

УДК 579.222

БИОДЕГРАДАЦИЯ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА ГЕМИАСКОМИЦЕТНЫМИ ДРОЖЖАМИ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО РЕЖИМА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

И.В. Хильяс, Л.Ф. Сафиуллина, А.А. Родионов, А.М. Зиганшин

Аннотация

В статье представлена разработанная схема биодegradации 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* AN-L15 в условиях непрерывного режима культивирования. Для осуществления данного процесса создана установка, состоящая из трех биореакторов и соответствующего оборудования. Установка позволила пространственно разделить и стабилизировать последовательные стадии превращения ТНТ по пути редукции его бензольного кольца, что увеличило уровень биодеструкции исходного токсиканта. В биореакторе первой ступени (диапазон рН среды от 7.0 до 6.7) трансформация ТНТ сопровождается накоплением главного (основного) метаболита – темно-красного моногидридного комплекса Мейзенхеймера (3-Н–ТНТ). В биореакторе второй ступени 3-Н–ТНТ далее преобразовывается в дигидридные комплексы Мейзенхеймера (3,5-2Н–ТНТ·Н⁺) желто-оранжевого цвета. Кроме этого, во втором биореакторе рН среды стабилизируется на уровне 5.6÷5.3 вследствие продуцирования дрожжами органических кислот. В биореакторе третьей ступени интенсивная экскреция дрожжами органических кислот сопровождается смещением рН в более кислую область (ниже 3.3), полной биодegradацией гидридных комплексов и обесцвечиванием очищаемой среды. Удаление исходного ксенобиотика через образование и последующее разрушение ТНТ-гидридных комплексов достигло 80 ± 1%. Методом ЭПР впервые удалось установить образование NO в ходе degradation ТНТ штаммом дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15.

Ключевые слова: 2,4,6-тринитротолуол, биодegradация, NO, *Yarrowia lipolytica*, непрерывное культивирование.

Введение

Большую часть территории Земли занимают водные ресурсы, и проблема их сохранения с каждым годом становится все более острой. В последнее время значительное влияние на их состояние оказывают не только разнообразные природные явления, но в большей мере промышленная деятельность человека, химизация сельского хозяйства, увеличение производства и применения химически синтезированных соединений, в частности нитроароматических ксенобиотиков. Масштабное использование нитроароматических соединений в технологических процессах ведет к увеличению количества отходов [1–3]. Данные отходы обладают высокой кумулятивной способностью и токсичностью, а также мутагенным и канцерогенным эффектами [4, 5].

Среди нитроароматических соединений широкое распространение получил 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), который в местах производства и применения взрывчатых веществ сохраняется длительное время. В этой связи для снижения

техногенного влияния ТНТ на объекты природной среды и человека необходимо создание эффективных технологий локальной очистки концентрированных ТНТ-содержащих сточных вод [3, 6]. Биологическая очистка является одним из универсальных методов удаления химических соединений из сточных вод. В связи с тем, что микроорганизмы, в том числе дрожжи, обладают различными ферментативными системами деструкции устойчивых ксенобиотиков, разрабатываются научные основы для их применения в процессах очистки загрязненных объектов [7, 8].

Известны два механизма биотрансформации ТНТ: а) по пути восстановления нитрогрупп и б) по пути восстановления ароматического кольца. Большинство известных микроорганизмов осуществляют нитроредукцию ТНТ с образованием гидросиламино- и аминопроизводных в качестве мажорных метаболитов, известных также высокой устойчивостью к разрушению [9–12]. Использование данных микроорганизмов не позволяет проводить обезвреживание ТНТ-загрязненных объектов. Трансформация ТНТ по пути восстановления его ароматического кольца сопровождается образованием серии гидридных комплексов Мейзенхеймера [13–15]. В наших предшествующих работах впервые было показано, что гемиаскомицетные дрожжи *Yarrowia lipolytica* AN-L15 способны к деградации ТНТ-гидридных комплексов в условиях периодического культивирования с образованием нитрит- и нитрат-ионов в качестве конечных минеральных форм азота [16, 17]. Кроме того, известно, что дрожжи *Yarrowia lipolytica* активно исследуются на возможность применения в процессах биоремедиации территорий, загрязненных углеводородами и тяжелыми металлами [18–20].

Известен ряд работ, посвященных биологической очистке ТНТ-загрязненных вод [10, 21–23]. Однако в данных работах имеется комплекс недостатков, в частности необходимость предварительной адаптации микроорганизмов к высоким концентрациям исходного ксенобиотика, а также отсутствие его глубокой деструкции. В процессе биоремедиации ТНТ-загрязненных природных и сточных вод основное значение имеет степень деградации ТНТ, а также применимость реализуемых технологических схем к экологизации соответствующих промышленных производств.

Цель настоящей работы – оценить возможность биodeградации ТНТ штаммом дрожжей *Yarrowia lipolytica* AN-L15 в условиях непрерывного режима культивирования и разработать эффективную схему очистки ТНТ-загрязненных вод.

1. Материалы и методы

1.1. Штамм дрожжей и условия культивирования. Эксперименты проводили со штаммом дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15, выделенным из нефтезагрязненных торфяников (Западная Сибирь).

Средой для поддержания штамма *Y. lipolytica* AN-L15 и накопления биомассы служила агаризованная среда Сабуро, содержащая глюкозу – 10.0; пептон – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; NaCl – 0.25; агар – 20.0 г/л дистиллированной воды. В качестве очищаемой жидкости использовали синтетическую среду следующего состава: глюкоза – 28 мМ, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7.6 мМ, MgSO_4 – 2.0 мМ, Na_2HPO_4 – 9.8 мМ, KH_2PO_4 – 6.2 мМ (рН 7.0). ТНТ вносили из расчета 440 мкМ

(100 мг/л) перед автоклавированием среды. Штамм дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 культивировали при оптимальной температуре +30 °С.

1.2. Установка для очистки среды от ТНТ. На рис. 1 представлена установка для непрерывного культивирования дрожжей.

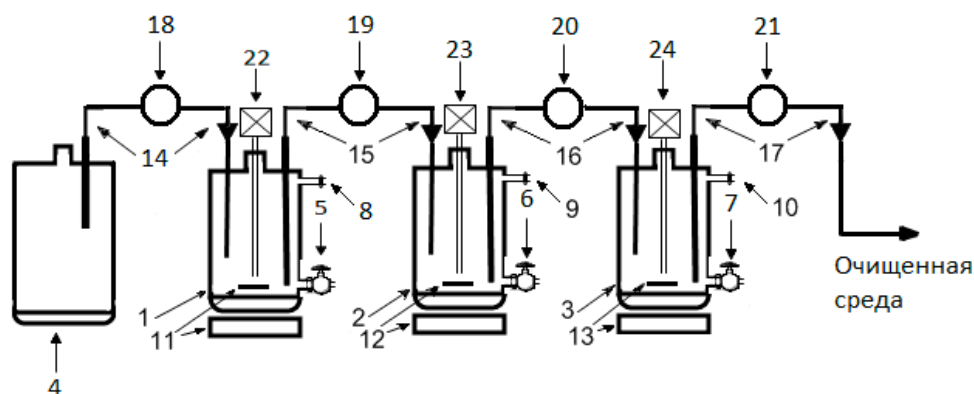


Рис. 1. Установка для очистки ТНТ-загрязненной среды: 1 – первый биореактор; 2 – второй биореактор; 3 – третий биореактор; 4 – резервуар, содержащий жидкую среду с ТНТ; 5, 6, 7 – проботборники; 8, 9, 10 – воздухоотводы, оснащенные фильтрами; 11, 12, 13 – магнитные мешалки; 14, 15, 16, 17 – система трубопроводов; 18, 19, 20, 21 – перистальтические насосы; 22, 23, 24 – система аэрации

Установка состоит из однолитрового резервуара, содержащего жидкую очищаемую синтетическую среду с ТНТ, и трех однолитровых стеклянных биореакторов, обернутых алюминиевой фольгой для уменьшения воздействия света. Резервуар и биореакторы последовательно соединены системой трубопроводов и оборудованы перистальтическими насосами для перекачивания очищаемой среды. Все биореакторы оснащены системой аэрации, обеспечивающей подачу стерильного воздуха, отводящими воздух каналами с фильтрами с диаметром пор 0.22 мкм, проботборниками. Перемешивание очищаемой среды осуществляли магнитными мешалками; процесс очистки проводили при температуре +30 °С (± 1 °С).

1.3. Спектрофотометрические измерения выполняли на сканирующем двухлучевом спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, USA). Биомассу оценивали по изменению оптической плотности среды с клетками при длине волны 600 нм. Контролем служила лишенная клеток среда. 3-Н-ТНТ обнаруживали по пику поглощения при 476 нм, аккумуляцию 3,5-2Н-ТНТ·Н⁺ – по спектральным сдвигам в область 425–430 нм [16, 24].

1.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). ВЭЖХ-анализ ТНТ и продуктов его превращения проводили на хроматографе Series 200 (Perkin Elmer, USA) с использованием колонки Supelcosil octyl C-8 (150 × 4.6 мм; 5 мкм) и детекцией при 254 и 476 нм [16, 17].

1.5. Ионная хроматография. Нитрит- и нитрат-ионы определяли с помощью ионного хроматографа 761 Compact IC (Metrohm AG, Швейцария), оснащенного разделительной колонкой Metrosep A Supp 5 – 150 (6.1006.520). Элюцию проводили растворами 1.0 mM NaHCO₃ и 3.2 mM Na₂CO₃ со скоростью 0.7 мл/мин.

1.6. Электронная парамагнитная резонансная спектроскопия. NO определяли в среде с дрожжевыми клетками после внесения NaДЭТК (натрия N,N-диэтилдитиокарбамат; 5.8 mM) и FeSO₄ (2.6 mM). Затем инкубировали смесь в течение 30 мин при 37 °С. Далее смесь охлаждали и добавляли 0.2 мл свежеперегнанного и предварительно насыщенного водой этилацетата. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение 3 мин и центрифугировали при 6000 g в течение 8 мин. После этого органическую фазу вносили в кварцевые трубки с внутренним диаметром 1 мм (Sigma-Aldrich, Германия) и регистрировали спектры ЭПР в спектрометре ESP-300 (Bruker, Германия) на частоте 9.68 ГГц при комнатной температуре, мощности СВЧ-излучения 50 мВт, амплитуде высокочастотной модуляции 5 Г. Контролем служила синтетическая среда с клетками дрожжей в отсутствие ТНТ.

1.7. Химические реактивы. В работе использовали хроматографически чистые препараты ТНТ, 2,4-динитротолуола (2,4-ДНТ), 2-амино-4,6-динитротолуола (2-АДНТ) и 4-амино-2,6-динитротолуола (4-АДНТ) (99%-ной чистоты). 2-гидроксиламино-4,6-динитротолуол (2-ГАДНТ) и 4-гидроксиламино-2,6-динитротолуол (4-ГАДНТ) (97%-ной чистоты) – химические соединения фирмы AccuStandard (New Haven, США).

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

2. Результаты и их обсуждение

В последнее время возрастает необходимость усовершенствования систем очистки сточных вод промышленных предприятий от устойчивых и токсичных ксенобиотиков. К таким ксенобиотикам относятся полинитроароматические соединения. В настоящей работе разработана схема биodeградации одного из представителей полинитроароматических соединений – 2,4,6-тринитротолуола – штаммом дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в условиях непрерывного режима культивирования.

Ранее нами было показано [16, 17], что периодическое культивирование штамма дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в среде с ТНТ ведет к последовательному образованию мажорных метаболитов – моногидридного комплекса ТНТ (3-Н–ТНТ), обладающего тёмно-красной окраской, и дигидридных комплексов (3,5-2Н–ТНТ·Н⁺) желто-оранжевого цвета. Данные комплексы характеризуются слабой устойчивостью к биологическому разрушению; их деструкция при участии штамма *Y. lipolytica* AN-L15 сопровождалась обесцвечиванием культуральной жидкости и накоплением нитрит- и нитрат-ионов в качестве конечных мине-

ральных форм азота. Не исключено участие различных ферментативных систем в образовании ТНТ-гидридных комплексов и в их последующее разрушение.

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

Контроль процессов образования, накопления и деструкции метаболитов осуществляли с использованием УФ-видимой спектрофотометрии, ВЭЖХ, ионной хроматографии и методом ЭПР. Времена удерживания продуктов трансформации ТНТ в условиях ВЭЖХ и ионной хроматографии представлены в наших ранних работах [16, 17].

Деструкцию ТНТ штаммом дрожжей AN-L15 проводили в две стадии. На первой стадии все три биореактора наполняли на 1/4 (~240 мл) синтетической средой, содержащей ТНТ в концентрации 440 мкМ. Затем включали магнитные мешалки (50–150 об/мин) и систему аэрации (10–30 мл/мин). Во все биореакторы через систему трубопроводов вносили суточную культуру дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 и культивировали в периодических условиях в течение 18 ч.

Внесение клеток до конечной оптической плотности A_{600} 0.2 в первый биореактор вело к убыли ТНТ и накоплению главного метаболита – 3-Н⁻-ТНТ. Максимальное количество образовавшегося 3-Н⁻-ТНТ было зафиксировано на уровне 297 мкМ из 380 мкМ трансформированного ТНТ через 18 ч эксперимента (табл. 1). В первом биореакторе происходило и частичное превращение 3-Н⁻-ТНТ в ряд других ТНТ-гидридных комплексов, однако в данном случае их концентрация оставалась незначительной. В первом биореакторе также начиналось образование нитрит-иона; из метаболитов нитроредукции обнаружены ГАДНТ (табл. 1). При этом рН очищаемой среды поддерживали в диапазоне от 7.0 до 6.7.

Одновременно с началом работы биореактора первой ступени, во второй биореактор, также изначально содержащий среду с ТНТ, вносили дрожжи до конечной A_{600} 0.4. В данных условиях максимальное образование 3-Н⁻-ТНТ (297 мкМ) происходило через 11 ч культивирования. Следующие 7 ч эксперимента связаны с превращением образовавшегося 3-Н⁻-ТНТ в желто-оранжевые 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺ (табл. 1). Из других продуктов трансформации ТНТ обнаружены 2,4-ДНТ, NO₂⁻, NO₃⁻ и ГАДНТ (табл. 1). Во втором биореакторе происходило снижение рН очищаемой среды до уровня 5.6÷5.3 вследствие интенсивного продуцирования дрожжами органических кислот, в частности лимонной, янтарной и пировиноградной кислот, выявленных нами ранее [17].

Одновременно с началом работы двух первых биореакторов в третий биореактор, содержащий среду с ТНТ, вносили дрожжи до конечной A_{600} 0.8. Присутствие повышенной биомассы в третьем биореакторе ускорило биологический процесс, что сопровождалось быстрой и эффективной трансформацией ТНТ в 3-Н⁻-ТНТ (максимальное количество (297 мкМ) на 8-й час) и далее 3-Н⁻-ТНТ в 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺ (максимальное количество на 12-й час). Дальнейшее разрушение ТНТ-гидридных комплексов в биореакторе сопровождалось осветлением очищаемой среды и накоплением нитрат-иона в количестве 71 мкМ, являющегося

Табл. 1

Концентрация ТНТ и его метаболитов в биореакторах после первой стадии культивирования дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 (на 18-й час) ($n = 3$)

Соединения *	Биореактор № 1	Биореактор № 2	Биореактор № 3
	pH 7.0–6.7	pH 5.6–5.3	pH \leq 3.3
ТНТ	60 \pm 4	8 \pm 1	0
3-Н ⁻ -ТНТ	297 \pm 7	35 \pm 4	0
3,5-2Н ⁻ -ТНТ·Н ⁺	23 \pm 3	335 \pm 14	19 \pm 4
2,4-ДНТ	0	11 \pm 2	10 \pm 2
NO ₂ ⁻	15 \pm 3	85 \pm 6	13 \pm 2
NO ₃ ⁻	0	5 \pm 2	71 \pm 7
ГАДНТ	52 \pm 4	93 \pm 5	121 \pm 6
АДНТ	0	0	4 \pm 0.5

* Концентрация ТНТ, 3-Н⁻-ТНТ, 2,4-ДНТ, NO₂⁻, NO₃⁻, ГАДНТ и АДНТ выражена в мкМ, тогда как сумма изомеров 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺ – как площадь их ВЭЖХ-пиков (детекция при A₄₇₆).

мажорным азотсодержащим неорганическим продуктом деструкции токсичного ТНТ. Количество других обнаруженных метаболитов представлено в табл. 1. В третьем биореакторе происходило снижение pH среды до 3.3 и ниже вследствие интенсивного синтеза и экскреции дрожжами органических кислот. На этом завершали выполнение первой стадии процесса.

На второй стадии биодеструкцию ТНТ проводили в условиях непрерывного культивирования дрожжей (после 18 ч эксперимента в условиях периодического культивирования). Перистальтические насосы позволяли перекачивать ТНТ-загрязненную очищаемую среду из резервуара в последовательно соединенные между собой биореакторы. Обновление среды в биореакторах происходило в течение 12–24 ч, что позволяло эффективнее осуществлять деградацию ТНТ. Концентрация метаболитов, обнаруженных при непрерывном культивировании дрожжей, представлена в табл. 2, откуда видно, что пространственное разделение гидридных комплексов вело к большей степени деградации ТНТ и уменьшению образования продуктов альтернативного пути – ГАДНТ и АДНТ. Так, на второй стадии удаление ТНТ через деградацию ТНТ-гидридных комплексов достигло 80 \pm 1%. Изучение ферментов, участвующих в данном процессе, позволит объяснить результаты настоящей работы в будущем.

В каждом из реакторов поддерживали оптимальную оптическую плотность клеток *Y. lipolytica* AN-L15 (от A₆₀₀ 0.2 до A₆₀₀ 4.0). Скорость протока очищаемой среды через биореакторы устанавливали, сохраняя стабильность биологических процессов и обеспечивая пространственное разделение ТНТ-гидридных комплексов в трех биореакторах. Процесс контролировали путем отбора проб через пробоотборники и их последующего анализа и корректировали путем изменения скорости поступления среды (от 10 до 20 мл/ч) и интенсивности перемешивания (20–150 об/мин).

Серьезным аргументом в пользу разрушения ТНТ является обнаружение NO₂⁻ и NO₃⁻, а также впервые выявленный нами факт образования NO в ходе глубокой деградации исходного токсиканта (рис. 2). Образование NO подтверждает высказанную нами ранее гипотезу о частичном абиотическом разложении образующегося NO₂⁻ [17].

Табл. 2

Концентрация ТНТ и его метаболитов в биореакторах после 72-часового непрерывного культивирования дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 ($n = 3$)

Соединения *	Биореактор № 1	Биореактор № 2	Биореактор № 3
	pH 7.0–6.7	pH 5.6–5.3	pH ≤ 3.3
ТНТ	57 ± 5	3 ± 1	0
3-Н ⁻ -ТНТ	301 ± 8	4 ± 1	0
3,5-2Н ⁻ -ТНТ·Н ⁺	24 ± 2	353 ± 12	9 ± 2
2,4-ДНТ	0	9 ± 2	8 ± 1
NO ₂ ⁻	14 ± 2	83 ± 7	13 ± 3
NO ₃ ⁻	0	5 ± 0,5	84 ± 6
ГАДНТ	50 ± 3	87 ± 5	89 ± 7
АДНТ	0	0	2 ± 0.5

* Концентрация ТНТ, 3-Н⁻-ТНТ, 2,4-ДНТ, NO₂⁻, NO₃⁻, ГАДНТ и АДНТ выражена в мМ, тогда как сумма изомеров 3,5-2Н⁻-ТНТ·Н⁺ – как площадь их ВЭЖХ-пигов (детекция при λ₄₇₆).

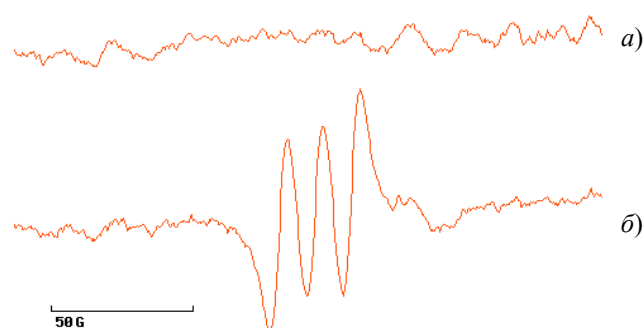


Рис. 2. Спектры ЭПР комплекса Fe^{II}(NO)(ДЭТК)₂: а – синтетическая среда с клетками дрожжей без ТНТ (контроль), б – очищаемая среда из третьего биореактора

Предполагаемые пути трансформации ТНТ штаммом дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 приведены на рис. 3.

Существенным отличием предлагаемого способа многостадийного культивирования штамма дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 в присутствии ТНТ является высокая эффективность биodeградации ТНТ и его метаболитов за короткий промежуток времени (в течение суток).

На сегодняшний день данные по непрерывным процессам культивирования микроорганизмов в присутствии ТНТ остаются весьма ограниченными. Из литературных источников известен способ очистки среды от ТНТ иммобилизованными клетками гриба *Phanerochaete chrysosporium* ВКМ-F-1767 в биореакторе для непрерывного культивирования [21]. Однако средний уровень минерализации ТНТ (при его исходной концентрации 50 мг/л) известным грибом достигал всего лишь 15.3% после 41 дня культивирования.

В другой работе [10] исследована трансформация ТНТ свободными и иммобилизованными клетками *Arthrobacter* sp. 8929. Авторы показали, что процесс трансформации ТНТ (60 мг/л) протекал в течение 24–36 ч с образованием устойчивых аминопроизводных ТНТ без их последующего разрушения. Поэтому для деградации образовавшихся метаболитов необходим подбор других микроорганизмов.

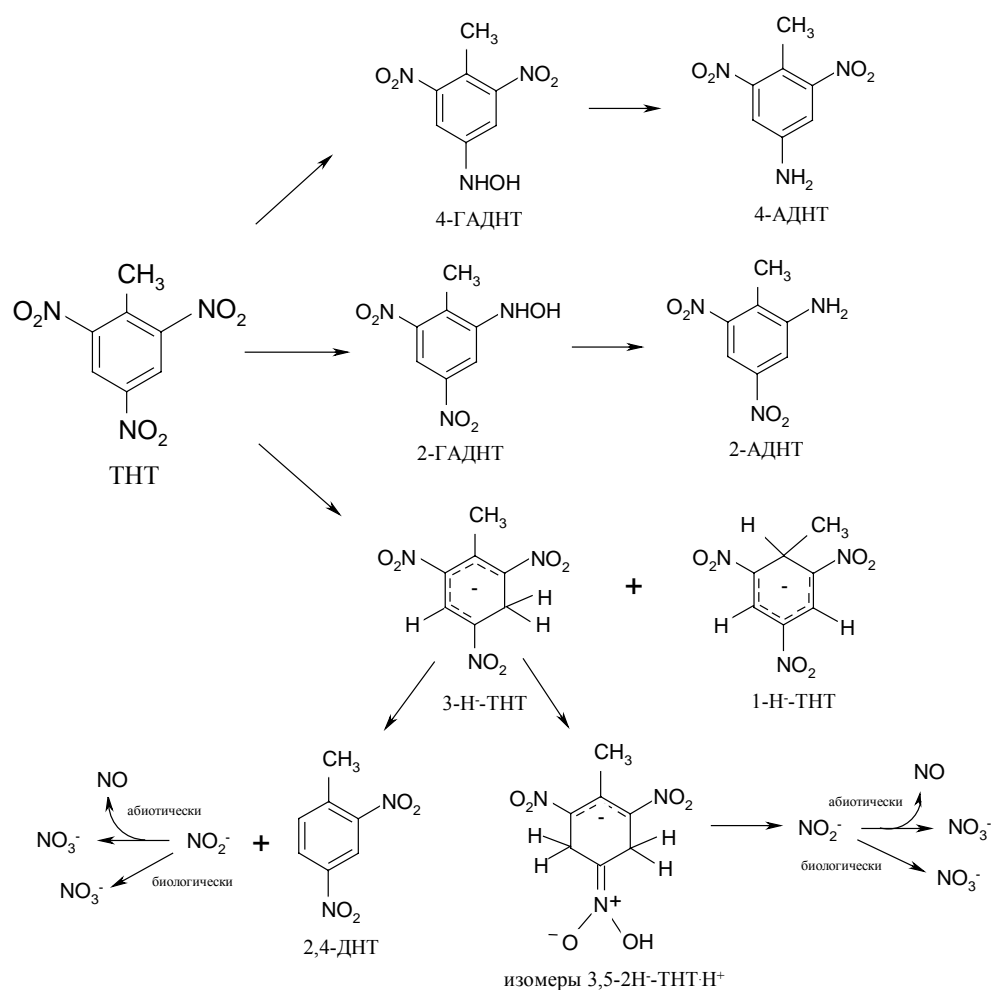


Рис. 3. Пути трансформации и разрушения ТНТ гемиаскомицетными дрожжами *Y. lipolytica* AN-L15

Китайскими учеными [23] предпринята попытка осуществить биологическую деградацию ТНТ микробным сообществом, иммобилизованным на фильтрах, в анаэробных и аэробных условиях. По результатам анализа генов 16S рРНК идентифицировано бактериальное сообщество, осуществляющее трансформацию ТНТ по пути восстановления нитрогрупп. Разрушение как самого ТНТ, так и образовавшихся продуктов отсутствовало, что делает данный процесс очистки промышленно неприемлемым. По-видимому, такое ограничение связано со специфичностью ферментов, участвующих в трансформации ТНТ, у данного бактериального сообщества.

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

Заключение

Таким образом, можно заключить, что штамм дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 осуществляет эффективную деструкцию 2,4,6-тринитротолуола в условиях непрерывного культивирования. Пространственное разделение ТНТ-гидридных комплексов позволило разработать принципиальную биотехнологическую схему обезвреживания ТНТ-загрязненных вод. Устойчивость штамма дрожжей *Y. lipolytica* AN-L15 к высоким концентрациям ТНТ (до 880 мкМ) делает его перспективным для биологической очистки промышленных отходов, природных и сточных вод, грунтов, загрязненных нитроароматическими ксенобиотиками.

Исследования поддержаны федеральными программами «Развитие научного потенциала высшей школы» (РНП 8159, 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).

Авторы благодарят профессора кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета Р.П. Наумову за ценные советы при изложении материала.

Summary

I.V. Khilyas, L.F. Safullina, A.A. Rodionov, A.M. Ziganshin. Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by Hemiascomycetous Yeasts under Continuous Cultivation.

In this paper we developed a scheme for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) biodegradation by the yeast strain *Yarrowia lipolytica* AN-L15 under continuous cultivation. To implement this process, an original system consisting of three bioreactors and appropriate equipment was created. The system allowed us to separate and to stabilize serial stages of TNT transformation via the aromatic ring reduction, which resulted in a higher rate of the toxicant biodestruction. In the bioreactor 1, a deep red monohydride-Meisenheimer complex (3-H-TNT, a major metabolite) accumulated during TNT biotransformation (within a pH range of 7.0÷6.7). In the bioreactor 2, 3-H-TNT was further converted to orange-yellow dihydride-Meisenheimer complexes (3,5-2H-TNT·H⁺). In addition, high production of organic acids by the yeast strain occurred in the second bioreactor, which was accompanied by a decrease in the pH value to 5.6÷5.3. In the bioreactor 3, intensive excretion of organic acids into the medium by the strain resulted in a sharp drop in pH (below pH 3.3), deep destruction of TNT-hydride complexes, and visible decolorization of the treated medium. The level of the xenobiotic removal via formation and biodegradation of TNT-hydride complexes reached 80 ± 1%. This was the first time, when EPR method made it possible to detect NO as a metabolite of TNT degradation by *Y. lipolytica* AN-L15.

Key words: 2,4,6-trinitrotoluene, biodegradation, NO, *Yarrowia lipolytica*, continuous cultivation.

Литература

1. *Nishino S.F., Paoli G.C., Spain J.C.* Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, No 5. – P. 2139–2147.

2. *Bellinaso M., De L., Henriques J.A.P., Gaylarde C.C.* Biodegradation as a biotechnological model for the teaching of biochemistry // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – V. 18, No 5. – P. 385–390.
3. *Stenuit B., Eysers L., Fantroussi S.E., Agathos S.N.* Promising strategies for the mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* – 2005. – V. 4, No 1–2. – P. 39–60.
4. *Frische T.* Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria – a case study of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2002. – V. 51, No 2. – P. 133–144.
5. *Lachance B., Renoux A.Y., Sarrazin M., Hawari J., Sunahara G.I.* Toxicity and bioaccumulation of reduced TNT metabolites in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to amended forest soil // *Chemosphere.* – 2004. – V. 55, No 10. – P. 1339–1348.
6. *Rodgers J.D., Bunce N.J.* Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives // *Water Res.* – 2001. – V. 35, No 9. – P. 2101–2111.
7. *Lenke H., Achtnich C., Knackmuss H.-J.* Perspectives of bioelimination of polynitroaromatic compounds // Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H.-J. (ed.) *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives.* – Boca Raton, FL: Lewis Publ., 2000. – P. 91–126.
8. *Rieger P.-G., Meier H.-M., Gerle M., Vogt U., Groth T., Knackmuss H.-J.* Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence // *J. Biotechnol.* – 2002. – V. 94, No 1. – P. 101–123.
9. *Hawari J., Halasz A., Beaudet S., Paquet L., Ampleman G., Thiboutot S.* Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated culture at pH 4.5 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65, No 7. – P. 2977–2986.
10. *Tope A.M., Jamil K., Baggi T.R.* Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized and resting cells of *Arthrobacter* sp. // *J. Hazard. Subst. Res.* – 1999. – V. 2, No 3. – P. 3.1–3.9.
11. *Зарунов С.А., Наумов А.В., Суворова Е.С., Гарусов А.В., Наумова Р.П.* Начальные этапы трансформации 2,4,6-тринитротолуола микроорганизмами // *Микробиол.* – 2004. – Т. 73, № 4. – С. 398–403.
12. *Sarlauskas J., Nemeikaite-Ceniene A., Anusevicius Z., Miseviciene L., Julvez M.M., Medina M., Gomez-Moreno C., Cenas N.* Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylamino- and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – V. 425, No 2. – P. 184–192.
13. *Pak J.W., Knoke K.L., Noguera D.R., Fox B.G., Chambliss G.H.* Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, No 11. – P. 4742–4750.
14. *Williams R.E., Rathbone D.A., Scrutton N.S., Bruce N.C.* Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70, No 6. – P. 3566–3574.
15. *Wittich R.-M., Ramos J.L., van Dillewijn P.* Microorganisms and explosives: mechanisms of nitrogen release from TNT for use as an N-source for growth // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43, No 8. – P. 2773–2776.
16. *Ziganshin A.M., Gerlach R., Borch T., Naumov A.V., Naumova R.P.* Production of eight different hydride complexes and nitrite release from 2,4,6-trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73, No 24. – P. 7898–7905.
17. *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. – V. 79, No 4. – P. 426–433.

18. Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica* // J. Haz. Mat. – 2009. – V. 170, No 1. – P. 487–494.
19. Chrzanowski L., Bielicka-Daszkiwicz K., Owsianiak M., Aurich A., Kaczorek E., Olszanowski A. Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 24, No 9. – P. 1943–1949.
20. Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 84, No 4. – P. 847–865.
21. Rho D., Hodgson J., Thiboutot S., Ampleman G., Hawari J. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* under fed-batch and continuous TNT feeding conditions // Biotech. Bioeng. – 2001. – V. 73, No 4. – P. 271–281.
22. Pavlostathis S.G., Jackson G.H. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene in a continuous-flow *Anabaena* sp. system // Water Res. – 2002. – V. 36, No 7. – P. 1699–1706.
23. Wang Zh., Ye Zh., Zhang M., Bai X. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized microorganism-biological filter // Process Biochem. – 2010. – V. 45, No 6. – P. 993–1001.
24. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Spain J.C., Knackmuss H.-J. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64, No 1. – P. 246–252.

Поступила в редакцию
08.09.10

Хиляс Ирина Валерьевна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Сафиуллина Ляйсан Фаритовна – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Родионов Александр Александрович – аспирант, электроник кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии Института физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: alexander.rodionov@ksu.ru

Зиганшин Айрат Мансурович – кандидат биологических наук, ассистент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: a.ziganshin06@fulbrightmail.org