

УДК 579.66 : 662.237.3-381

## Биотехнологические подходы к биоремедиации окружающей среды, загрязненной тринитротолуолом

© 2018 Ю.Г. МАКСИМОВА<sup>1,2,\*</sup>, А.Ю. МАКСИМОВ<sup>1,2</sup>, В.А. ДЕМАКОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, 614000

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь 614990

e-mail: yul\_max@mail.ru\*

Поступила 11.12.2017 г.

Принята в печать 23.01.2018 г.

Обзор посвящен рассмотрению стратегий биодеструкции опасного загрязнителя природной среды – взрывчатого вещества 2,4,6-тринитротолуола. Описаны особенности метаболизма этого соединения у микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях и основные ферменты, участвующие в трансформации. Основным классом ферментов, вовлеченных в разрушение тринитротолуола, являются нитроредуктазы; в деградации могут также участвовать оксидазы, гидрогеназы и пероксидазы. Выделены и обсуждаются несколько подходов к биодеградации тринитротолуола в окружающей среде: биоаугментация биомассы штаммов-деструкторов ТНТ и консорциумов микроорганизмов, осуществляющих деградацию этого соединения; стимуляция автохтонной микрофлоры загрязненных природных сред внесением дополнительных субстратов для роста микроорганизмов и доноров электронов для восстановления тринитротолуола; биодеградация поллютанта иммобилизованными клетками микроорганизмов в биореакторах и биофильтрах; фиторемедиация и применение превентивных мер, заключающихся во внедрении спор и лиофилизатов бактерий с биодеградационной активностью в смеси, содержащие нитроароматические соединения.

*Ключевые слова:* тринитротолуол, микроорганизмы, биодеградация, нитроредуктазы, биоаугментация, стимуляция автохтонной микрофлоры, иммобилизованные клетки, фиторемедиация.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-1-9-23

Олигонитроароматические соединения, используемые во многих промышленных процессах, включая производство пестицидов, красителей, полимеров, пластика, гербицидов, взрывчатых веществ, текстиля, бумаги и фармпрепаратов, являются опасными загрязнителями окружающей среды [1]. В течение нескольких десятилетий эти поллютанты попадали в почву, поверхностные и грунтовые воды со стоками промышленных предприятий.

Тринитротолуол — нитроароматическое взрывчатое вещество, которое широко использовалось для военных целей благодаря сочетанию таких

физико-химических свойств, как низкая температура плавления, химическая и температурная стабильность, чувствительность к трению и сотрясению [2]. В настоящее время производство ТНТ в ряде стран прекращено, однако в других странах он до сих пор является основным компонентом многих композитных взрывчатых веществ и исходным веществом для синтеза других нитроароматических соединений [1]. Даже в низких концентрациях ТНТ обладает мутагенным действием на живые организмы (от микробов до человека), является канцерогеном, приводит к таким

*Список сокращений:* ПАВ – поверхностно-активное вещество; ТНТ – тринитротолуол; УФ – ультрафиолетовое излучение; ХПК – химическое потребление кислорода; SIGEX (Substrate-Induced Gene EXpression) – субстрат-индуцированная генная экспрессия.

заболеваниям, как токсический гепатит, дерматит, периферический неврит, катаракта, апластическая анемия, вызывает мышечную боль, цианоз и нарушение функции почек [3].

Для обработки загрязненных ТНТ территорий рассматривалось применение таких методов, как сжигание, компостирование, экстракция, химическое окисление (фотокаталитическое и окисление с помощью УФ/ $H_2O_2$  и реагента Фентона) и адсорбция. Однако использование этих методов имеет свои ограничения и недостатки, заключающиеся в неполной деградации ТНТ, присутствии в продуктах переработки неидентифицированных соединений и дороговизне физико-химических процессов. Так, сжигание является широко применяемым способом ремедиации почв, загрязненных взрывчатыми веществами, однако этот сравнительно дорогой метод нарушает почвенную структуру и сопровождается эмиссией токсичных побочных продуктов в атмосферу. В результате возникает потребность в разработке других, более экономически выгодных и безопасных процессов конверсии ТНТ, в частности, биodeградации этого соединения [3, 4].

Биоремедиация загрязненных ксенобиотиками сред является экономически и экологически приемлемым процессом; однако в случае контаминации ТНТ возникают проблемы, связанные с низкой скоростью минерализации этого соединения. Биоремедиация ТНТ идет с переменным успехом из-за различного поведения этого вещества в почвах разных типов [5]. Причиной длительной биodeградации является также строение молекулы ТНТ, а именно присутствие трех электроноакцепторных нитрогрупп, которые создают стерические ограничения для ферментативной трансформации и обуславливают дефицит электронов в ароматическом кольце. Возможными путями микробного воздействия является окисление либо восстановление одной из двух нитрогрупп ТНТ до моноаминодинитротолуолов и диаминонитротолуолов.

Другой путь связан с внедрением одного или двух гидрид-ионов в ароматическое кольцо, что приводит к образованию комплексов Мейзенгеймера (аддуктов ароматических нитросоединений с нуклеофилом) и часто сопровождается высвобождением нитрита. Перенос электронов катализируется различными типами цитоплазматических нитроредуктаз. Реакционноспособные нитрозо- и гидроксиламинозамещенные интермедиаты могут дополнительно реагировать с конденсированными азоксидимерами и ацетилпроизводны-

ми ТНТ. В жестко анаэробных условиях моноаминодинитротолуолы восстанавливаются до высоко реакционноспособного 2,4,6-триаминотолуола, который может полимеризоваться или необратимо связываться с органическим веществом почвы и таким образом терять подвижность [6].

## ПОДХОДЫ К БИОРЕМЕДИАЦИИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ТНТ

Можно выделить несколько стратегий биоремедиации ТНТ-загрязненных природных сред. Во-первых, это внесение биомассы микроорганизмов с требуемой каталитической активностью с целью усиления процессов биodeградации токсиканта. Подобный процесс известен как биоаугментация [6]. Во-вторых, это стимулирование собственной микрофлоры загрязненных сред. Часто используемой стратегией биоремедиации является стимуляция микроорганизмов, обладающих способностью к деградации поллютантов, путем добавления питательных веществ – субстратов, доноров электронов, неорганических веществ, микроэлементов, которые могут увеличить биodeградирующую активность автохтонной микрофлоры. Биоаугментация штаммами, деградирующими ТНТ, совместно с добавлением в почву питательных веществ, неорганических солей, мелассы, оказывает положительный эффект на процесс биodeградации этого токсиканта [5, 7]. В третьих, это фиторемедиация. Микроорганизмы обладают ферментами, участвующими в деструкции ТНТ, но часто не могут накопить большую биомассу из-за образования в результате такой деструкции веществ, которые в дальнейшем не используются в микробном метаболизме. Биомасса же ризосферы растений достаточно велика, но не содержит необходимых ферментов для деградации ТНТ [8]. Однако использование фиторемедиации для очистки ТНТ-загрязненных почв имеет перспективы, особенно в сочетании с другими вышеописанными способами.

Комплекс мер, которые могут обеспечить биодеструкцию ТНТ в окружающей среде, представлен на рис. 1. Ниже более подробно рассмотрены наиболее эффективные с точки зрения авторов способы биоремедиации ТНТ-загрязненных почв.

### Биоаугментация

Случаи успешной биоаугментации ТНТ-загрязненных природных сред довольно редки. Ее эффективность может быть повышена при двух условиях: 1) использование новых или

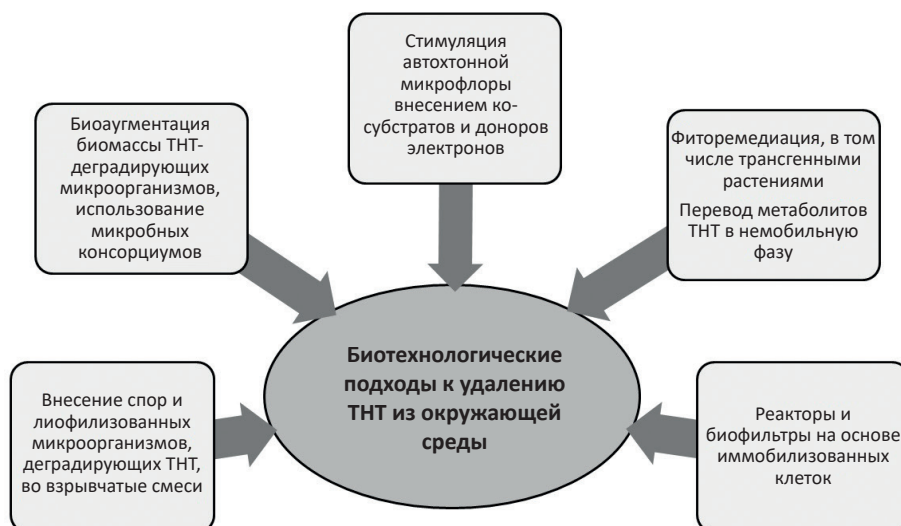


Рис. 1. Схема биоремедиации природных сред, загрязненных TNT

Fig. 1. Scheme of bioremediation of TNT-contaminated environment

модифицированных TNT-деградирующих микроорганизмов, обеспечивающих высокий выход ко-метаболитов с минимальной затратой ко-субстрата; 2) разработка оптимальных физико-химических условий биодеградации. Конкурентные отношения внесенного микроорганизма с автохтонным микробным сообществом могут подорвать процесс биоаугментации. Следовательно, фундаментальные исследования биохимии деградации TNT являются обязательным условием для осуществления любых стратегий биоремедиации [8].

К разрушению TNT способны не только микроорганизмы, выделенные из загрязненных этим веществом сред и селекционированные в направлении повышения их биодеградационной активности, но и микробы, обитающие в естественных, неконтаминированных средах. Так, в результате обработки TNT микробиотой осадков прибрежных зон наблюдали не только минерализацию углерода ароматического кольца молекулы TNT с образованием углекислого газа, но и включение его вместе с азотом в состав бактериальной ДНК [9]. Многочисленные данные, подтверждающие, что TNT очень устойчив к биодеградации микрофлорой, возможно, связаны с тем, что исследования проводились с бактериальными изолятами, выделенными из вод, где наблюдается недостаток фосфора. Способность к минерализации TNT с образованием углекислого газа была обнаружена у микрофлоры осадков прибрежных вод, примыкающих к биомам умеренной широколиственной, северной хвойной и тропической зон. Возможно, способность к трансформации TNT находится в определенной связи с лигнинолитической актив-

ностью микроорганизмов [10]. Поэтому можно заключить, что и микроорганизмы в естественной среде обитания могут содержать ферменты биотрансформации TNT.

Следует отметить, что биодеградация TNT более эффективна в средах, подвергнутых длительному воздействию этого токсиканта. Кроме того, микрофлора, стимулированная другими загрязнителями, также может проявлять активность в отношении TNT. Как было показано в исследовании [11], микрофлора почв, загрязненных углеводородами, после биоремедиации демонстрирует более высокую скорость деструкции TNT, чем микрофлора незагрязненных почв. Отмечено трехкратное увеличение распространенности генов нитроредуктазы в таких загрязненных и впоследствии подвергнутых биологической очистке почвах, что может найти практическое применение при биодеградации TNT [11].

Отдельные виды микроорганизмов крайне редко способны к полной конверсии нитроароматических субстратов в углекислый газ и метан, поэтому для частичной либо полной деградации этого соединения требуется синергическое участие членов микробных консорциумов [12]. Биоаугментация с использованием не одного штамма-деструктора, а консорциума микроорганизмов может обеспечить более эффективную деструкцию токсиканта.

#### Внесение питательных добавок и доноров электронов

Выбор подходящей стратегии биоремедиации обычно зависит от характера загрязнений и особенностей природных сред. Технические и

экономические ограничения часто требуют использования методов ремедиации без экскавации, что делает необходимым выбор такой технологии очистки, которая может быть выполнена *in situ*. Подобный метод деструкции поллютанта основан на том, что ТНТ-деградирующие бактерии распространены повсеместно, но им требуются определенные косубстраты (доноры электронов) и бескислородные условия для полной трансформации нитрозамина и нитроароматических соединений [13]. Примеры таких косубстратов и доноров электронов, вносимых в загрязненные ТНТ среды или среду культивирования микроорганизмов для интенсификации процесса биодegradации, представлены в табл. 1.

N.R. Adrian с соавт. для усиления процессов анаэробной биодegradации за счет обогащения загрязненных почв и грунтовых вод микроорганизмами, способными к анаэробной деструкции ТНТ, предлагают добавлять в загрязненные почвы доноры электронов и водорода – этанол и пропиленгликоль [14]. Так как экономический аспект этого процесса является одним из ключевых факторов, предпочтительно в качестве таких добавок использование отходов пищевой промышленности, таких как молочная сыворотка или меласса. Снижение концентрации ТНТ на 90% было показано при добавлении сыворотки в качестве доно-

ра электронов, тогда как внесение мелассы и ацетата, как и аллохтонной микрофлоры активного ила, оказалось менее эффективным [13].

Положительный результат может быть получен сочетанием различных стратегий – например, биоаугментации и внесения дополнительных субстратов. Для обработки ТНТ-содержащих грунтовых вод, загрязнение которых происходит в местах производства, хранения и испытания боеприпасов, был предложен способ инокуляции природного биоценоза штаммами бактерий *Achromobacter* sp. и *Klebsiella* sp., обладающими способностью к дегradации ТНТ, с добавлением тростниковой мелассы. Штаммы указанных бактерий использовали ТНТ как источник азота, причем биодеструкция шла двумя путями: часть ТНТ трансформировалась в нитротолуол и затем в нитробензол, а другая часть – в аμιнопроизводные или свободный нитрит по механизму нитрозамещения. Второй путь биодegradации доминировал, причем ТНТ полностью удалялся из загрязненных грунтовых вод [15].

Хороших результатов можно добиться не только при внесении в загрязненные почвы питательных веществ для стимулирования роста микробной популяции, но и при добавлении ряда других компонентов. Так, отмечена эффективность активного угля, который снижает токсичность

Таблица 1

**Экзогенные добавки, стимулирующие ТНТ-деградирующую микрофлору**

**Exogenous additives that stimulate TNT-degrading microflora**

Косубстрат или донор электронов (концентрация)	Микроорганизмы, осуществляющие биодegradацию ТНТ	Ссылка
Ацетат, аспартат, цитрат, глюкоза, глицерин, яблочная кислота, меласса, пируват, сукцинат (0,5%)	<i>Pseudomonas putida</i>	[49]
Неорганическая соль, растительные экстракты, меласса, экстракт листьев капусты	Микробный консорциум AM 06: <i>Klebsiella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	[5]
Порошкообразный Fe <sup>0</sup> (0,2–2%), меласса (5 л/м <sup>2</sup> ), DARAMEND™ – твердофазные органические добавки с питательными веществами (0,5–10%)	Автохтонная микрофлора почв (биоремедиация <i>in situ</i> )	[8]
Сахароза (0,25%)	Автохтонная микрофлора почв, загрязненных ТНТ	[7]
Молочная сыворотка, меласса, ацетат	То же	[13]
Удобрения, мочевина	Ризосферные микроорганизмы	[28]
Ферментированный бульон соевых отходов, богатый аминокислотами; глюкоза	<i>Citrobacter youngae</i> E4	[50]
Ферригидрит	Аэробные дрожжи	[51]
Этанол, пропиленгликоль	Смешанная культура метаногенов	[14]



ТНТ и усиливает биоремедиационный потенциал сильно загрязненных почв, а также ПАВ, которые увеличивают скорость десорбции ТНТ и других взрывчатых веществ с частиц почвы, повышая доступность этих субстратов для микроорганизмов [16].

### Фиторемедиация

Использование растений для восстановления загрязненной окружающей среды – перспективное направление, используемое для ремедиации больших площадей, контаминированных тяжелыми металлами и различными ксенобиотиками, в том числе взрывчатыми веществами [16, 17]. Было показано, что такие растения, как *Salix* (ива), *Populus* sp. (тополь), *Betula pendula* (береза), *Picea abies* (пихта) и *Pinus sylvestris* (сосна) способны к ремедиации загрязненных ТНТ земель. Этот поллютант легко включался в ткани деревьев, и около 80% загрязняющего вещества неэкстрактивно связывалось корнями, древесиной, листьями или иглами хвойных пород. Рис, пшеница, кукуруза, мальва, подсолнух и другие травянистые растения также могут участвовать в трансформации ТНТ [16].

Злаковое растение ветивер (*Chrysopogon zizanioides* L.), как было показано, обладает хорошей способностью к деконтаминации ТНТ в воде и почве, причем активность по отношению к этому соединению увеличивается в присутствии мочевины. Так, при концентрации мочевины 1 г/кг почвы исходное содержание ТНТ (80 мг/кг) в течение 3 дней снижалось на 84%, тогда как в отсутствие мочевины – лишь на 39% [18]. Для эффективного удаления ТНТ ветивером оптимальна агрономически рекомендованная концентрация азота (125–300 мг мочевины/кг почвы). В этих условиях у растений наблюдалась повышенная активность нитроредуктазы, а основными метаболитами ТНТ, определяемыми в тканях растения, были моноаминодинитротолуолы и 1,3,5-тринитробензол [19].

Водное растение уруть колосистая (*Myriophyllum spicatum*) наряду с ветивером признано лучшим кандидатом для фиторемедиации загрязнений ТНТ водоемов. Среди изученных растений у *M. spicatum* и *C. zizanioides* отмечено максимальное поглощение ТНТ, равное 1,6 и 1,03 мг/г сырой массы растения, соответственно [20].

Издание Chemical & Engineering News в 2005 г. сообщило о способности водорослей активно поглощать ТНТ из воды. Красные тропические водоросли ассимилировали 100% ТНТ за 72 ч при его исходной концентрации 1 мг/л. Нитроредук-

таза восстанавливала одну нитрогруппу ТНТ до амина, около 20% аминодинитротолуола выделялось обратно в воду, а остальное метаболизировалось в клетках водорослей (<http://pubs.acs.org/cen/news/83/i09/8309notw7.html>).

Ризосферные микроорганизмы также играют существенную роль в процессах биоремедиации. Так, *Methylobacterium* sp., изолированная из ризосферы тополя, способна к деградации ТНТ и других взрывчатых веществ. Биоаугментация ризосферы кукурузы, выращенной на землях, загрязненных ТНТ, штаммом-биодеструктором ТНТ *Pseudomonas putida* JLR11 увеличила скорость биодеградации этого соединения [16]. Заселяющие ризосферу бактерии – деструкторы органических поллютантов могут значительно повысить эффективность фиторемедиации [17].

Заслуживает внимания изучение бактерий-эндофитов как перспективных объектов для интенсификации процесса фиторемедиации. Генетически модифицированные эндофиты сочетают способность к деградации поллютанта с положительным влиянием на рост растений, что позволяет снизить количество удобрений, необходимых для этого роста. Ожидается, что использование новейших достижений молекулярной биологии позволит повысить эффективность фиторемедиации загрязненных земель, основанной на взаимовыгодных отношениях между растениями и эндофитными бактериями [21].

Большие перспективы в биоремедиации земель, загрязненных ТНТ, имеет фиторемедиация трансгенными растениями, несущими гены различных ферментов, которые в том числе обеспечивают деградацию взрывчатых нитросоединений. Некоторые авторы сообщали об эффективном удалении и детоксикации ТНТ трансгенными растениями, конститутивно экспрессирующими ТНТ-деградирующие ферменты микроорганизмов. Примером таких микробных ферментов являются нитроредуктазы [22–24] или энзимы семейства так называемого старого желтого фермента [25, 26]. Например, трансгенный арабидопсис, содержащий гены нитроредуктазы *E. coli*, был способен поглощать в 7–8 раз больше ТНТ, чем растение дикого типа, и расти при содержании ТНТ в почве 250 мг/кг, тогда как рост немодифицированных растений ингибировался при 50 мг/кг [27]. Однако, по мнению некоторых авторов, большая эффективность фиторемедиации трансгенными растениями по сравнению с нетрансгенными растениями того же вида достоверно фиксируется только при высоких концентрациях ТНТ в почве [28].

Возможности фиторемедиации загрязненных ТНТ сред схематично представлены на рис. 2.

### Дегградация ТНТ иммобилизованными микроорганизмами

Многообещающей стратегией очистки водных сред от ТНТ является использование иммобилизованных микроорганизмов в реакторах периодического или непрерывного действия [6]. Известно, что иммобилизация клеток способствует их большей устойчивости к воздействию токсичных веществ и других неблагоприятных факторов внешней среды, стабилизирует ферментативную активность и делает возможным конструирование непрерывных процессов, в том числе для очистки сточных вод. Высокая продуктивность процессов, основанных на функционировании иммобилизованных микроорганизмов, связана как с повышенной плотностью клеток, так и с физиологическими изменениями, обусловленными процессом иммобилизации.

Была изучена дегградация ТНТ клетками штамма *Bacillus* sp. YRE1, иммобилизованными на угле и полистироле. Клетки бацилл, иммобилизованные на угле, при pH 7 разрушали до 93,81% ТНТ; оптимум дегградации при иммобилизации на полистироле наблюдался при pH 5. Биодегградация ТНТ клетками, иммобилизованными на обоих субстратах, была наиболее эффективна при 37 °C [29]. Клетки *Bacillus* sp. VT-8, иммобилизованные на поликапроамидном волокне, трансформировали ТНТ в концентрации 67 мг/л с максимальной скоростью, обеспечившей снижение концентрации данного токсиканта в 10 раз за 6 дней [30]. Клетки *Bacillus mycoides* были иммобилизованы в структуре геля, содержащего 10% поливинилового спирта, 0,3% альгината натрия и 2,5% каолина. ТНТ адсорбировался на гранулах, а затем подвергался биодегградации иммобилизованными в гранулах клетками. При этом наблюдали уменьшение количества ТНТ в сточных водах на 92,6% за 8 ч, а показателя ХПК стоков – с 1128,2 до 398,2 мг/л [31].

Для эффективной биодегградации ТНТ был использован комбинированный процесс с применением двух биофильтров – восходящего тока жидкости и погружного типа. Среди продуктов анаэробной дегградации преобладал 2,6-диамино-4-нитротолуол. Этанол являлся главным донором электронов при биодегградации ТНТ во время анаэробного процесса. Штаммы, выделенные с биофильтра, принадлежали к р. *Pseudomonas*, *Flavobacteriales*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium* и *Riemerella* [32].

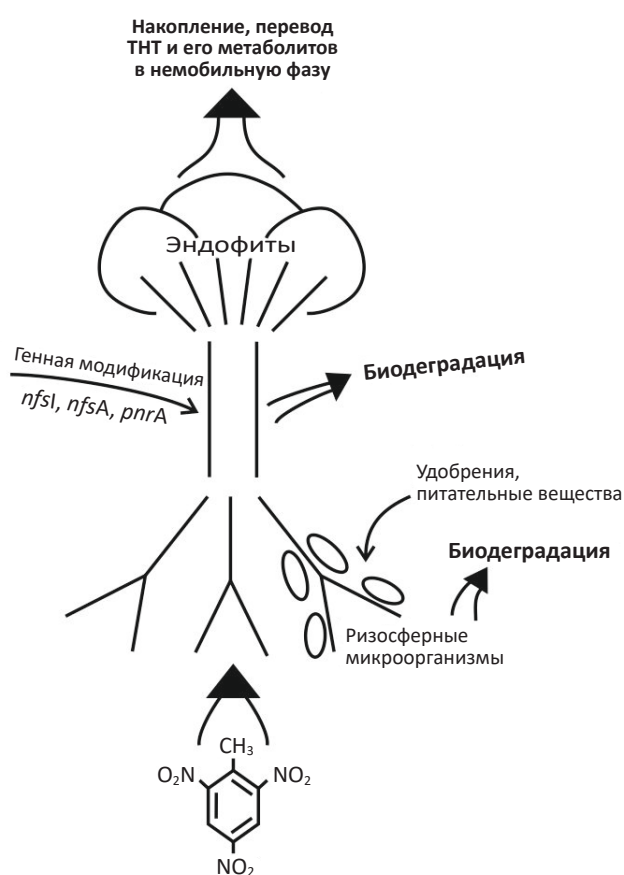


Рис. 2. Схема фиторемедиации почв, загрязненных ТНТ

Fig. 2. Scheme of phytoremediation of TNT-contaminated soil

Обработку вод, содержащих ТНТ, проводили с помощью анаэробно-аэробных фильтров. Основными продуктами анаэробной дегградации являлись 2-амино-4-мононитротолуол-5-SO<sub>3</sub> и 3-амино-2-мононитротолуол-5-SO<sub>3</sub>. В качестве экзогенного источника углерода для биодегградации ТНТ использовали этанол. Микроорганизмы, иммобилизованные на фильтрах, были идентифицированы как *Hydrogenophaga* sp., *Exiguobacterium* sp., *Azospirillum zae*, *Rhizobium* sp. и железовосстанавливающие бактерии [33].

### Превентивные подходы к минимизации загрязнений ТНТ

Инновационный подход к предотвращению загрязнения окружающей среды ТНТ заключается в том, чтобы вносить микроорганизмы, способные к дегградации этого соединения, непосредственно во взрывчатые вещества. Так, введение *Pseudomonas putida* GG04 и *Bacillus* SF в сухой взрывчатый материал не оказывало никакого воздействия на качество взрывчатой смеси и на скорость

детонации при хранении в течение пяти лет. В то же время, полная биотрансформация ТНТ с образованием гидроксиламинодинитротолуолов, 4-амино-2,6-динитротолуолов, 2-амино-2,6-динитротолуолов, различных азоксисоединений, 2,6-диаминонитротолуолов и 2,4-диаминонитротолуолов происходила в течение 5 дней после переноса взрывчатого материала в жидкую среду [34]. Разработка самоочищающихся взрывчатых составов открыла новые перспективы для применения микроорганизмов-деструкторов ТНТ. Как инокулят могут быть использованы споры бактерий *Clostridium* sp. и *Bacillus* sp. Также исследуются соответствующие возможности клеток бактерий *Pseudomonas* sp., лиофилизированных в присутствии криопротекторов. Грамотрицательные бактерии являются предпочтительными кандидатами для введения в состав взрывчатых материалов по сравнению с грамположительными, вследствие их большей устойчивости к ТНТ [6].

Предварительные результаты этой новой технологии создают предпосылки для интенсификации фундаментальных исследований, касающихся скрининга спорулирующих и засухоустойчивых ТНТ-деградирующих микроорганизмов, а также разработки методов лиофилизации неспорулирующих бактерий [8].

## МЕХАНИЗМЫ ДЕГРАДАЦИИ ТНТ МИКРООРГАНИЗМАМИ

### Ферменты деградации ТНТ

Основным классом ферментов, вовлеченных в конверсию ТНТ, являются нитроредуктазы типа I (нечувствительные к кислороду). Это ферменты, восстанавливающие различные нитроароматические соединения, такие как нитрофураны, нитроарены, нитрофенолы, нитробензолы, а также взрывчатые вещества, включая ТНТ, гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин и тринитроглицерин. Нитроредуктазы, ответственные за аэробную и анаэробную деградацию ТНТ, содержат флавиномононуклеотид в качестве кофактора и катализируют NAD(P)H-зависимое восстановление нитрогрупп ароматического кольца до нитрозо-, гидроксиламино- и аминогрупп [35–37].

Другой значительной группой негомологичных нитроредуктазам ферментов, которые осуществляют восстановление нитрогруппы до аминогруппы, являются члены семейства старого желтого фермента (old yellow enzyme), названного так по первому открытому энзиму, который содержал связанный флавин [37]. Некоторые фер-

менты семейства флавопротеинов, как, например, пентаэритрит-тетранитратредуктаза из *Enterobacter cloacae* PB2 и редуктаза XenB из *Pseudomonas fluorescens* I-C, не только действуют как нитроредуктазы, но могут также трансформировать ТНТ посредством внедрения гидрида в ароматическое кольцо, формируя моногидридные и дигидридные комплексы Мейзенгеймера [38]. Физиологическая роль ферментов этого семейства все еще неясна; возможно, они являются частью системы общего ответа, индуцируемой окислительным стрессом, и поддерживают внутриклеточный редокс-потенциал путем переноса электронов с пиримидиновых нуклеотидов на оксиданты [37].

Так как ТНТ легко восстанавливается в природной среде с образованием изомерной смеси 2-амино-4,6-динитротолуола и 4-амино-2,6-динитротолуола, ряд исследований сфокусирован на изучении возможного окислительного преобразования этих изомеров. Существенная роль в этом процессе принадлежит оксигеназам, хотя их активность, по-видимому, довольно мала (менее 0,5 нмоль продукта/(мин · мг белка)). Рекомбинантная *E. coli*, экспрессирующая 2,4-динитротолуолдиоксигеназу из *Burkholderia* sp., способна окислять 2-амино-4,6-динитротолуол в 3-й и 4-й позициях с выделением нитрита и формированием 3-амино-4-метил-5-нитрокатахола, а также гидроксिलировать метильную группу с образованием 2-амино-4,6-динитробензилового спирта. Рекомбинантная нитробензолдиоксигеназа из *Comamonas* sp. JS765 может окислять 4-амино-2,6-динитротолуол во 2-й и 3-й позициях с выделением нитрита и образованием 3-амино-6-метил-5-нитрокатахола [37]. Объединение терминальных оксигеназ – 2,4-динитротолуолдиоксигеназы и нитробензолдиоксигеназы – приводило к одновременному окислению соответствующих производных ТНТ с образованием катехолов и бензилового спирта [39].

Гидрогеназа *Clostridium acetobutylicum*, которую обычно ассоциируют с выделением водорода, катализировала H<sub>2</sub>-зависимое восстановление ТНТ до 2-гидроксиламино-4,6-динитротолуола и 4-гидроксиламино-2,6-динитротолуола с последующим восстановлением этих соединений до 2,4-дигидроксиламино-6-нитротолуола во время ацидогенной фазы роста клостридий [37].

Грибная микрофлора также способна к минерализации ТНТ за счет активности внеклеточных неспецифических пероксидаз. Восстановление ТНТ до гидроксиламинодинитротолуолов и аминодинитротолуолов грибами может

осуществляться и с помощью нитроредуктаз, связанных с мицелием, а дальнейшая минерализация этих продуктов достигается благодаря активности ферментов, осуществляющих окисление, главным образом лигниндеградирующих ферментов [40]. Окислительная атака лигнинразрушающих внеклеточных ферментов (лакказ, лигнин- и марганец-пероксидаз) на это соединение происходит с образованием высоко реакционноспособных интермедиатов, таких как электрофильные плутатионил- и пероксил-радикалы, нуклеофильные супероксид- и формил-радикалы. Следует сказать, что минерализация ТНТ грибами испытывает конкуренцию со стороны других почвенных микроорганизмов и рост грибов подавляется высокими концентрациями ТНТ. Также деструкцию поллютанта ингибируют быстрое взаимодействие его восстановленных производных с компонентами почвы, превращающее их в немобильные производные, и активное гашение свободных радикалов [8].

### Аэробная деструкция ТНТ

Окислительный метаболизм нитрогрупп у веществ ароматического ряда присущ только моно- и динитроароматическим соединениям; ТНТ даже в присутствии кислорода трансформируется исключительно путем восстановления. В большинстве случаев аэробные бактерии конвертируют

молекулу ТНТ в гидроксиламино- или аминогруппу(ы), восстанавливая одну или две нитрогруппы. При этом образуются различные изомеры аминонитроароматических веществ, которые обычно накапливаются в культуральной среде и в дальнейшем не метаболизируются. Частично восстановленные формы ТНТ могут реагировать друг с другом в присутствии кислорода, образуя устойчивые азокситетранитротолуолы, которые обладают большей мутагенностью, чем ТНТ [41]. Аэробное восстановление может идти тремя путями: 1) оксигенация кольца, которая ведет к аккумуляции нитрит-ионов; 2) нуклеофильная атака путем присоединения гидрид-иона с формированием комплекса Мейзенгеймера, что ведет к восстановлению ароматического кольца до динитропроизводного; 3) частичное восстановление нитрогрупп до производных гидроксиламина [2, 12].

Некоторые микроорганизмы, в частности, *Acinetobacter* sp. VT11 [42], *Bacillus* sp. VT-8 [30], *Achromobacter* sp. BC09 [7] способны использовать ТНТ в качестве единственного источника углерода и азота для роста; *Achromobacter spanius* STE 11 [43], *Pseudomonas* sp. НК-6 [44] и *Citrobacter* sp. YC4 [7] – в качестве единственного источника азота.

Примеры аэробной деградации ТНТ микроорганизмами суммированы в табл. 2.

Таблица 2

### Предполагаемые и установленные механизмы деградации ТНТ микроорганизмами в аэробных условиях Presumed and established mechanisms of TNT microbial degradation under aerobic conditions

Микроорганизм	Метаболический путь	Источник
<i>Achromobacter spanius</i> STE 11	Трансформация ТНТ до 2,4-динитротолуола, 2,6-динитротолуола, 4-аминодинитротолуола и 2-аминодинитротолуола	[43]
<i>Achromobacter</i> sp. BC09	Образование 4-амино-2,6-динитротолуола и 2-амино-4,6-динитротолуола. Может использовать ТНТ как единственный источник углерода и азота	[7]
<i>Citrobacter</i> sp. YC4	Образование 4-амино-2,6-динитротолуола и 2-амино-4,6-динитротолуола Может использовать ТНТ как единственный источник азота	
<i>Acinetobacter</i> sp. VT11	ТНТ – единственный субстрат для роста, накопление промежуточных продуктов не обнаружено	[42]
<i>Pseudomonas</i> sp. VT-7W	Интермедиаты биodeградации – 3,5-динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты и 2,6-динитро-4-аминотолуол	
<i>Rhodococcus opacus</i> 1G; <i>Rhodococcus</i> sp. VT-7	Интермедиат – 4-метил-3,5-динитроформамид	
<i>A. junii</i> A8	ТНТ трансформируется до 2,6-динитро-4-нитрозотолуола, 4-амино-2,6-динитротолуола, 4-амино-2,6-динитробензойной кислоты	[52]
<i>Bacillus cereus</i>	Образование 2,4-динитротолуола и 4-аминодинитротолуола	[35]



Микроорганизм	Метаболический путь	Источник
<i>B. mycoides</i>	Образование 4-амино-2,6-динитротолуола и 6-амино-2,4-динитротолуола	[53]
<i>Bacillus</i> sp. VT-8	Использование ТНТ как единственный источник углерода и азота	[30]
<i>Bacillus</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. HL 4-NT-1 <i>M. vaccae</i> JOB-5 <i>Raoultella terrigena</i> HB <i>Staphylococcus</i> sp.	Выделение нитрита с образованием толуола или последовательное восстановление с образованием триаминотолуола Формирование гидридных комплексов Мейзенгеймера Образование 4-амино-2,6-динитробензойной кислоты и 2,4-диамино-6-нитробензил метилового эфира, или азоксисоединений, или расщепление кольца Образование аминопроизводных и азоксидимеров Выделение нитрита с образованием толуола в конце метаболического пути или последовательное восстановление с формированием триаминотолуола	[54]
Basidiomycetes <i>Enterobacter cloacae</i> PB2 <i>Nematoloma forwardii</i> <i>Nocardiodes</i> CB22-2 <i>Phlebia radiata</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Полная деградация ТНТ через конверсию аминонитротолуола с участием марганец-зависимой пероксидазы грибов Восстановление до комплекса Мейзенгеймера с гидридом, выделение нитрита Полная минерализация через конверсию 2-амино-4,6-динитротолуола марганец-зависимой пероксидазой Денитрификация, приводящая к образованию комплексов Мейзенгеймера Восстановление и минерализация ТНТ марганец-зависимой пероксидазой Формирование комплексов Мейзенгеймера Частичное восстановление ТНТ до аминодинитротолуола Гидрогенизация кольца с формированием ТНТ-гидридных и дигидридных комплексов Мейзенгеймера	[12]
<i>Candida</i> sp. AN-L13 <i>Saccharomyces</i> sp. ZS <i>Candida</i> sp. AN-L14	Образование гидридного комплекса Мейзенгеймера Образование моногидроксиламинодинитротолуолов Образование смеси вышеупомянутых продуктов	[55]
<i>Citrobacter youngae</i> E4	Образование 4-нитротолуола, 2-амино-4,6-динитротолуола, 4-амино-2,6-динитротолуола	[50]
<i>Geotrichum candidum</i> AN-Z4	Образование нестабильных промежуточных гидридных комплексов Мейзенгеймера с последующей их деструкцией и накоплением ионов нитрита и нитрата	[56]
<i>Phanerochaete velutina</i>	Образование 4-амино-2,6-диаминотолуола и 2-амино-4,6-диаминотолуола (менее 1% от общей концентрации ТНТ)	[57]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Образование 2,4-динитротолуола и 4-аминодинитротолуола	[2]
<i>P. putida</i> GG04 <i>Bacillus</i> SF	Образование гидроксилламинодинитротолуолов, 4-амино-2,6-динитротолуолов, 2-амино-4,6-динитротолуолов, различных азоксисоединений, 2,6-диаминонитротолуолов и 2,4-диаминонитротолуолов	[34]
<i>Yarrowia lipolytica</i> AN-L15	Образование 8 разных гидридных комплексов и выделение нитрита	[58]
Консорциум AM 06, включающий бактерии р. <i>Klebsiella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Achromobacter</i> and <i>Pseudomonas</i>	Образование 4-амино-2,6-динитротолуола, 2-амино-4,6-динитротолуола и 4-нитротолуола	[5]

### Анаэробная деструкция ТНТ

Особое внимание исследователей привлекает анаэробная трансформация нитроароматических веществ. Восстановление нитрогрупп до нитрозопроизводных, гидросиламинов или аминов путем последовательного добавления пар электронов, донорами которых являются косубстраты, катализируется нитроредуктазами. Деградация большинства полинитроароматических соединений возможна только в анаэробных условиях [12].

Первым этапом анаэробного восстановления ТНТ является образование 4-амино-2,6-динитротолуола и 2-амино-4,6-динитротолуола, которые в дальнейшем могут восстанавливаться до 2,4-диамино-6-нитротолуола. Затем в среде появляется нитробензойная кислота, за которой следуют циклогексанол, 2-метилпентановая кислота, бутират и уксусная кислота [45].

Интермедиаты разложения ТНТ, в частности, 2,4-динитротолуол, могут подвергаться анаэробной деградации. Так, штамм *Shewanella marisflavi* EP1 трансформирует это соединение в 2,4-диаминотолуол через промежуточные соединения

2-амино-4-нитротолуол и 4-амино-2-нитротолуол при pH 7–9 в широком диапазоне температур и при содержании NaCl в среде 2–8%. J. Huang с соавт. предполагают, что в процесс транспорта электронов при восстановлении 2,4-динитротолуола вовлечены дегидрогеназа, менахинон, цитохромы и флавины [46].

Штамм *Pseudomonas* sp. JLR11 может использовать ТНТ как единственный источник азота. У растущих в присутствии ТНТ клеток наблюдалась ТНТ-зависимая транслокация протонов, связанная с восстановлением этого соединения до аминонитротолуолов. Синтез АТФ в мембранной фракции может быть сопряжен с окислением молекулярного водорода и восстановлением ТНТ [45]. Штаммы сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* sp., таких как *D. vulgaris*, *D. gigas*, *D. desulfuricans*, а также *Desulfibacterium indolicum* способны, как и псевдомонады, использовать ТНТ в качестве источника азота [47].

Примеры анаэробной деградации ТНТ микроорганизмами суммированы в табл. 3. Обобщенная схема метаболизма ТНТ у микроорганизмов представлена на рис. 3.

Таблица 3

### Анаэробная трансформация ТНТ микроорганизмами

#### Anaerobic TNT transformation by microorganisms

Микроорганизм	Метаболический путь	Источник
<i>Bacillus mycoides</i> (аэробные бактерии в анаэробных условиях)	Образование 4-амино-2,6-динитротолуола и 6-амино-2,4-динитротолуола	[53]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Частичное восстановление (посредством перегруппировки Бамбергера) до интермедиатов гидросиламина; клеточный экстракт продуцирует диаминотолуолы	[12]
<i>Desulfovibrio</i> sp.	ТНТ используется как источник азота, 100%-ная биотрансформация посредством удаления аминогрупп из кольца (восстановительное дезаминирование)	
<i>Klebsiella</i> sp.C1	Восстановление до гидросиламинодинитротолуолов, аминодинитротолуолов и до нитрита через денитрификацию	
<i>Methylobacterium</i> sp. BJ001 Консорциум сульфатредукторов и метаногенов	Восстановление до аминодинитротолуолов ТНТ используется как источника азота	
<i>C. bifermentans</i> CYS-1	Дегградация ТНТ до алифатических полярных соединений через 4-аминодинитротолуол и 2,4-диаминонитротолуол	[59]
<i>C. paterianum</i> , <i>C. sardelii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus</i> sp. и <i>Veillonella alkalescens</i>	Восстановление ТНТ до триаминотолуола	
<i>Methanococcus</i> sp.	Восстановление ТНТ до диаминонитротолуола	
<i>Pseudomonas</i> sp. JLR 11 (аэробные бактерии в анаэробных условиях)	Минерализация путем формирования 2,4,6-тринитробензальдегида, 2-нитро-4-гидроксибензойной кислоты, 4-гидроксибензальдегида, 4-гидроксибензойной кислоты	[54]
Микробиота бычьего рубца	Восстановление до 2-гидросиламино-4,6-динитротолуола	[60]

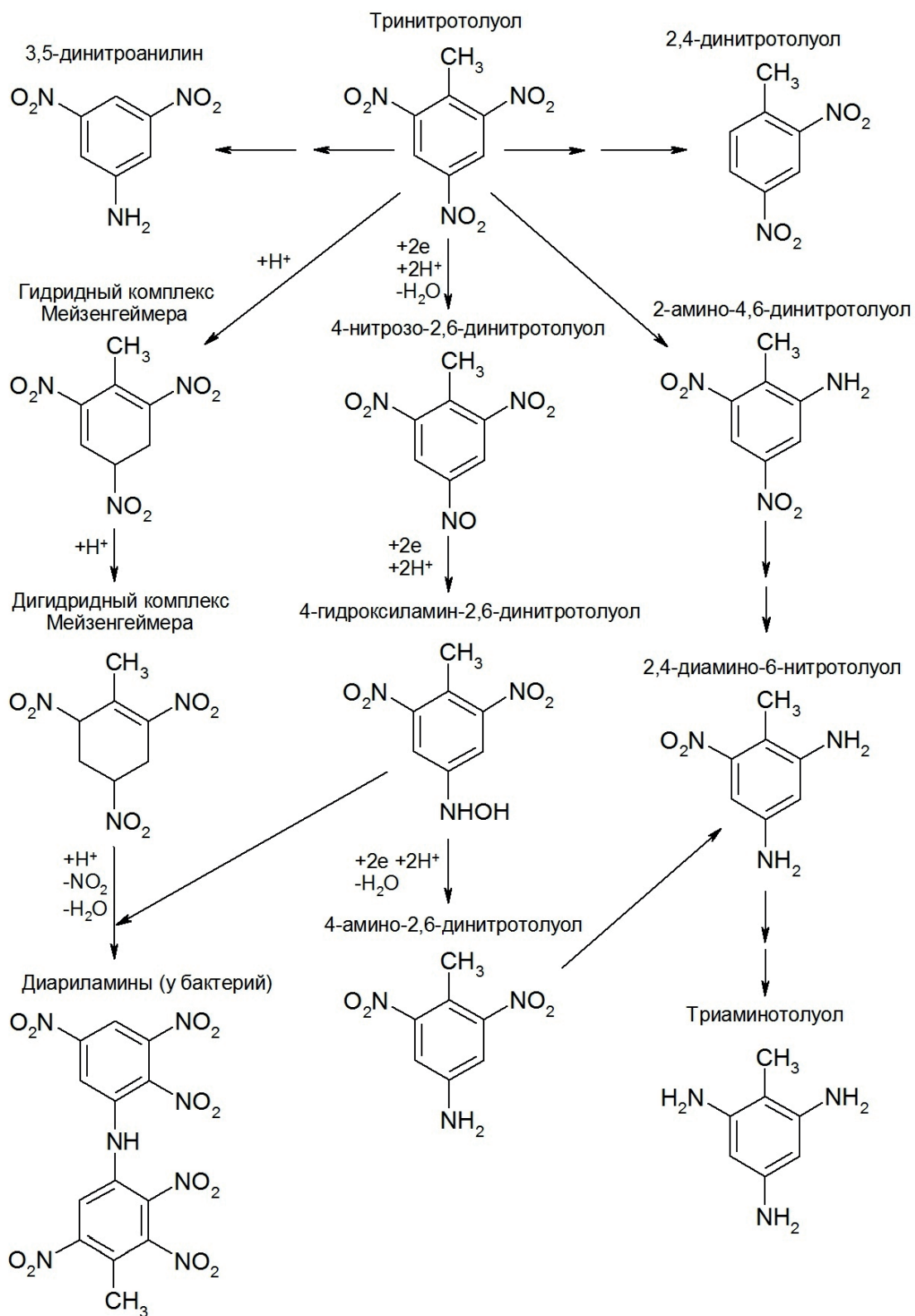


Рис. 3. Суммарная схема метаболизма 2,4,6-ТНТ у микроорганизмов [38, 41]

Fig. 3. General scheme of 2,4,6-TNT metabolism in microorganisms [38, 41]

Распространенность некультивируемых бактерий, разрушающих ТНТ, изучают путем внесения  $^{15}\text{N}$ - и  $^{13}\text{C}$ -меченного контаминанта в загрязненные природные среды, инкубации и экстракции ДНК из биологических образцов с последующей идентификацией культур, утилизирующих ТНТ как источник углерода и азота, методом анализа гена 16S рРНК [9]. Тем не менее, для процессов биоремедиации более интересны культивируемые микроорганизмы, биомасса которых может использоваться для биоаугментации.

Перспективными для изучения распространения генов, кодирующих ферменты деструкции нитроароматических соединений, представляются также метагеномные исследования. Метагеномный анализ почв, загрязненных ароматическими углеводородами, было предложено производить путем сочетания фенотипического скрининга, известного как субстрат-индуцированная генная экспрессия (SIGEX), и полнометагеномного секвенирования. Метод SIGEX основан на транскрипционной активации репортерного гена зеленого флуоресцентного белка в ответ на индуцирующее вещество и последующей флуоресценции клеток, используемой для выделения отдельных индуцибельных клонов из метагеномной библиотеки ДНК. Исследования проводили на образцах почв, загрязненных взрывчатыми веществами, а в качестве индуктора для SIGEX использовали паракват [48].

Сочетание фундаментальных подходов к изучению ТНТ-деградирующих микроорганизмов и разработка способов биологической очистки загрязненных вод и почв позволит более интенсивно восстанавливать природные среды и предотвращать их дальнейшее загрязнение этим устойчивым токсикантом (рис. 4).

Таким образом, можно выделить несколько перспективных подходов к биодеградации ТНТ в окружающей среде. Во-первых, это биоаугментация и конструирование консорциумов микроорганизмов для минерализации ТНТ. Во-вторых, стимулирование автохтонной анаэробной микрофлоры загрязненных природных сред внесением косубстратов и доноров электронов. В-третьих, применение подходов фиторемедиации. В-четвертых, использование иммобилизованных микроорганизмов с биодеградационной активностью по отношению к этому веществу и конструирование на их основе биофильтров и реакторов для очистки водных сред. В-пятых, применение превентивных мер, таких как внесение спор или лиофилизатов микроорганизмов-деструкторов непосредственно в ТНТ-содержащие продукты.



**Рис. 4.** Фундаментальные подходы к проблеме биоремедиации сред, загрязненных ТНТ

**Fig. 4.** Basic approaches to bioremediation of TNT-polluted environment

Биодеградация ТНТ различными бактериями в природной среде происходит двумя основными путями: 1) восстановлением нитрогрупп ТНТ до гидроксиламино- и(или) аминогрупп и 2) восстановлением ароматического кольца ТНТ до комплексов Мейзенгеймера с выделением нитрита. Ряд бактериальных штаммов способен использовать ТНТ как единственный источник азота; известны также единичные случаи использования ТНТ как единственного источника азота и углерода, что приводит к утилизации этого субстрата без выделения токсичных промежуточных продуктов.

Нитроредуктазы широко распространены в микробном мире, а метаболиты нитроредуктазного пути деградации ТНТ являются канцерогенами и мутагенами. Полная минерализация ТНТ остается пока труднодостижимой целью; проблема может быть решена путем создания микробных консорциумов и селекции соответствующих микроорганизмов, а также привлечения методов метагеномного анализа и белковой инженерии. Тем не менее, полномасштабный биотехнологический подход, основанный на стимуляции



нитроредуктаз и фиторемедиации, показал, что ТНТ может эффективно удаляться из окружающей среды путем перевода токсичных интермедиатов в немобильную фазу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 16-44-590359.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ju K.-S., Parales R.E. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010, 74(2), 250–272. doi: 10.1128/MMBR.00006-10
- Mercimek H.A., Dincer S., Guzeldag G., et al. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *P. aeruginosa* and characterization of some metabolites. *Braz. J. Microbiol.*, 2015, 46 (1), 103–111. doi: 10.1590/S1517-838246120140026
- Kalderis D., Hawthorne S.B., Clifford A.A., Gidarakos E. Interaction of soil, water and TNT during degradation of TNT on contaminated soil using subcritical water. *J. Hazard. Mater.*, 2008, 159, 329–334. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.02.041
- Fu D., Zhang Y., Lv F., et al. Removal of organic materials from TNT red water by Bamboo Charcoal adsorption. *Chem. Eng. J.*, 2012, 193-194, 39–49. doi: 10.1016/j.cej.2012.03.039
- Muter O., Potapova K., Limane B., et al. The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. *J. Environ. Manage.*, 2012, 98, 51–55. doi: 10.1016/j.jenvman.2011.12.010
- Claus H. Microbial degradation of 2,4,6-trinitrotoluene in vitro and in natural environments. In book: Biological Remediation of Explosive Residues, Environmental Science and Engineering. Ed. by S.N. Singh. Switzerland: Springer International Publishing, 2014, 15–38. doi: 10.1007/978-3-319-01083-0\_2
- Kao C.-M., Lin B.-H., Chen S.-C., et al. Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. *Bioremed. J.*, 2016, 20(3), 165–173. doi: 10.1080/10889868.2016.1148007
- Stenuit B.A., Agathos S.N. Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 88, 1043–1064. doi: 10.1007/s00253-010-2830-x
- Gallagher E.M., Young L.Y., McGuinness L.M., Kerkhof L.J. Detection of 2,4,6-trinitrotoluene-utilizing anaerobic bacteria by <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(5), 1695–1698. doi: 10.1128/AEM.02274-09
- Montgomery M.T., Coffin R.B., Boyd T.J., et al. 2,4,6-Trinitrotoluene mineralization and bacterial production rates of natural microbial assemblages from coastal sediments. *Environ. Pollut.*, 2011, 159, 3673–3680. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.018
- Erkelens M., Adetutu E.M., Taha M., et al. Sustainable remediation – The application of bioremediated soil for use in the degradation of TNT chips. *J. Environ. Manage.*, 2012, 110, 69–76. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.022
- Kulkarni M., Chaudhari A. Microbial remediation of nitroaromatic compounds: An overview. *J. Environ. Manage.*, 2007, 85, 496–512. doi: 10.1016/j.jenvman.2007.06.009
- Innemanová P., Velebová R., Filipová A., et al. Anaerobic in situ biodegradation of TNT using whey as an electron donor: a case study. *New Biotechnol.*, 2015, 32(6), 701–709. doi: 10.1016/j.nbt.2015.03.014
- Adrian N.R., Arnett C.M. Anaerobic biotransformation of explosives in aquifer slurries amended with ethanol and propylene glycol. *Chemosphere*, 2007, 66, 1849–1856. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.08.042
- Sheu Y.T., Lien P.J., Chen C.C., et al. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated groundwater using unique bacterial strains: microcosm and mechanism studies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2016, 13, 1357–1366. doi: 10.1007/s13762-016-0976-5
- Chatterjee S., Deb U., Datta S., et al. Common explosives (TNT, RDX, HMX) and their fate in the environment: Emphasizing bioremediation. *Chemosphere*, 2017, 184, 438–451. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.008
- Glick B.R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotech. Adv.*, 2010, 28, 367–374. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
- Das P., Datta R., Makris K.C., Sarkar D. Vetiver grass is capable of removing TNT from soil in the presence of urea. *Environ. Pollut.*, 2010, 158, 1980–1983. doi: 10.1016/j.envpol.2009.12.011
- Das P., Sarkar D., Makris K.C., Datta R. Urea-facilitated uptake and nitroreductase-mediated transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in soil using vetiver grass. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2015, 3(1), 445–452. doi: 10.1016/j.jece.2015.01.008
- Kiiskila J.D., Das P., Sarkar D., Datta R. Phytoremediation of explosive-contaminated soils. *Curr. Pollution Rep.*, 2015, 1, 23–34. doi: 10.1007/s40726-015-0003-3
- Afzal M., Khan Q.M., Sessitsch A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 2014, 117, 232–242. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.078
- Hannink N.K., Subramanian M., Rosser S.J., et al. Enhanced transformation of TNT by tobacco plants expressing a bacterial nitroreductase. *Int J Phytorem*, 2007, 9, 385–401. doi: 10.1080/15226510701603916
- Kurumata M., Takahashi M., Sakamoto A., et al. Tolerance to, and uptake and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) are enhanced by the expression of a bacterial nitroreductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Z. Naturforsch. C*, 2005, 60(3-4), 272–278. doi: 10.1515/znc-2005-3-412

24. van Dillewijn P., Couselo J.L., Corredoira E., et al. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene by bacterial nitroreductase expressing transgenic aspen. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42(19), 7405–7410. doi: 10.1021/es801231w
25. French C.E., Rosser S.J., Davies G.J., et al. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing penterythritol tetranitrate reductase. *Nat. Biotechnol.*, 1999, 17, 491–494. doi: 10.1038/8673
26. Zhu B., Peng R.H., Fu X.Y., et al. Enhanced transformation of TNT by *Arabidopsis* plants expressing an old yellow enzyme. *PlosOne*, 2012, 7(7), e39861. doi: 10.1371/journal.pone.0039861
27. Panz K., Miksch K. Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. *J. Environ. Manage.*, 2012, 113, 85–92. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.08.016
28. Makris K.C., Sarkar D., Datta R. Coupling indigenous biostimulation and phytoremediation for the restoration of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated sites. *J. Environ. Monit.*, 2010, 12, 399–403. doi: 10.1039/b908162c
29. Ullah H., Shah A.A., Hasan F., Hameed A. Biodegradation of trinitrotoluene by immobilized *Bacillus* sp. YRE1. *Pak. J. Bot.*, 2010, 42(5), 3357–3367.
30. Solyanikova I.P., Robota I.V., Mazur D.M., et al. Application of *Bacillus* sp. strain VT-8 for decontamination of TNT polluted sites. *Microbiology*, 2014, 83(5), 577–584. doi: 10.1134/S0026261714050257
31. Lin H., Chen Z., Megharaj M., Naidu R. Biodegradation of TNT using *Bacillus mycoides* immobilized in PVA–sodium alginate–kaolin. *Appl. Clay Sci.*, 2013, 83–84, 336–342. doi: 10.1016/j.clay.2013.08.004
32. Wang Z., Ye Z., Zhang M., Bai X. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized microorganism-biological filter. *Process Biochem.*, 2010, 45, 993–1001. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.006
33. Zhang M., Liu G.-h., Song K., et al. Biological treatment of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) red water by immobilized anaerobic–aerobic microbial filters. *Chem. Eng. J.*, 2015, 259, 876–884. doi: 10.1016/j.cej.2014.08.041
34. Nyanhongo G.S., Aichernig N., Ortner M., et al. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *J. Hazard. Mater.*, 2009, 165, 285–290. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.107
35. Mercimek H.A., Dincer S., Guzeldag G., et al. Aerobic biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* isolated from contaminated soil. *Microb. Ecol.*, 2013, 66, 512–521. doi: 10.1007/s00248-013-0248-6
36. Bai J., Yang J., Liu P., Yang Q. Transformation pathway of 2,4,6-trinitrotoluene by *Escherichia coli* nitroreductases and improvement of activity using structure-based mutagenesis. *Process Biochem.*, 2015, 50, 705–711. doi: 10.1016/j.procbio.2015.01.029
37. Smets B.F., Yin H., Esteve-Núñez A. TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 76, 267–277. doi: 10.1007/s00253-007-1008-7
38. Rylott E.L., Lorenz A., Bruce N.C. Biodegradation and biotransformation of explosives. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22, 434–440. doi: 10.1016/j.copbio.2010.10.014
39. Keenan B.G., Wood T.K. Orthric Rieske dioxygenases for degrading mixtures of 2,4-dinitrotoluene/naphthalene and 2-amino-4,6-dinitrotoluene/4-amino-2,6-dinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 73, 827–838. doi: 10.1007/s00253-006-0538-8
40. Nyanhongo G.S., Schroeder M., Steiner W., Gübitz G.M. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. *Biocatal. Biotransform.*, 2005, 23(2), 53–69. doi: 10.1080/10242420500090169
41. Esteve-Núñez A., Caballero A., Ramos J.L. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2001, 65(3), 335–352. doi: 10.1128/MMBR.65.3.335–352.2001
42. Соляникова И.П., Баскунов Б.П., Бабошин М.А., и др. Детоксикация бактериями тринитротолуола в высоких концентрациях. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2012, 48(1), 27–41.
43. Gumuscu B., Tekinay T. Effective biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene using a novel bacterial strain isolated from TNT-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2013, 85, 35–41. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.06.007
44. Lee B.-U., Park S.-C., Cho Y.-S., et al. Expression and characterization of the TNT nitroreductase of *Pseudomonas* sp. HK-6 in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 2008, 56, 386–390. doi: 10.1007/s00284-007-9093-5
45. Hong Y., Gu J.-D. Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2009, 63, 973–980. doi: 10.1016/j.ibiod.2009.08.001
46. Huang J., Ning G., Li F., Sheng G.D. Biotransformation of 2,4-dinitrotoluene by obligate marine *Shewanella marisflavi* EP1 under anaerobic conditions. *Bioresour. Technol.*, 2015, 180, 200–206. doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.108
47. Bhattacharya J., Dev S., Das B. Chapter 2: Nutrients for the selective growth of specific bacteria. In book: *Low Cost Wastewater Bioremediation Technology*. Elsevier, 2018, 43–75.
48. Meier M.J., Paterson E.S., Lambert I.B. Use of substrate-induced gene expression in metagenomic analysis of an aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82(3), 897–909. doi: 10.1128/AEM.03306-15
49. Park C., Kim T.-H., Kim S., et al. Enhanced biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) with various supplemental energy sources. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 12(4), 695–698.

50. Liang S.-H., Hsu D.-W., Lin C.-Y., et al. Enhancement of microbial 2,4,6-trinitrotoluene transformation with increased toxicity by exogenous nutrient amendment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2017, 138, 39–46. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.12.012.
51. Khilyas I.V., Ziganshin A.M., Pannier A.J., Gerlach R. Effect of ferrihydrite on 2,4,6-trinitrotoluene biotransformation by an aerobic yeast. *Biodegr.*, 2013, 24(5), 631–644. doi: 10.1007/s10532-012-9611-4
52. Soojhawon I., Lokhande P.D., Kodam K.M., Gawai K.R. Biotransformation of nitroaromatics and their effects on mixed function oxidase system. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37(5), 527–533. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.011
53. Lin H.-y., Yu C.-P., Chen Z.-l. Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*. *Ecol. Eng.*, 2013, 52, 270–277. doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.11.004
54. Bernstein A., Ronen Z. Biodegradation of the explosives TNT, RDX and HMX in microbial degradation of xenobiotics. In book: Environmental Science and Engineering. Ed. S.N. Singh. Berlin: Springer, 2012, 135–176.
55. Zaripov S.A., Naumov A.V., Abdrakhmanova J.F., et al. Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 217, 213–217. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11477.x
56. Зиганшин А.М., Герлах Р., Науменко Е.А., Наумова Р.П. Аэробная деградация 2,4,6-тринитротолуола штаммом дрожжей *Geotrichum candidum* AN-Z4. *Микробиология*, 2010, 79(2), 199–205.
57. Anasonye F., Winqvist E., Räsänen M., et al. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2015, 105, 7–12. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.08.003
58. Ziganshin A.M., Naumova R.P., Pannier A.J., Gerlach R. Influence of pH on 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere*, 2010, 79, 426–433. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.01.051
59. Gallagher E.M. Anaerobic degradation of 2,4,6- trinitrotoluene (TNT): Molecular analysis of active degraders and metabolic pathways. Diss. ... PhD. New Brunswick, New Jersey, 2010.
60. Fleischmann T.J., Walker K.C., Spain J.C., et al. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT by bovine ruminal microbes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 314, 957–963. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.193

## Biotechnological Approaches to Bioremediation of Trinitrotoluene-Contaminated Environment

Yu.G. MAKSIMOVA<sup>1,2,\*</sup>, A.Yu. MAKSIMOV<sup>1,2</sup>, and V.A. DEMAКOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Perm Federal Research Center, Russ. Acad. Sci., Ural Branch, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, 614000, Perm Russia

<sup>2</sup>The Perm State National Research University, 614990, Perm Russia

e-mail: yul\_max@mail.ru\*

Received December 11, 2017

Accepted January 23, 2018

**Abstract**—The review considers strategies for biodegradation of a dangerous pollutant of the environment, explosive 2,4,6-trinitrotoluene. The features of the metabolism of this compound in microorganisms under aerobic and anaerobic conditions and the main enzymes involved in the transformation are described. The key classes of enzymes involved in the conversion of trinitrotoluene are nitroreductases, and enzymes of the family of flavoproteins (oxidase, hydrogenase, and peroxidase) can also participate in the degradation. Several approaches to the biodegradation of trinitrotoluene have been singled out and discussed: bioaugmentation of the biomass of TNT strain destructors and consortia of microorganisms that biodegrade this compound; stimulation of autochthonous microflora of polluted environment by introducing additional substrates for the growth of microorganisms and electron donors for the reduction of the trinitrotoluene molecule; biodegradation of this pollutant by immobilized microbial cells in bioreactors and biofilters; phytoremediation and the application of preventive measures, consisting of the introduction of spores and freeze-dried bacteria with the biodegrading activity in a mixture containing nitroaromatic compounds.

**Key words:** trinitrotoluene, microorganisms, biodegradation, nitroreductases, bioaugmentation, stimulation of autochthonous microflora, immobilized cells, phytoremediation.

**Acknowledgements**—The reported study was funded by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) and Perm Region according to the Research Project 16-44-590359.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-9-23