,4,6-тринитротолуола, перспективны с точки зрения создания биотехнологий для ремедиации территорий, загрязненных взрывчатыми веществами.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Зиганшин А. М.** Гидридное восстановление 2,4,6-тринитротолуола дрожжами – путь к его глубокой деструкции / А. М. Зиганшин, А. В. Наумов, Е. С. Суворова, Е. А. Науменко, Р. П. Наумова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 766–773.

2. **Ziganshin A. M.** Production of eight different hydride complexes and nitrite release from 2,4,6-trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica* / A. M. Ziganshin, R. Gerlach, T. Borch, A. V. Naumov, R. P. Naumova // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, № 24. – doi:10.1128/AEM.01296-07.
3. Науменко Е. А. Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е. А. Науменко, А. В. Наумов, Е. С. Суворова, Р. Герлах, **А. М. Зиганшин**, А. П. Ложкин, Н. И. Силкин, Р. П. Наумова // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 2. – С. 215–225.
4. Науменко Е. А. Образование активных форм кислорода в процессе аэробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола бактериями / Е. А. Науменко, А. В. Наумов, **А. М. Зиганшин**, А. П. Ложкин, Н. И. Силкин, Р. П. Наумова; Казан. гос. ун-т. – Казань, 2006. – 20 с. – Деп. в ВИНТИ 27.12.2006, № 1617-B2006.
5. Galiev R. A. Ecologically hazardous petrochemical sludges as a nutrient source for microorganisms / R. A. Galiev, **A. M. Ziganshin**, O. I. Yakusheva, E. V. Nikitina, S. A. Zaripov, A. V. Naumov // Environ. Radioecol. Appl. Ecol. – 2003. – V. 9, № 4. – P. 18–28.
6. Наумова Р. П. Методы химического мониторинга нефтезагрязненных осадков и почв. Методическое пособие / Р. П. Наумова, Е. В. Никитина, О. И. Якушева, С. К. Зарипова, А. В. Гарусов, **А. М. Зиганшин**. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2004. – 24 с.
7. **Зиганшин А. М.** Механизмы метаболической активации и детоксикации экологически опасных нитроароматических ксенобиотиков / А. М. Зиганшин, Е. А. Науменко, А. П. Ложкин, Р. П. Наумова // Сборник материалов Российской школы-конференции молодых ученых: “Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии”. – Пушино-Тула, 2006. – С. 70–72.
8. **Зиганшин А. М.** Гидроксиламины как основные метаболиты трансформации 2,4,6-тринитротолуола прокариотами / А. М. Зиганшин, Е. А. Науменко, А. П. Ложкин, А. Н. Крицкая, Р. П. Наумова // Сборник тезисов 9-ой международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пушино, 2005. – С. 192.
9. Naumov A. V. Microorganisms carrying out “productive” transformation of ecologically hazardous nitroaromatics / A. V. Naumov, **A. M. Ziganshin** // International Conference Science and Business Partnerships in Action: “Issues and Solutions in Discovery and Use of Novel Biomolecules: Biodiversity and Environment”. – Pushchino, 2004. – P. 213.
10. **Зиганшин А. М.** Восстановление ароматического кольца 2,4,6-тринитротолуола дрожжами – обитателями нефтезагрязненных почв и нефтешламов / А. М. Зиганшин, А. И. Гиндуллин, Е. А. Науменко, Р. П. Наумова // Доклады Московского общества испытателей: “Биотехнология – охране окружающей среде”. – Москва, 2006. – С. 220.
11. Костычева Ю. Ф. К вопросу о ремедиации почв, загрязненных взрывчатыми веществами / Ю. Ф. Костычева, **А. М. Зиганшин**,

- Е. А. Науменко, А. В. Наумов // Сборник тезисов научной конференции “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии”. – Казань, 2004. – С. 101.
12. Науменко Е. А. Динамика токсичности в процессе биотрансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е. А. Науменко, А. П. Ложкин, **А. М. Зиганшин**, Р. П. Наумова // Сборник тезисов 10-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН. – Пущино, 2006. – С. 204.
13. Абдрахманова Ю. Ф. Токсикологические аспекты микробной конверсии 2,4,6-тринитротолуола / Ю. Ф. Абдрахманова, С. А. Зарипов, **А. М. Зиганшин**, Н. В. Тимофеева, Р. П. Наумова // Сборник тезисов 7-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пущино, 2003. – С. 260.
14. Зарипов С. А. Альтернативные пути трансформации 2,4,6-тринитротолуола дрожжами / С. А. Зарипов, Ю. Ф. Абдрахманова, Н. В. Тимофеева, **А. М. Зиганшин**, Р. П. Наумова // Сборник тезисов 7-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пущино, 2003. – С. 273.
15. Анিকেев О. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола дрожжами / О. Анিকেев, В. Пантюхин, **А. М. Зиганшин** // Сборник материалов XII всероссийских юношеских чтений имени В. И. Вернадского. – Москва, 2005. – С. 324–327.

E-mail автора: [a.ziganshin06@fulbrightweb.org](mailto:a.ziganshin06@fulbrightweb.org)