

УДК 579.22:579.242+579.841.92.083.182.2

## ПОДАВЛЕНИЕ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛОМ СПОРООБРАЗОВАНИЯ *Bacillus subtilis* SK1 И ПЕРЕХОД КЛЕТОК В НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ

Г.Ю. Яковлева, Н.Г. Захарова, Р.Э. Давыдов, Б.М. Куриненко

### Аннотация

Установлено, что при отсутствии экзогенных источников питания (инкубирование в 0.5%-ном растворе NaCl) часть клеточной популяции *Bacillus subtilis* SK1 сохраняет свою жизнеспособность и переходит к спорообразованию. Присутствие в среде инкубирования 2,4,6-тринитротолуола приводит к репрессии спорообразования. Часть клеточной популяции переходит в некультивируемое, но жизнеспособное состояние. С точки зрения сохранения вида в условиях комбинированного токсического и голодного стресса такой переход не может являться альтернативой спорообразованию.

**Ключевые слова:** 2,4,6-тринитротолуол, токсичность, репрессия спорообразования, *Bacillus subtilis*, некультивируемое состояние, сукцессия к гибели.

### Введение

При недостатке питательных веществ клетки бацилл могут перейти в покоящуюся форму, образовав эндоспору. В условиях репрессии спорообразования (например, при высоких концентрациях глюкозы в среде культивирования) под действием ауторегуляторного фактора *d1* они способны образовывать жизнеспособные, но некультивируемые формы [1, 2].

Неизвестно, как реагируют бациллы на токсическое действие природных соединений – спорообразованием и (или) переходом в некультивируемое состояние. Одним из высоко токсичных и трудноразлагаемых представителей ксенобиотиков является 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ). Ранее нами было показано, что токсическое действие ксенобиотика проявляется в изменении морфологических, физических и физиологических показателей клеток *Bacillus subtilis* SK1 [3, 4]. Отмеченные изменения морфологии и метаболизма клеток бациллы характерны для промежуточной стадии между вегетативными клетками и некультивируемым состоянием бактерий [5, 6]. Таким образом, очевидно, что токсический стресс, вызванный высокими концентрациями ТНТ, способствовал переходу *B. subtilis* SK1 в состояние, переходное между вегетативными и некультивируемыми клетками. Однако не были получены доказательства перехода вегетативных клеток бациллы в некультивируемое состояние. Решение этого вопроса представляет не только теоретический, но и, принимая во внимание загрязненность ТНТ больших территорий [7], практический интерес. Нельзя не согласиться с тем, что проблема загрязненностью ТНТ имеет также непосредственное

отношение к экологии почв [8], в том числе из-за влияния ксенобиотика на спорообразующее микробное население и биологическую активность почв.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования – оценить возможность перехода клеток *B. subtilis* SK1 к спорообразованию и (или) в некультивируемое состояние в присутствии ТНТ.

### 1. Материалы и методы

Объектом исследования служил штамм *Bacillus subtilis* SK1, выделенный из почв, загрязненных ТНТ.

Беспоровый инокулят вносили в 0.5%-ный раствор NaCl с ТНТ (0.2 г/л) до конечной концентрации  $2.3 \cdot 10^7$  клеток/мл. Инкубирование вели в колбах на 250 мл в условиях принудительной аэрации на качалке при 120 об/мин. О росте культуры судили по изменению общего количества клеток, рассчитанных с использованием счетной камеры Тома – Горяева.

Для определения способности клеток к колониеобразованию (КОЕ) клеточную суспензию в соответствующем разведении высевали в 5–7-кратной повторности на чашки Петри с агаризованной мясопептонной средой (МПА), которые инкубировали при 28 °С в течение 3 сут, контролируя появление колоний каждые 24 ч. Подсчет колоний производили в вариантах разведений, дающих не более 80 колоний на чашке. Данные выражали в виде средних величин с расчетом среднеквадратичных отклонений.

Константу скорости отмирания рассчитывали по кривой общего количества клеток, константу скорости снижения КОЕ – по кривой колониеобразующих единиц.

Споры определяли путем их окрашивания по Шеферу – Фултону [9], а также прогреванием культуры (с целью гибели вегетативных клеток) в кипящей водяной бане 10 мин и последующим высевом на МПА + сусло-агар (1 : 1). Количество выросших на МПА колоний соответствовало количеству спор в пробе.

Принимая во внимание то, что налидиксовая кислота ингибирует гиразу *Bacillus subtilis*, а это приводит к увеличению размеров клеток [10, 11], для определения числа живых (культивируемых) и жизнеспособных, но некультивируемых клеток использовали тест Когуре [12].

Количество клеток с поврежденной мембраной (мертвых клеток) оценивали методом окрашивания пропидий йодидом. Пропидий йодид добавляли к клеточной суспензии до конечной концентрации 2.9 мкМ. После 10-минутной инкубации образцы центрифугировали и дважды отмывали 0.9%-ным раствором NaCl. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре SIGNE-4M при ширине щели 10 нм в канале возбуждения 495 нм и в канале эмиссии 615 нм. Результаты нормировали по оптической плотности при 680 нм и выражали в процентах относительно пробы, взятой в качестве контроля [13].

Для определения ТНТ использовали метод капиллярного электрофореза с использованием анализатора «Капель-105» (фирма «Льюэкс», г. Санкт-Петербург), оснащенного капилляром из плавленого кварца с внутренним диаметром 75 мкм, эффективной длиной 500 мм при общей длине 600 мм. Объем образца 1 мкл. Измерения проводились при длине волны 230 нм и температуре капилляра

20 °С, ведущий электролит (подвижная фаза): 10 мМ тетрабората натрия + 40 мМ додецилсульфата натрия. Концентрацию ТНТ рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов ТНТ в диапазоне концентраций 1–200 мг/л.

В работе все эксперименты были проведены не менее чем в пяти повторностях. Данные на графиках и в таблице представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение

## 2. Результаты

Как уже отмечалось ранее, ТНТ подавляет потребление глюкозы клетками *B. subtilis* SK1. Поэтому чтобы клетки, находящиеся в контакте с ксенобиотиком («ТНТ-клетки»), были в равных условиях с клетками, инкубируемыми без ТНТ (контрольные), в качестве среды инкубирования использовали 0.5%-ный раствор NaCl.

Как видно из рис. 1, общее число клеток в первую неделю инкубирования *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl достоверно не изменялось. Снижение общего количества клеток в 2 раза наблюдалось с 9-х суток. К 19-м суткам оно уменьшилось на порядок и затем достоверно не изменялось вплоть до конца эксперимента. Снижение общего количества клеток сопровождалось и уменьшением количества колониеобразующих единиц. С 12-х суток инкубирования обнаруживались споры, количество которых начинало возрастать, и к 34-м суткам они составляли  $(38 \pm 2)\%$  от общего количества клеток.

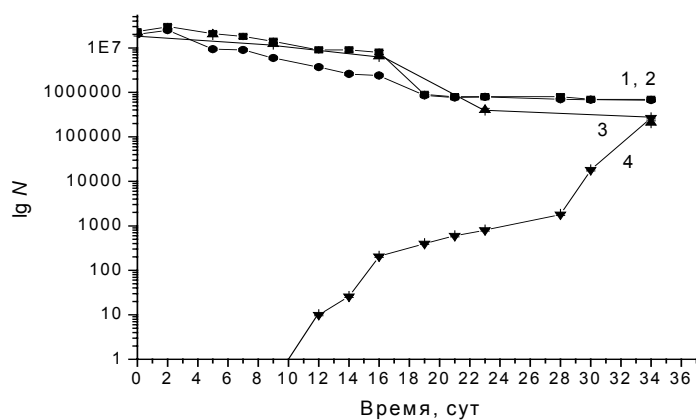


Рис. 1. Изменение общего числа клеток (1), количества колониеобразующих единиц (2), числа отзывчивых (крупных) клеток в тесте Когуре (3) и количества спор (4), рассчитанных по количеству КОЕ после термообработки суспензии клеток при инкубировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl

Таким образом, при инкубировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl часть клеточной популяции сохраняла свою жизнеспособность и переходила к спорообразованию.

Следующий этап нашей работы заключался в проверке влияния ТНТ на клетки *B. subtilis* SK1, инкубируемые в 0.5%-ном NaCl. Штамм *B. subtilis* SK1 оказался неспособным элиминировать ТНТ из среды инкубирования (рис. 2).

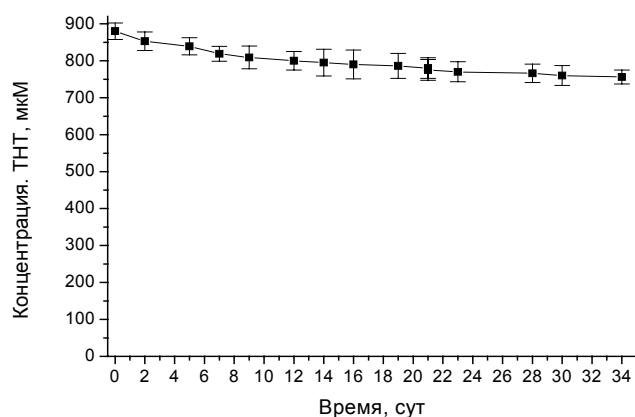


Рис. 2. Динамика элиминации ТНТ из среды при инкубировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl с добавлением 200 мг/л ксенобиотика

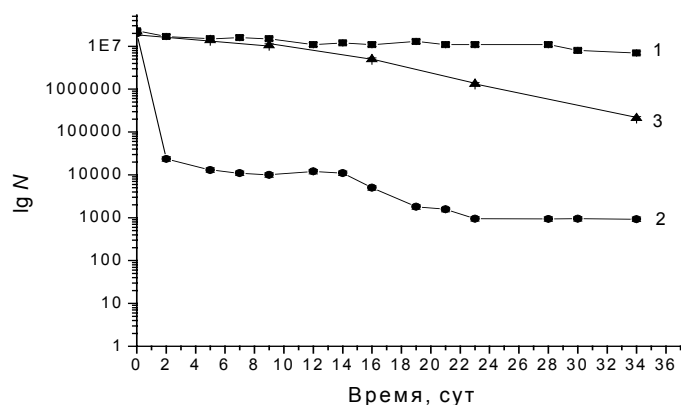


Рис. 3. Изменение общего количества клеток (1), количества колониеобразующих единиц (2) и числа отзывчивых (крупных) клеток в тесте Когура (3) при инкубировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl в присутствии ТНТ (200 мг/л)

На 34-е сутки инкубирования концентрация ксенобиотика снизилась в среднем на  $(15 \pm 3)\%$ , в отличие от  $(46 \pm 5)\%$ -ной элиминации на 48-й час культивирования при росте *B. subtilis* SK1 на синтетической среде с глюкозой и аммонийным азотом, о которой сообщалось ранее [3].

В отличие от клеток, инкубированных в 0.5%-ном растворе NaCl, внесение в среду ТНТ не вызывало резкого снижения общего количества клеток вплоть до конца эксперимента (рис. 3). Константа скорости лизиса «ТНТ-клеток» в 2 раза ниже, чем у клеток контрольного варианта, и составляла  $0.001096 \pm 0.000077 \text{ ч}^{-1}$ , (у клеток, инкубированных в 0.5%-ном растворе NaCl без ксенобиотика, —  $0.002237 \pm 0.000134 \text{ ч}^{-1}$ ). Вероятнее всего, ТНТ, подавляя метаболическую активность клеток *B. subtilis* SK1, репрессирует спорообразование. На протяжении всего времени эксперимента мы не наблюдали спор как при окрашивании препаратов по Шеферу – Фултону, так и высевая прогретые клетки на МПА с суло-агаром. Так же, как и клетки контрольного варианта, «ТНТ-клетки» уменьшались в размере, однако они почти полностью утрачивали свою подвижность и совершали лишь колебательные движения.

Табл. 1

Количество жизнеспособных (тест Когуре) и мертвых (PI-проницаемых) клеток при культивировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl с добавлением ТНТ в концентрации 200 мг/л

Время, сут	Крупные (жизнеспособные) клетки, %		PI-проницаемые (мертвые) клетки, %	
	Контрольные	«ТНТ-клетки»	Контрольные	«ТНТ-клетки»
5	92 ± 7	90 ± 9	5 ± 1	6 ± 1
9	89 ± 4	69 ± 7	13 ± 3	25 ± 5
16	80 ± 8	39 ± 6	19 ± 5	53 ± 7
23	63 ± 9	12 ± 4	50 ± 10	85 ± 3
34	27 ± 3	3 ± 1	76 ± 5	96 ± 4

Несмотря на то что общее число «ТНТ-клеток» снижалось незначительно на протяжении всего времени инкубирования, количество колониеобразующих единиц уменьшилось на 2 порядка уже на 2-е сутки, составляя 0.12% от исходного количества КОЕ, и продолжало медленно снижаться до конца эксперимента. Это свидетельствует о том, что в присутствии ТНТ популяция клеток *B. subtilis* SK1 гетерогенна и делится на две субпопуляции, различающиеся между собой чувствительностью к ТНТ и константами скорости снижения КОЕ. Первая субпопуляция характеризуется высокой константой скорости снижения КОЕ –  $0.1406 \pm 0.0141 \text{ ч}^{-1}$ , константа скорости второй субпопуляции, наличие которой определяется после 2 сут, значительно ниже –  $0.00486 \pm 0.000291 \text{ ч}^{-1}$ . Высокая константа скорости снижения КОЕ первой субпопуляции может быть связана как с гибелью клеток *B. subtilis* SK1, так и с их переходом в некультивируемое состояние. Чтобы исключить первое предположение (возможную гибель клеток вследствие контакта с ксенобиотиком), нами был поставлен тест Когуре и проведено окрашивание клеток пропидий йодидом – красителем, окрашивающим мертвые клетки [14]. Как видно из табл. 1, на 5-е сутки около 90% клеток после 6 ч инкубирования с дрожжевым экстрактом и налидиксовой кислотой увеличилось в размерах. При этом клетки, проницаемые для пропидий йодида (PI-проницаемые), составляли лишь 5–7%. Следовательно, первую субпопуляцию клеток составляли жизнеспособные, но некультивируемые клетки. Рассчитанную же нами константу скорости снижения КОЕ, принимая во внимание незначительное количество мертвых клеток, можно считать константой скорости перехода клеток *B. subtilis* SK1 в некультивируемое состояние.

На 9-е и 16-е сутки количество крупных (жизнеспособных) клеток уменьшалось на 30% и 60% соответственно. Параллельно с уменьшением количества живых и жизнеспособных клеток наблюдалось увеличение количества мертвых клеток. На 34-е сутки инкубирования 95–99% клеток опытного варианта составляли мертвые клетки.

Сравнивая константы скорости снижения КОЕ «ТНТ-клеток» второй субпопуляции ( $0.004860 \pm 0.000291 \text{ ч}^{-1}$ ) и клеток контрольного варианта ( $0.004732 \pm 0.000189 \text{ ч}^{-1}$ ) видно, что они достоверно не отличаются друг от друга ( $P < 0.05$ ). Таким образом, вторая субпопуляция «ТНТ-клеток» представлена клетками менее чувствительными к токсическому действию ксенобиотика, но у которых, тем не менее, подавлен механизм спорообразования.

### Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при инкубировании *B. subtilis* SK1 в 0.5%-ном растворе NaCl и ТНТ ксенобиотик репрессирует спорообразование культуры. Токсическое действие проявляется в разделении популяции «ТНТ-клеток» на две субпопуляции, одна из которых, оказавшись более чувствительной к ТНТ, переходит в некультивируемое состояние. Сравнивая константу скорости перехода клеток в некультивируемое состояние ( $0.1406 \pm 0.0141 \text{ ч}^{-1}$ ) с константой скорости спорообразования ( $0.0155 \pm 0.0009 \text{ ч}^{-1}$ ), видно, что спорообразование *B. subtilis* SK1 идет значительно медленнее, чем переход в некультивируемое состояние. Известно, что для обеспечения спорообразования клеток *B. subtilis* требуется активация большого количества генов. Если учесть это обстоятельство, а также факт снижения метаболической активности бактериальных клеток, находящихся в контакте с ТНТ [3, 15, 16], то очевидно, что в данных условиях процесс перехода в некультивируемое состояние требует от клетки меньших энергетических затрат, чем спорообразование. Возникает соблазн предположить, что поэтому для выживания в условиях токсического стресса, вызванного наличием в среде инкубирования ТНТ, *B. subtilis* SK1 «выбирает» путь перехода в некультивируемое состояние, а не спорообразование. Однако увеличение количества мертвых клеток начиная с 9-х суток инкубирования дает нам основание предположить, что в основе физиолого-биохимических механизмов некультивируемого состояния «ТНТ-клеток» в условиях комбинированного голодного и токсического стресса лежат дегенеративные процессы, приводящие в конечном итоге к гибели всей клеточной популяции.

Таким образом, переход клеток *B. subtilis* SK1 в присутствии ТНТ в некультивируемое, но жизнеспособное состояние не может являться альтернативой спорообразованию с точки зрения сохранения вида. Это дает основание расценивать такое состояние клеток *B. subtilis* SK1 как сукцессию к гибели. Полученные данные, а также продемонстрированная нами ранее сукцессия к гибели *Acinetobacter lwoffii* [17] и *Escherichia coli* [18] позволяют высказать вполне обоснованное опасение, что в почвах, содержащих остатки взрывчатых смесей, возможно нарушение экологического равновесия.

### Литература

1. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Бабусенко Е.С., Козлова А.Н., Дужа М.В., Митюшина Л.А., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм в автолизующихся суспензиях микроорганизмов // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 42–49.
2. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.Б., Климанова Е.В., Эль-Регистан Г.И. Характеристика диссоциантов *Bacillus cereus* // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 811–819.
3. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Влияние токсических концентраций 2,4,6-тринитротолуола на физические свойства и морфологию клеток *Bacillus subtilis* SK1 // Прикл. биохимия и микробиол. – 2003. – Т. 39, № 2. – С. 194–198.

4. Куриненко Б.М., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Абреимова Ю.В. Особенности токсического эффекта 2,4,6-тринитротолуола в отношении *Bacillus subtilis* SK1 // Прикл. биохимия и микробиол. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 313–317.
5. Гинцбург А.Л., Литвин В.Ю., Пушкарева В.И., Романова Ю.М. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы // Вестн. РАМН. – 2000. – № 1. – С. 7–13.
6. Соколенко А.В., Каграманов В.С., Асеева Л.Е., Буриша О.С., Саямов С.Р. Морфология и ферментативная активность некультивируемых форм холерных вибрионов // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2002. – № 5. – С. 15–21.
7. Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L. Bioremediation of soils contaminated with explosives // J. Environ. Manage. – 2004. – V. 70, No 4. – P. 291–307.
8. Travis E.R., Bruce N.C., Rosser S.J. Microbial and plant ecology of a long-term TNT-contaminated site // Environ. Pollut. – 2008. – V. 153, No 1. – P. 119–126.
9. Методы общей бактериологии: в 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
10. Sugino A., Bott K.F. *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid gyrase // J. Bacteriol. – 1980. – V. 141, No 3. – P. 1331–1339.
11. Alonso J.C., Sarachu A.N., Grau O. DNA gyrase inhibitors block development of *Bacillus subtilis* bacteriophage SP01 // J. Virol. – 1981. – V. 39, No 3. – P. 855–860.
12. Kogure K., Simudu U., Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25, No 3. – P. 415–420.
13. Benito A., Ventoura G., Casadei M., Robinson T., Mackey B. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, No 4. – P. 1564–1569.
14. Herrera G., Martinez A., Blanco M., O'Connor J.-E. Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function // Cytometry. – 2002. – V. 49, No 2. – P. 62–69.
15. Куриненко Б.М., Дениварова Н.А., Давыдов Р.Э., Яковлева Г.Ю. Особенности токсического действия 2,4,6-тринитротолуола в отношении *Escherichia coli* K12 // Прикл. биохимия и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 1. – С. 59–64.
16. Черепнев Г.В., Велижнская Т.А., Яковлева Г.Ю., Дениварова Н.А., Куриненко Б.М. Оценка токсического действия 2,4,6-тринитротолуола на клетки *Escherichia coli* K12 методом проточной цитофлуориметрии // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 3. – С. 377–382.
17. Костычева Ю.Ф., Давыдов Р.Э., Куриненко Б.М. Индукция некультивируемого состояния клеток *Acinetobacter lwoffii* ЖК 2,4,6-тринитротолуолом // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 3. – С. 99–110.
18. Яковлева Г.Ю., Давыдов Р.Э., Куриненко Б.М. Индукция некультивируемого состояния *Escherichia coli* K12 2,4,6-тринитротолуолом // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 5. – С. 598–602.

Поступила в редакцию  
15.04.13

---

**Яковлева Галина Юрьевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.  
E-mail: [Yakovleva\\_Galina@mail.ru](mailto:Yakovleva_Galina@mail.ru)

**Захарова Наталия Георгиевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

**Давыдов Рустам Энверович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *dvdv@ksu.ru*

**Куриненко Борис Михайлович** – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Boris.Kurinenko@ksu.ru*

\* \* \*

**SUPPRESSION OF SPORULATION AND TRANSITION OF  
*Bacillus subtilis* SK1 CELLS IN VIABLE BUT UNCULTURABLE STATE  
UNDER THE INFLUENCE OF 2,4,6-TRINITROTOLUENE**

*G.Yu. Yakovleva, N.G. Zakharova, R.E. Davydov, B.M. Kurinenko*

**Abstract**

It has been established that in the absence of exogenous sources (incubation in 0.5% NaCl solution), a part of the cell population of *Bacillus subtilis* SK1 maintains its vitality and passes on to sporulation. The presence of 2,4,6-trinitrotoluene in the environment of incubation leads to the repression of sporulation. Another part of the cell population turns into viable but unculturable state. From the point of view of the conservation of the species in the conditions of combined toxic and hungry stress, such transition cannot be considered as an alternative to sporulation.

**Keywords:** 2,4,6-trinitrotoluene, toxicity, repression of sporulation, *Bacillus subtilis*, unculturable state, succession to death.

**References**

1. Mulyukin A.L., Lusta K.A., Gryaznova M.N., Babusenko E.S., Kozlova A.N., Duzha M.V., Mityushina L.A., Duda V.I., El-Registan G.I. Formation of resting cells in microbial suspensions undergoing autolysis. *Microbiology*, 1997, vol. 66, no. 1, pp. 32–38.
2. Doroshenko E.V., Loiko N.G., Ilinskaya O.N., Kolpakov A.I., Gornova I.B., Klimanova E.V., El-Registan G.I. Characterization of *Bacillus cereus* dissociants. *Microbiology*, 2001, vol. 70, no. 6, pp. 698–705.
3. Kurinenko B.M., Yakovleva G.Yu., Denivarova N.A., Abreimova Yu.V. Effect of toxic concentrations of 2,4,6-trinitrotoluene on the physical properties and morphology of *Bacillus subtilis* SK1 cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, vol. 39, no. 2, pp. 171–174.
4. Kurinenko B.M., Yakovleva G.Yu., Denivarova N.A., Abreimova Yu.V. Specific toxic effects of 2,4,6-trinitrotoluene on *Bacillus subtilis* SK1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, vol. 39, no. 3, pp. 275–278.
5. Gintsburg A.L., Litvin V.Yu., Pushkareva V.I., Romanova Yu.M. Reversible transition of pathogenic bacteria in the resting (uncultured) state: ecological and genetic mechanisms. *Vestn. Ross. Akad. Med. Sci.*, 2000, no. 1, pp. 7–13. (In Russian)
6. Sokolenko A.V., Kagramanov V.S., Aseeva L.E., Bursha O.S., Sayamov S.R. Morphology and enzymatic activity of the uncultivated forms of *Vibrio cholera*. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2002, no. 5, pp. 15–21. (In Russian)
7. Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L. Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J. Environ. Manage.*, 2004, vol. 70, no. 4, pp. 291–307.
8. Travis E.R., Bruce N.C., Rosser S.J. Microbial and plant ecology of long-term TNT-contaminated site. *Environ. Pollut.*, 2008, vol. 153, no. 1, pp. 119–126.
9. Methods of General Bacteriology: In 3 vols. (ed. by Ph. Gerhardt). Moscow, Mir, 1983, vol. 1. 536 p. (In Russian)
10. Sugino A., Bott K.F. *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.*, 1980, vol. 141, no. 3, pp. 1331–1339.



11. Alonso J.C., Sarachu A.N., Grau O. DNA gyrase inhibitors block development of *Bacillus subtilis* bacteriophage SP01. *J. Virol.*, 1981, vol. 39, no. 3, pp. 855–860.
12. Kogure K., Simudu U., Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 1979, vol. 25, no. 3, pp. 415–420.
13. Benito A., Ventoura G., Casadei M., Robinson T., Mackey B. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 4, pp. 1564–1569.
14. Herrera G., Martinez A., Blanco M., O'Connor J.-E. Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function. *Cytometry*, 2002, vol. 49, no. 2, pp. 62–69.
15. Kurinenko B.M., Denivarova N.A., Davydov R.E., Yakovleva G.Yu. Features of the toxic action of 2,4,6-trinitrotoluene on *Escherichia coli* K12. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, vol. 43, no. 1, pp. 52–56.
16. Cherepnev G.V., Velizhinskaya T.A., Yakovleva G.Yu., Denivarova N.A., Kurinenko B.M. Assessing the toxic effect of 2,4,6-trinitrotoluene on cells of *Escherichia coli* K12 by flow cytometry. *Microbiology*, 2007, vol. 76, no. 3, pp. 331–335.
17. Kostycheva Yu.F., Davydov R.E., Kurinenko B.M. Induction of viable but non-culturable state of *Acinetobacter lwoffii* JK cells by 2,4,6-trinitrotoluene. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2005, vol. 147, no. 3, pp. 99–110. (In Russian)
18. Yakovleva G.Yu., Davydov R.E., Kurinenko B.M. Induction of the unculturable state in *Escherichia coli* K12 with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology*, 2008, vol. 77, no. 5, pp. 530–533.

Received  
April 15, 2013

---

**Yakovleva Galina Yurevna** – PhD in Biology, Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Yakovleva\\_Galina@mail.ru](mailto:Yakovleva_Galina@mail.ru)

**Zakharova Nataliya Georgievna** – PhD in Biology, Associate Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

**Davydov Rustam Enverovich** – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [dvdv@ksu.ru](mailto:dvdv@ksu.ru)

**Kurinenko Boris Mikhailovich** – Doctor of Biology, Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: [Boris.Kurinenko@ksu.ru](mailto:Boris.Kurinenko@ksu.ru)