

УДК 57.088.3; 57.037; 57.042.2

ДЕТОКСИКАЦИЯ БАКТЕРИЯМИ ТРИНИТРОТОЛУОЛА В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

© 2012 г. И. П. Соляникова*, Б. П. Баскунов*, М. А. Бабошин*, А. И. Саралов**,
Л. А. Головлёва*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино Московской обл. 142290
e-mail: Golovleva@IBPM.Pushchino.ru

**Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

Поступила в редакцию 7.06.2011 г.

Показана способность штаммов-деструкторов различных ароматических соединений утилизировать тринитротолуол (ТНТ) в концентрации до 70 мг/л. Увеличение концентрации ТНТ от 100 до 150 мг/л не ингибировало скорость конверсии этого соединения штаммом *Kocuria palustris* RS32. Штамм *Acinetobacter* sp. VT11 использовал ТНТ в качестве единственного субстрата для роста. Среди интермедиатов дегградации ТНТ активными штаммами *Pseudomonas* sp. VT-7W и *Kocuria rosea* RS51 идентифицированы 3,5-динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты и 2,6-динитро-4-аминотолуол. При деструкции ТНТ штаммами бактерий *Rhodococcus opacus* 1G и *Rhodococcus* sp. VT-7 впервые обнаружен 4-метил-3,5-динитроформамид. Активные бактериальные штаммы при интродукции в почву осуществляли разложение ТНТ на 82–90%.

Тринитротолуол (ТНТ) является одним из наиболее распространенных нитроароматических ксенобиотиков, так как масштабы его производства и использования были таковы, что до настоящего времени наблюдается высокий уровень загрязнения почвы и воды этим соединением [1]. Из-за симметричного расположения трех нитрогрупп в ароматическом кольце ТНТ более устойчив к микробному разложению, чем моно- и динитротолуол. Известны штаммы бактерий и грибов, разлагающих или трансформирующих ТНТ в анаэробных или аэробных условиях. Благодаря химической структуре ТНТ даже в аэробных условиях трансформируется по восстановительному механизму [2]. В подавляющем большинстве случаев, аэробный метаболизм ТНТ бактериями включает на первых этапах восстановление одной или двух нитрогрупп с образованием различных изомеров amino-нитропроизводных ТНТ. Эти соединения накапливаются в культуральной среде без дальнейших превращений [1]. По некоторым данным, частично восстановленные формы ТНТ могут взаимодействовать между собой с образованием еще более устойчивого азокситетранитротолуола, который вызывает более высокий уровень мутаций, чем ТНТ, и не метаболизируется большинством микроорганизмов [3].

Повышенный интерес к проблеме разложения ТНТ бактериями и грибами определяется не только высоким уровнем загрязнения почв этим токсикантом, но также тем, что долгое время оставался неустановленным механизм освобождения азота из молекулы ТНТ. В настоящее время известно, что

эффективный путь бактериальной дегградации ТНТ включает образование Майсенхаймеровского комплекса с последующим дезаминированием, что приводит к образованию толуола и его полному разложению [1, 2, 4]. Имеется ограниченное количество статей, посвященных ферментам начальной атаки ТНТ. Так известно, что ТНТ-нитроредуктазы (ТНТ-НР), ферменты, которые катализируют восстановление нитрогруппы ароматических соединений, делятся на две группы – кислород-зависимые и независимые [5–7]. Для восстановления нитрогруппы они переносят два электрона с НАД(Ф)Н. ТНТ-НР выделены из штаммов *Pseudomonas putida* JLR11 и *Pseudomonas* sp. НК-6 и клонированы кодирующие их гены [5–7].

Цель работы – проведение скрининга среди бактерий-деструкторов различных ароматических соединений для выявления штаммов, способных разлагать ТНТ; определение образующихся продуктов биоконверсии; оценка активности ТНТ-НР; оптимизация процессов биодеструкции ТНТ и проверка способности активных штаммов разлагать ТНТ в почве.

МЕТОДИКА

Организмы, методы культивирования. Для скрининга штаммов, способных осуществлять разложение ТНТ, использовали бактериальные культуры (45 штаммов из коллекции лаборатории энзиматической дегградации органических соединений, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино),

выделенные из мест как загрязненных ксенобиотиками, так и из лесной почвы, и микроорганизмы (20 штаммов из коллекции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь), выделенные из солевых отложений и отходов калийных производств на территории Верхнекамского месторождения солей (Россия).

Адаптация бактерий к росту на ТНТ. На первом этапе адаптацию к росту на ТНТ проводили на чашках с агаризованной лимитированной по азоту минеральной среде (**среда ЛМ**), следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 – 0.73; KH_2PO_4 – 0.35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; NaHCO_3 – 0.25; MnSO_4 – 0.002; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, содержащей 50 мг/л ТНТ и 5% (об/об) мясо-пептонного бульона (МПБ). Пересевы культур проводили на протяжении 6 мес раз в 7 дней. На втором этапе использовали среду ЛМ с ТНТ (100 мг/л) в качестве единственного источника углерода, азота и энергии. Пересевы проводили в течение года раз в 7–10 сут.

Для определения способности культур использовать ТНТ в качестве единственного источника углерода, азота и энергии индивидуальные культуры или их смеси засеивали в жидкую среду ЛМ (200 мл), содержащую только ТНТ (50 мг/л). В качестве контроля использовали ту же культуру, проводя засев в минеральную среду, содержащую, помимо перечисленных солей, 0.75 г/л NH_4NO_3 (среда G).

Для изучения способности культур трансформировать ТНТ, взятый в различных концентрациях, клетки выращивали на агаризованной среде ЛМ, содержащей 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ, или засеивали колбы с 200 мл ЛМ среды, содержащей ТНТ в концентрациях 100, 150 и 200 мг/л и 5% МПБ. Пробы отбирали на 3 и 6 сут. Клетки собирали центрифугированием, супернатант экстрагировали этилацетатом, как описано далее. В качестве контроля использовали культуру, выращенную на МПБ, и среду с ТНТ в одной из концентраций без добавления культуры.

Динамика превращения ТНТ. Для изучения динамики превращения ТНТ культуры высевали на 4–5 чашек с агаризованной средой ЛМ, содержащей 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ. После того, как культура вырастала, с чашек делали смыв в жидкую среду ЛМ и засеивали колбы с 200 мл среды с ТНТ и МПБ. В качестве контролей использовали ту же среду с культурой без ТНТ и с ТНТ без культуры. Пробы (колбу целиком) отбирали в нулевой момент и на 2, 4, 6, 8 и 10 сут или на 5, 10 и 15 сут, так как динамика образования интермедиатов у разных штаммов была различной. ТНТ добавляли только при засеивании. В оставшиеся колбы вносили 10% (по объему) МПБ. Клетки отделяли центрифугированием при 17000 g 10 мин и 4°C. Супернатант экстрагировали этилацетатом дважды из

нейтральной среды (соотношение этилацетат–среда 1 : 1), подкисляли соляной кислотой до pH 2.0, экстрагировали дважды из кислой среды (этилацетат–среда 1 : 1). Экстракты объединяли, упаривали досуха, растворяли в 50 мкл ацетона и 2.5–5 мкл экстракта наносили на пластинки с Kieselgel 60 F254 (“Merck”, Германия). Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили в системе бензол–диоксан–уксусная кислота (90 : 10 : 2). Для выделения образующихся интермедиатов видимые в ультрафиолете пятна счищали с пластинок, экстрагировали с носителя 100 мкл метанола и после центрифугирования повторно наносили на пластинку.

Метаболиты идентифицировали на масс-спектрометре Finnigan MAT 8430 (Германия) при энергии электронного удара 70 эВ, используя прямой ввод образца в область ионизации. Установление структуры проводили на основании сравнения полученных масс-спектров с данными литературы, а также анализа распада молекулярного иона.

Количество ТНТ после экстракции, упаривания и растворения образца в 5 мл этилацетата определяли методом газовой хроматографии на приборе Кристалл 200 М с пламенно-ионизационным детектором и колонкой HP-5 (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм) (“Хроматек”, Россия). Температура испарителя, колонки и детектора была 200, 200 и 290°C, соответственно. Образцы (1 мкл) вводили с помощью автосэмплера DAZh-2M (“Хроматек, Россия”). Количество ТНТ рассчитывали по калибровочной кривой.

Определение активности ТНТ-НР. Для определения активности ТНТ-НР бактерии культивировали в жидкой среде ЛМ, периодически внося ТНТ (раз в 5 сут в концентрации 50 мг/л) и сукцинат (раз в 2–3 сут в концентрации 200 мг/л). Из-за недостаточного для разрушения количества биомассы активность ТНТ-НР определяли только после 4 сут культивирования, хотя, согласно данным газовой хроматографии, максимальная убыль субстрата приходилась на первые 2–4 сут. Клетки собирали центрифугированием (10 мин, 4°C, 17000 g), отмывали трис-НСI буфером и разрушали на ИБФМ-прессе (ИБФМ РАН) с рабочим давлением 3200 кГ/см. Для получения бесклеточного экстракта к разрушенным клеткам добавляли ДНКазу и центрифугировали при 28000 g 25 мин. Супернатант использовали для определения активности фермента.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Брэдфорд [8]. Активность ТНТ-НР определяли по снижению поглощения при 340 нм смеси, содержащей ТНТ, НАДН или НАДФН, ФАД в трис-НСI буфере в присутствии бесклеточного экстракта [5]. Измерение проводили в течение 3 мин. В качестве контролей ис-

пользовали снижение поглощения при 340 нм: бесклеточного экстракта с НАДН; бесклеточного экстракта с НАДН и ФАД; ТНТ с НАДН; ТНТ с НАДН и ФАД; ТНТ с НАДФН. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата в мин.

Для проверки способности культур проводить разложение ТНТ в почве в качестве инокулята использовали бактериальные культуры, выращенные на агаризованной среде с 50 мг/л ТНТ и 10% МПБ. Культуры смывали с чашек минеральной средой, по 50 мл суспензии ($OD_{545\text{нм}} = 0.6$) добавляли на 1.5 кг почвы. Раствор ТНТ вносили в почву перед внесением инокулята, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. Влажность почвы поддерживали внесением водопроводной воды (150 мл на 1.5 кг почвы раз в 1 нед с перемешиванием). Пробы (по 100 г почвы) для анализа отбирали через 2 нед, 1, 2 и 2.5 мес, помещали в колбы с 200 мл воды, оставляли на качалке при 29°C и скорости вращения 220 об/мин на 4 ч, затем добавляли равный объем этилацетата и оставляли в тех же условиях на качалке на 12 ч. ТНТ и интермедиаты экстрагировали, как описано ранее. Остаточное количество ТНТ определяли методом ГХ. Идентификацию интермедиатов проводили методом масс-спектрометрии после выделения и очистки интермедиатов методом ТСХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг активных штаммов-деструкторов.

45 штаммов-деструкторов различных ароматических соединений из лабораторной коллекции и 20 культур галофильных и галотолерантных бактерий были проверены на способность разлагать ТНТ.

На рис. 1 представлены графики убыли ТНТ из культуральной среды при инкубировании бактерий на жидкой среде ЛМ с ТНТ и МПБ в качестве ростовых субстратов. ТНТ, взятый в концентрации от 35 до 70 мг/л, разлагался бактериями на 86–100% за 6–10 сут. Лучшие результаты получены для штаммов *Kocuria palustris* RS32 и *Acinetobacter* sp. VT11. Штамм *K. palustris* RS32 полностью осуществлял трансформацию ТНТ при его концентрации 70 мг/л менее чем за 8 сут, при этом большая часть ТНТ трансформировалась за первые 2 сут. Изучение динамики трансформации ТНТ культурой *Kocuria rosea* RS51 показало, что снижение концентрации токсиканта происходило равномерно, примерно по 20% за 2 сут. Остаточное его количество составило 0.1–0.4 мг. Интенсивное удаление ТНТ (более 50% внесенного субстрата) из культуральной жидкости наблюдали в первые 4 сут роста культуры *Rhodococcus minimus* 1a. Изучение динамики трансформации ТНТ культурой *R. opacus* 1G показало, что основное

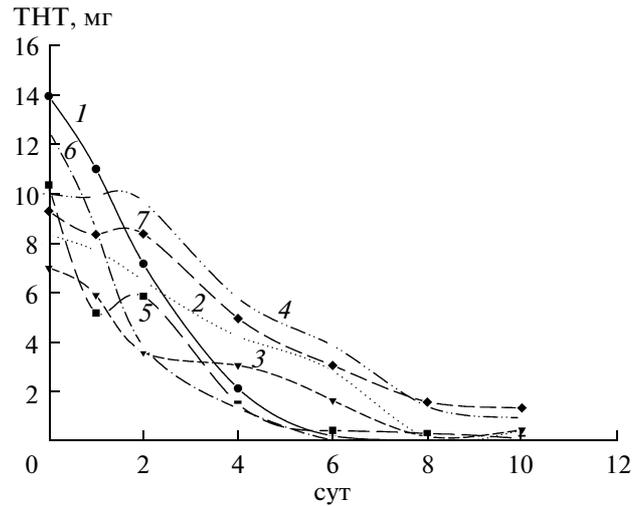


Рис. 1. Убыль ТНТ (по данным газовой хроматографии) при инкубировании бактерий на среде ЛМ с ТНТ и МПБ. 1 – *K. palustris* RS32, 2 – *K. rosea* RS51, 3 – *R. minimus* 1a, 4 – *R. opacus* 557, 5 – *R. opacus* 1G, 6 – *Acinetobacter* sp. VT11, 7 – *R. opacus* 1CP.

снижение количества субстрата на 86% происходило за тот же период времени, как и у предыдущего штамма. Остаточное количество после 8 сут культивирования составило менее 1%. Разложение ТНТ культурой *R. opacus* 557 происходило менее интенсивно по сравнению с другими культурами. За первые 2 сут убыли практически не наблюдалось, зато последующие 2 сут культивирования приводили к снижению количества ТНТ почти в два раза, затем скорость разложения ТНТ замедлялась. Разложение ТНТ культурой *R. opacus* 1CP происходило с наименьшей интенсивностью: 60%-ная убыль наблюдалась только после 6 сут культивирования, количество ТНТ на 10 сут составляло 14%. Разложение ТНТ культурой *Acinetobacter* sp. VT11 происходило практически с такой же интенсивностью, что и штаммами *K. palustris* RS32 и *R. opacus* 1G – на 4 сут убыль ТНТ составила 90% (рис. 1). На 6 сут остаточное количество не превышало 0.5% от исходной концентрации соединения. Следует отметить, что рост культуры *Acinetobacter* sp. VT11 в жидкой минеральной среде с МПБ (без ТНТ) опережал рост культуры в присутствии МПБ и ТНТ, особенно явно это различие было на первых этапах культивирования, что может быть объяснено токсическим влиянием ТНТ на бактериальную культуру (рис. 2).

Результаты эксперимента показали, что в целом начальная концентрация ТНТ не влияла на скорость трансформации субстрата. Так, уже к 6 сут штамм *K. palustris* RS32 превращал 98.5% внесенного ТНТ, взятого в наивысшей (в этой серии опытов) концентрации – 70 мг/л. Наименьшая из использованных концентраций ТНТ (35 мг/л) была в опыте со штаммом *R. minimus* 1a,

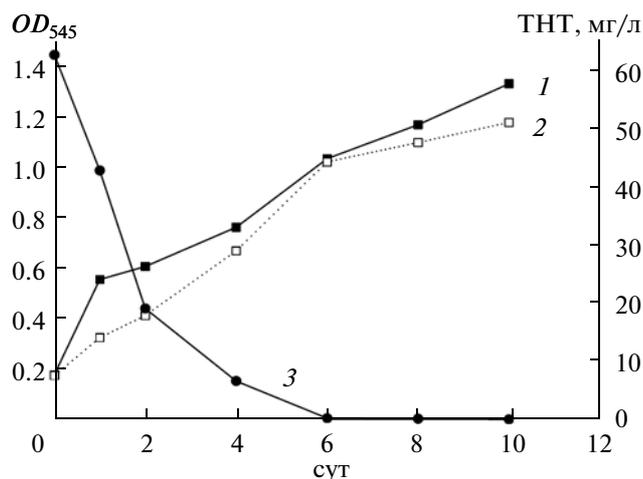


Рис. 2. Динамика роста культуры *Acinetobacter* sp. VT11 на богатой среде (1), на богатой среде в присутствии ТНТ (2). 3 – убыль ТНТ.

при этом полная убыль субстрата наблюдалась только к 8–10 сут.

Таким образом, ТНТ в концентрации 35–70 мг/л не ингибировал рост проверенных бактериальных культур. Ранее было показано, что ТНТ оказывает токсичное действие на многие организмы [9]. Так, даже в концентрации 2.5 мг/л ТНТ в значительной степени подавлял рост *Salmonella typhimurium*. Повышение концентрации этого вещества с 5 до 10 мг/л после трех и четырехсуточного контакта с ТНТ *Tigriopus californicus* и *Crassostrea gigas* соответственно приводило к гибели 80% особей [9]. Нами показано, что бактериальные культуры, которые в течение года адаптировались к росту на ТНТ, оказались способными к росту в присутствии более высоких, до 70 мг/л, концентраций ТНТ, что в разы превышает использованные ранее концентрации. Кроме того, присутствие ТНТ в среде, содержащей дополнительный источник для роста, не оказывало значительного влияния на скорость роста культур, что свидетельствует о незначительном токсичном влиянии ТНТ на эти организмы, в первую очередь, благодаря их способности к детоксикации субстрата за счет превращения его в нитро-аминопроизводное.

Использование ТНТ как единственного источника углерода, азота и энергии. При использовании агаризованной среды ЛМ с ТНТ в качестве единственного ростового субстрата (без добавления МПБ) только часть культур оказалась способной к росту на этом субстрате: *K. rosea* RS51, *K. palustris* RS32, *R. opacus* 1ср, *Rhodococcus* spp. 400, 412, *R. minimus* 1а, *Rhodococcus* spp. VT2 и VT7, *Acinetobacter* sp. VT11, *Pseudomonas* sp. 7W. Эти культуры использовали в дальнейшей работе для

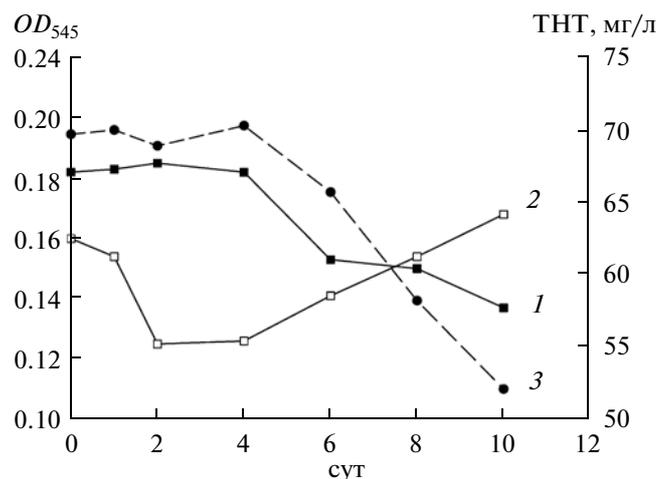


Рис. 3. Способность культуры *Acinetobacter* sp. VT11 использовать ТНТ как единственный источник углерода, азота и энергии. 1 – контроль (без ТНТ), 2 – среда с ТНТ, 3 – убыль ТНТ.

оценки скорости убыли ТНТ и динамики образования интермедиатов.

Культуру *Acinetobacter* sp. VT11, показавшую 90% убыли ТНТ за 4 сут, проверили на способность использовать ТНТ в качестве единственного источника углерода, азота и энергии (рис. 3). Как видно из представленных данных, в контрольном варианте происходило постепенное снижение оптической плотности, особенно заметное на 10 сут. В присутствии ТНТ снижение оптической плотности, наблюдаемое в течение первых 4 сут культивирования, сменялось ее ростом и к 10 сут превысило начальное значение (рис. 3). В это же время после 6 сут наблюдалось снижение количества ТНТ в пробах. Этот процесс не сопровождался накоплением каких-либо интермедиатов, определяемых методом ТСХ. Очевидно, это связано с тем, что штамм *Acinetobacter* sp. VT11 способен использовать ТНТ в качестве единственного источника для роста и его метаболизм идет без накопления значительного количества промежуточных продуктов.

ТНТ до сих пор рассматривается как поллютант первостепенного значения [10]. Несмотря на то, что максимальный уровень производства и потребления ТНТ относится к 40–60 гг. прошлого столетия, вопросы детоксикации почв и воды от загрязнений ТНТ не теряют своей остроты. Работы, посвященные поиску бактериальных штаммов, способных разлагать ТНТ, остаются все еще малочисленными. До конца 70 гг. практически отсутствовали публикации, описывающие штаммы, способные не только трансформировать, но и полностью минерализовать ТНТ [11–14]. Но даже в этих работах ТНТ использовался бактериальными штаммами как источник азота, но не един-

Таблица 1. Трансформация ТНТ при различных концентрациях культурой *K. palustris* RS32 в присутствии МПБ

Время культивирования, сут	Концентрация ТНТ, мг/л культуральной среды		
	93	140	186
0	93	140	186
3	28	75	Не определяли
6	0	5	12

ственный ростовой субстрат, и в качестве источника углерода авторы добавляли фруктозу, глицерин или глюкозу [11, 14]. Поэтому способность штамма *Acinetobacter* sp. VT11 использовать ТНТ в качестве единственного ростового субстрата и устойчивость к высоким концентрациям делают этот микроорганизм перспективным для ремедиации почв от загрязнений ТНТ.

Способность бактериальных культур к трансформации ТНТ. Способность трансформировать ТНТ в различных концентрациях проверялась с использованием нескольких бактерий, наиболее активными из которых были *K. palustris* RS32, RS39 и *R. opacus* 1G. Лучшие результаты были получены с использованием культуры *K. palustris* RS32, которая за 6 сут трансформировала 100% ТНТ при исходной его концентрации 93 мг/л и 93.5% субстрата за это же время при исходной его концентрации 186 мг/л (табл. 1).

Исследуя рост микроорганизмов на среде, содержащей дополнительные ростовые компоненты и различные концентрации ТНТ, Клаусмейер с соавт. [15] отметили, что концентрация ТНТ выше 50 мг/л предотвращала или сильно лимитировала рост большинства грибов, дрожжей, актиномицетов и грамположительных бактерий. Пастигригсби с соавт. [16] определили, что только некоторые из 31 проверенного штамма актиномицетов росли при концентрации ТНТ 75 мг/л и толь-

ко 2 – при 100 мг/л. При использовании ТНТ в качестве единственного источника азота и углерода рост исследуемых авторами штаммов на ТНТ в концентрациях 25–100 мг/л отсутствовал. При исследовании выделенного нами штамма *K. palustris* RS32 показано, что увеличение концентрации ТНТ от 100 до 150 мг/л не влияло на скорость убыли токсиканта, которая составила 6.5 мг ТНТ в обоих случаях за 3 сут. Увеличение концентрации ТНТ до 200 мг/л полностью не ингибировало рост культуры, хотя вдвое снижало скорость процесса биодеструкции. Штамм *R. opacus* 1G был способен значительно (на 79%) трансформировать ТНТ, взятый в концентрации 100 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата уменьшало скорость трансформации: при концентрации ТНТ 136 мг/л убыль внесенного токсиканта за 6 сут составила всего 30%, а при концентрации 190 мг/л – 20%.

ТНТ-НР. В бесклеточных экстрактах всех бактериальных культур, способных трансформировать ТНТ, была обнаружена активность ТНТ-НР, уровень которой у различных штаммов различался более чем в 50 раз (табл. 2). Фермент нуждался в присутствии НАДН в качестве кофактора. При добавлении НАДФН вместо НАДН активность ТНТ-НР обнаруживалась только в одном случае, у штамма *R. opacus* 1G. В экстрактах культуральной жидкости штамма *R. opacus* 1G активность ТНТ-НР в присутствии НАДН была выше, чем в экстрактах остальных штаммов.

Были предприняты попытки оценить динамику активности ТНТ-НР у бактерий при трансформации ТНТ. Показано, что у культуры *R. opacus* 557 на 4 сут активность ТНТ-НР была максимальной, далее к 8–10 сут она снижалась. Активность ТНТ-НР у культуры *R. minimus* 1a была достаточно низкой на протяжении всего опыта, ее уровень изменялся с 0.02–0.05 Ед./мг белка на 4–6 сут и снижался до 0.01 Ед./мг белка к 8–10 сут. Активность ТНТ-НР на 4 сут культивирования штамма *Acinetobacter* sp. VT11 на порядок превышала зна-

Таблица 2. Активность ТНТ-НР в бесклеточных экстрактах

Штамм	Активность ТНТ-НР с НАДН + ТНТ, ед./мг белка	Активность ТНТ-НР при добавлении в реакционную смесь ФАД, %
<i>Rhodococcus</i> sp. VT7	0.0353	139
<i>R. opacus</i> 1G	0.0521	286
<i>K. palustris</i> RS32	0.0109	117
<i>K. rosea</i> RS51	0.0388	100
<i>R. opacus</i> 557	0.0018	Не определяли

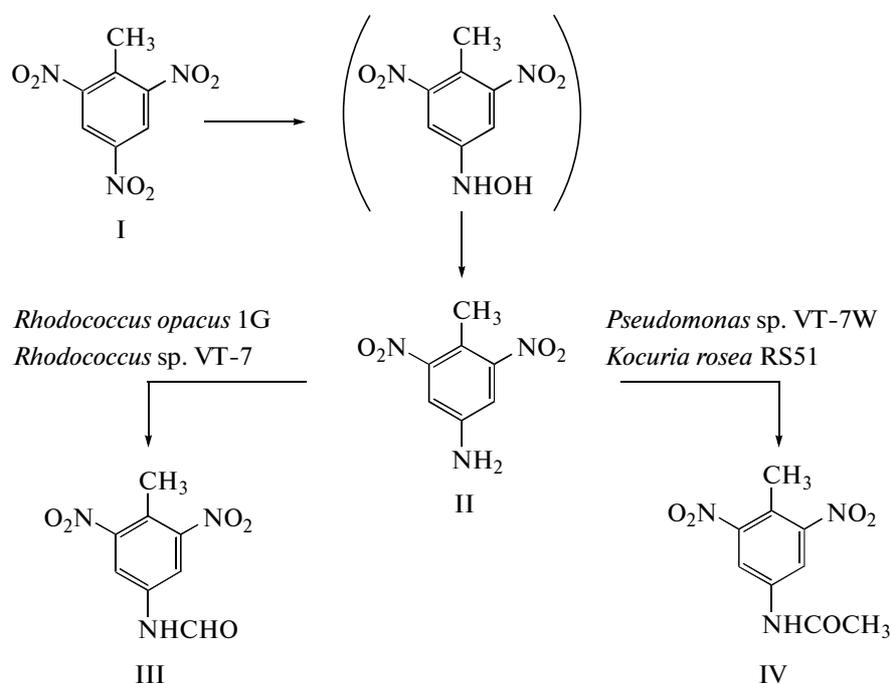
Таблица 3. Масс-спектрометрическая характеристика интермедиатов, образующихся при бактериальной трансформации ТНТ

Соединение	Основные характеристические пики в масс-спектре, m/z (%)
2,4,6-Тринитротолуол (I)	M^+ 227(2), 210(100), 193(11), 180(11), 134(11), 89(25), 76(10), 63(16)
2,6-Динитро-4-аминотолуол (II)	M^+ 197(57), 180(100), 163(10), 133(14), 132(15), 105(52), 104(66), 93(26), 78(58), 77(40)
(4-Метил-3,5-динитрофенил)формаимид (III)	M^+ 225(35), 208(100), 197(25), 180(30), 154(18), 121(30), 105(37), 104(38), 93(29), 77(49)
3,5-Динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты (IV)	M^+ 239(42), 222(9), 208(13), 197(100), 180(77), 163(12), 104(31), 93(19), 77(31), 43(98)

чения активности фермента на 6–10 сут. В этот же период происходило снижение количества ТНТ в пробе, что отражало метаболическую активность штамма. Активность ТНТ-НР в контроле отсутствовала.

Таким образом, в бесклеточных экстрактах всех проверенных штаммов была выявлена активность ТНТ-НР. Ее уровень различался, но в среднем был сопоставим с уровнем активности экспрессируемых ТНТ-НР из штамма *Pseudomonas putida* JLR11, составляющих 0.52 (PnrA) и <0.02 (PnrB) ед./мг белка [7].

Интермедиаты, образующиеся при трансформации ТНТ бактериями. О глубине деструкции ТНТ под действием бактерий можно судить по количеству образующихся интермедиатов, так как известно, что большинство бактерий, описанных в литературе, способны трансформировать ТНТ с образованием amino-нитропроизводных. Мы показали, что бактерии, использованные в данной работе, катализировали превращение ТНТ с образованием различного количества интермедиатов. Например, процесс трансформации ТНТ штаммом *K. palustris* RS32 сопровождался образованием значительного количества интермедиатов, до 13,

**Рис. 4.** Предполагаемые пути начальной трансформации ТНТ различными бактериальными культурами. I – 2,4,6-тринитротолуол, II – 2,6-динитро-4-аминотолуол, III – (4-метил-3,5-динитрофенил)формаимид, IV – 3,5-динитро-4-метил-анилид уксусной кислоты.

количество которых к 8 сут снижалось до 7–8. У культуры *R. opacus* 557 образование наибольшего количества интермедиатов происходило на 8–10 сут. В экстрактах культуральной жидкости штамма *R. opacus* 1G обнаруживалось от 4 до 6 интермедиатов на протяжении всего эксперимента. На 23 сут у штамма *Rhodococcus* sp. VT7 методом ТСХ выявлено около 15 интермедиатов, причем интермедиаты со значениями R_f выше 0.5 (около 6) присутствовали только у данного штамма.

Некоторые интермедиаты, образующиеся в значительном количестве при трансформации ТНТ различными бактериальными штаммами, были выделены, очищены и проанализированы методом масс-спектрометрического анализа. Один из интермедиатов, образующийся на 6–10 сут культивирования штамма *R. opacus* 1G, идентифицирован как 2,6-динитро-4-аминотолуол (табл. 3). При разложении ТНТ культурой *R. opacus* 1ср 2,6-динитро-4-аминотолуол не обнаружен. Для штаммов *R. opacus* 1G и *Rhodococcus* sp. VT7 показано, что динитротолуидин (2,6-динитро-4-аминотолуол) далее трансформировался в 4-метил-3,5-динитроформамид (рис. 4). Последняя реакция обращает на себя внимание, так как ранее было показано наличие такого интермедиата при трансформации ТНТ грибами [1]. При трансформации ТНТ штаммами *Pseudomonas* sp. VT-7W и *K. rosea* RS51 показано образование на 12 сут ацетилированного динитротолуидина.

Таким образом, обнаружение значительного количества интермедиатов, образующихся при бактериальной трансформации ТНТ, а также идентификация некоторых из этих соединений свидетельствуют о том, что изучаемые штаммы способны осуществлять не только реакции первоначального восстановления ТНТ, но и более глубокие процессы превращения этого соединения.

Разложение ТНТ в почве активными бактериальными штаммами. Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о способности ряда бактериальных штаммов трансформировать ТНТ, в том числе и в случаях, когда токсикант был добавлен в высоких концентрациях. Эти активные бактериальные штаммы были использованы для детоксикации загрязненных ТНТ почв. На рис. 5 представлены результаты определения остаточного количества ТНТ при проведении эксперимента с использованием лучших бактериальных штаммов для деградации ТНТ в почве. Как видно из представленных данных, наибольшее количество ТНТ исчезало из образцов за первые 2 нед, далее происходило относительно равномерное снижение количества токсиканта в пробах. Остаточное количество ТНТ варьировало от 10 до 18%.

Присутствие в загрязненных ТНТ объектах бактерий, способных осуществлять реакции трансформации этого вещества, позволяет значи-

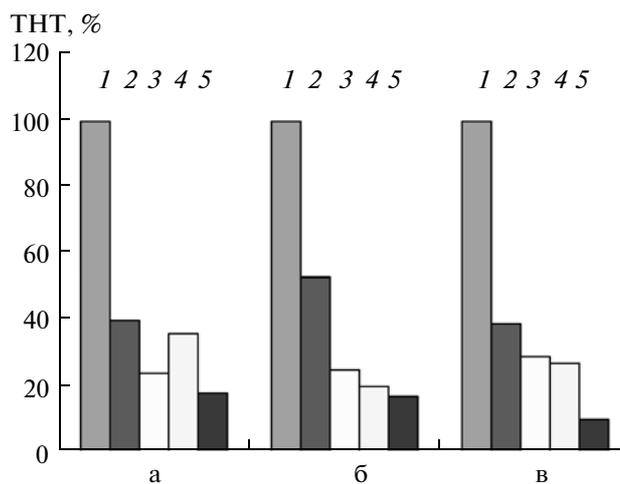


Рис. 5. Остаточное количество ТНТ в почве при внесении бактериальных культур: *K. rosea* RS51 (а), *K. palustris* RS32 (б), *R. opacus* 1G (в) через 0 (1), 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4) и 2.5 (5) месяцев.

тельно снизить или освободить биоценозы от токсичного действия поллютанта [11]. В результате проведенного нами исследования показана принципиальная возможность применения бактерий для детоксикации почвы и воды от загрязнений этим веществом. Отобранные в работе культуры эффективно трансформировали ТНТ в присутствии дополнительного ростового источника. Выделенные ами культуры *K. palustris* RS32, *R. opacus* 1G, *Acinetobacter* sp. VT11 были способны трансформировать ТНТ в концентрациях, которые полностью подавляли рост у ранее описанных в литературе штаммов. Проведенный эксперимент показал возможность использования отобранных бактерий для их очистки почвы от загрязнений ТНТ.

Работа поддержана грантом МНТЦ G-1408.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Esteve-Nunez A., Caballero A., Ramos J.L. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001. V. 65. № 3. P. 335–352.
2. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Spain J.C., Knackmuss H.-J. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 1. P. 246–252.
3. Haidour A., Ramos J.L. // Environ. Sci. Technol. 1996. V.30. № 10 P. 2365–2370.
4. Bryant C., DeLuca M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 7. P. 4119–4125.
5. Caballero A., Lazaro J.J., Ramos J.L., Esteve-Nunez A. // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. № 8. P. 1211–1219.
6. Kahng H.-Y., Lee B.-U., Cho Y.-S., Oh K.-H. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2007. V. 12. № 4. P. 433–440.
7. Lee B.-U., Park S.-C., Cho Y.-S., Kahng H.-Y., Oh K.-H. // Curr. Microbiol. 2008. V. 56. № 4. P. 386–390.

8. Schlömann, M., Schmidt, E., Knackmuss, H.-J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 9. P. 5112–5118.
9. Won W.D., DiSalvo L.H., Ng J. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. № 4. P. 576–580.
10. Rylott E.L., Lorenz A., Bruce N.C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 3. P. 434–440.
11. McCormick N.G., Feeherry F.E., Levinson H.S. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. № 6. P. 949–958.
12. Chang H.W., Kahng H.Y., Kim S.I., Chun J.W., Oh K.N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. № 3. P. 323–329.
13. French C.E., Nicklin S., Bruce N.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 8. P. 2864–2868.
14. Stenuit B., Eysers L., Rozenberg R., Habib-Jiwan J.-L., Agathos S.N. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 12. P. 7945–7948.
15. Klausmeier R.E., Osmon J.L., Wall D.R. // Dev. Ind. Microbiol. 1974. V. 15. № 2. P. 309–317.
16. Pasti-Grigsby M.B., Lewis T.A., Crawford D.L., Crawford R.L. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 3. P. 1120–1123.

Detoxification of High Concentrations of Trinitrotoluene by Bacteria

I. P. Solyanikova^a, B. P. Baskunov^a, M. A. Baboshin^a, A. I. Saralov^b, and L. A. Golovleva^a

^a Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia
e-mail: Golovleva@IBPM.Pushchino.ru

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

Received June 7, 2011

Abstract—The ability of the strains-destroyers of various aromatic compounds to utilize trinitrotoluene (TNT) up to concentration of 70 mg/l was shown. An increase in the TNT concentration from 100 to 150 mg/l did not inhibit its conversion rate by the *Kocuria palustris* RS32 strain. The *Acinetobacter* sp. VT11 strain utilized TNT as a sole substrate for growth; 3,5-dinitro-4-methyl anilide acetate and 2,6-dinitro-4-amino-toluene were identified as intermediates of TNT degradation by active strains of *Pseudomonas* sp. VT-7W and *Kocuria rosea* RS51. At the same time, 4-methyl-3,5-dinitroformamide was discovered for the first time upon the TNT destruction by the bacteria strains of *Rhodococcus opacus* 1G and *Rhodococcus* sp. VT-7. The active bacterial strains achieved an 82–90% destruction of TNT when they were introduced into the soil.