

УДК 579.861:576.8

О. С. ИГНАТОВЕЦ, Т. И. АХРАМОВИЧ, Е. В. ФЕСЬКОВА, В. Н. ЛЕОНТЬЕВ

МЕХАНИЗМ ДЕГРАДАЦИИ СИМАЗИНА БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

(Представлено академиком Л. В. Хотылевой)

Белорусский государственный технологический университет, Минск

Поступило 27. 07.2006

**Введение.** Наиболее распространенными гербицидами в сельском хозяйстве являются соединения, имеющие в своей структуре азотсодержащие гетероциклические ядра. К ним относится группа симм-триазиновых гербицидов, состоящая из симазина, прометрина и атразина. К деградации триазиновых гербицидов способны очень многие микроорганизмы, как бактерии, так и мицелиальные грибы, особенно часто упоминаются *Aspergillus* и *Penicillium* [1]. Однако следует отметить недостаток имеющихся в литературе данных о бактериальном разложении триазинов. Учитывая вышесказанное, а также тот факт, что бактерии рода *Pseudomonas* являются одними из основных почвенных бактерий, изучена возможность деградации ими галогенсодержащего триазина – симазина.

Ранее нами проведены работы по исследованию деградации симм-триазиновых гербицидов бактериями *Pseudomonas aeruginosa* В-7 и *Pseudomonas aurantica* В-162 [2]. Было отмечено возможное участие в деградации этих соединений основного компонента монооксигеназной ферментной системы бактерий – цитохрома Р450. Как известно из литературных источников, первой стадией трансформации или деградации галогенсодержащих ароматических соединений является их дегалогенирование [3]. В связи с этим, на первом этапе настоящей работы был разработан метод определения дегалогеназной активности бактерий рода *Pseudomonas*.

**Материалы и методы.** Среди 62 штаммов бактерий рода *Pseudomonas* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ отобраны два штамма бактерий *Pseudomonas fluorescens* В-22 и *Pseudomonas aeruginosa* РА01, наиболее эффективно растущие на средах с симaziном, использующие его в качестве единственного источника углерода и энергии. Для выбранных штаммов известны активности основных оксидоредуктаз и определено содержание цитохромов b5 и Р450 [4].

Симазин выделен из технического препарата экстракцией горячим ацетоном. Полученный таким образом симазин представлял собой белый мелко кристаллический порошок с  $T_{пл}$  224–225 °С.

Для исследования кинетики роста бактерий отобранных штаммов на среде, содержащей симазин, ночную культуру бактерий *P. aeruginosa* РА01, *P. fluorescens* В-22, разводили синтетической средой с различными источниками углерода и инкубировали при 30 °С в условиях аэрации до достижения культурой стационарной фазы роста. В качестве источников углерода использовали глюкозу, симазин, или симазин вместе с глюкозой (условия кометаболизма). Изменение концентрации клеток бактерий в процессе их роста определяли по изменению экстинкции клеточной суспензии при  $\lambda = 580$  нм.

Количественное определение белка в суспензии бактерий проводили по методу Варбурга и Христиана [5].

**Изучение процесса дехлорирования симазина.** Бактерии культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл при 30 °С в течение 8 ч в 50 мл синтетической среды с гербицидом, содержащей  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,2%;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,5%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,15%;  $\text{MgSO}_4$  – 0,02%; симазин – 0,1%; pH 7,0. Клетки отделяли центрифугированием, отмывали трижды 0,85%-ным раствором  $\text{KNO}_3$ , дезинтеграцию проводили на установке УЗДН 2Т (44 кГц) в течение 90 с (3 раза по 30 с с интервалом 1 мин). Объем полученной суспензии дезинтегрированных клеток доводили до 20 мл 0,85%-ным раствором  $\text{KNO}_3$ . Затем вносили симазин в количестве 0,005М и с помощью иономера лабораторного И-160,



оснащенного хлорселективным электродом, измеряли изменение концентрации  $\text{Cl}^-$ -ионов во времени. Для построения калибровочного графика готовили стандартные растворы  $\text{KCl}$  с концентрациями в моль/л  $1 \times 10^{-3}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $1 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-5}$ ;  $1 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-6}$ . График зависимости ЭДС от концентрации  $\text{Cl}^-$ -ионов был линейным во всем интервале концентраций.

**Анализ продуктов деградации симазина.** Накопленную биомассу ресуспендировали в синтетической среде с симазиним, в качестве единственного источника углерода, и инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в условиях аэрации ( $180 \text{ мин}^{-1}$ ) в течение 80 ч на установке УВМТ 12-250. Пробы культуральной жидкости объемом 5 мл отбирали через 1, 24, 44, 64, и 80 ч с начала ферментации с соблюдением правил асептики. Биомассу отделяли центрифугированием ( $7000 \text{ мин}^{-1}$ , 5 мин) на центрифуге MPW-310, супернатант подвергали экстракции равным объемом диэтилового эфира, эфирный слой отделяли и упаривали при атмосферном давлении и комнатной температуре. Непосредственно перед анализом пробы растворяли в 1 мл метанола, который использовали в качестве подвижной фазы. Анализ продуктов деградации симазина выбранными штаммами бактерий проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Waters», оснащенный масс-детектором «Micromass ZQ-2000», на колонке NYPERSIL  $\text{C}_{18}$  длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм. Элюирование проводили при скорости подвижной фазы 0,7 мл/мин. Хроматограммы регистрировали диодно-матричным детектором и масс-детектором с электроспреей ионизацией (ESI).

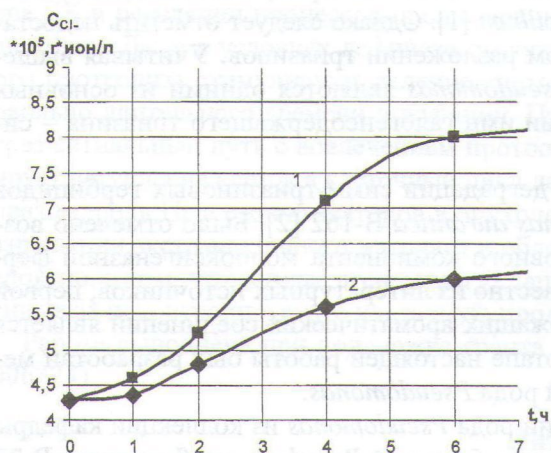


Рис 1. Кинетические кривые дегалогенирования симазина 1 – *P. fluorescens* B-22; 2 – *P. aeruginosa* PAO1

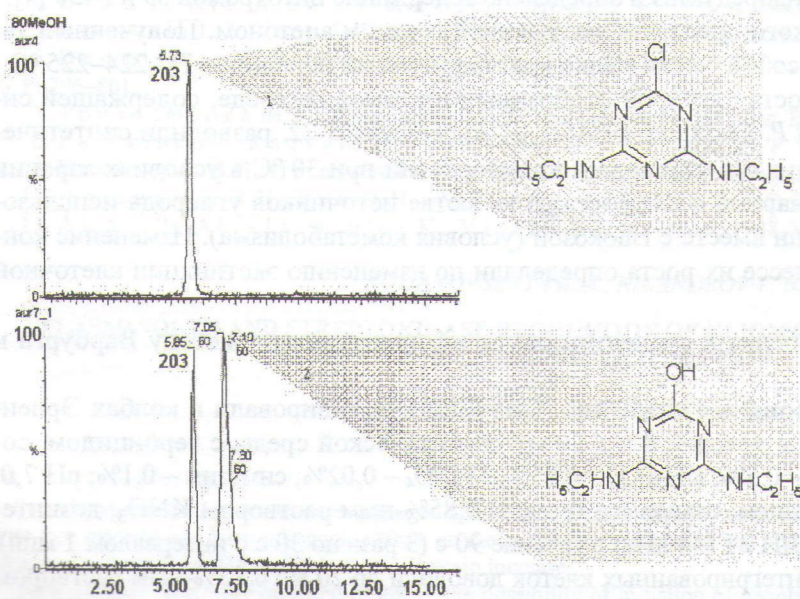


Рис 2. Хроматограммы симазина и его гидроксипроизводного

**Результаты и их обсуждение.** При изучении кинетики роста бактерий отобранных штаммов на среде, содержащей различные источники углерода и энергии, были получены кривые роста, которые свидетельствуют о высокой скорости роста штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в условиях кометаболизма. Вместе с тем штамм *Pseudomonas fluorescens* B-22 имел более интенсивный рост на среде с симазиним в качестве единственного источника углерода по сравнению с *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

На рис. 1 представлены кинетические кривые дегалогенирования симазина ферментными системами бактерий *Pseudomonas fluorescens* B-22 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Из рисунка видно, что кривые имеют S-образный характер. В связи с этим вычисляли начальные и максимальные скорости дегалогенирования ( $\text{г-ионов/мг белка} \times \text{мин} \times 10^{10}$ ), которые для *Pseudomonas fluorescens* B-22 составили 9,1 и 26, а для *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 0,86 и 7,76 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой дегалогеназной активности у штамма *Pseudomonas fluorescens* B-22. Ранее мы отмечали [4], что для данного штамма характерны более высокие активности оксидоредуктаз, содержание цитохромов P450 и b<sub>5</sub> при эпоксирировании олефинов. Полученные экспериментальные данные позволили нам предположить, что дегалогенирование протекает по окисли-



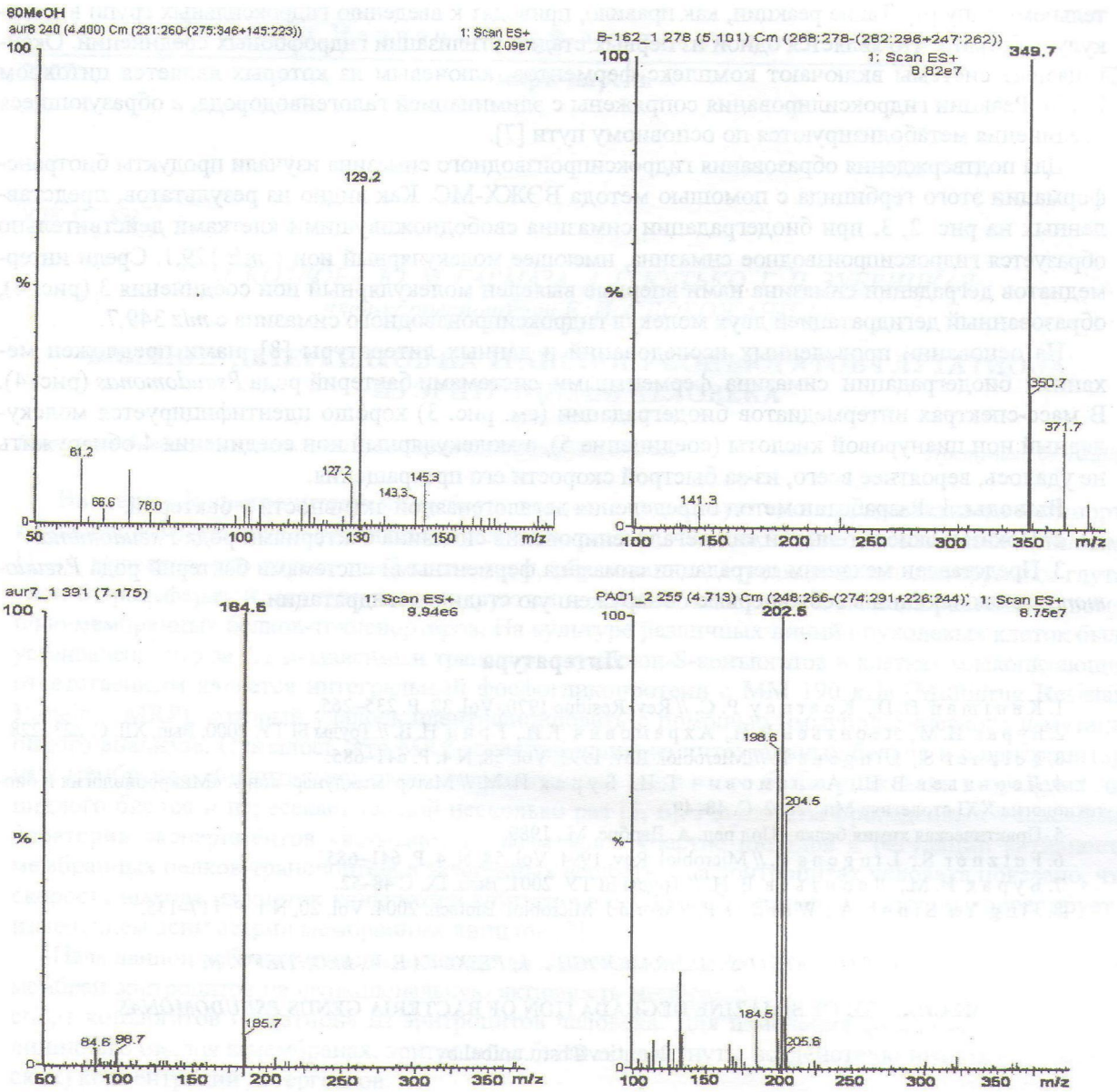


Рис. 3. Масс-спектры интермедиатов биодegradации симазина

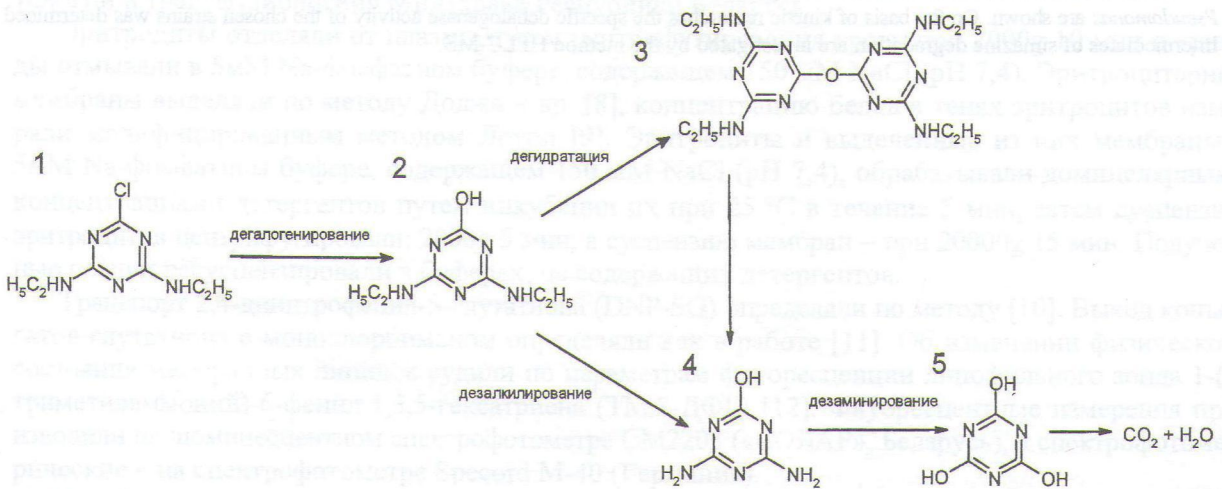


Рис. 4. Механизм деградации симазина ферментными системами бактерий рода *Pseudomonas*



тельному типу [6]. Такие реакции, как правило, приводят к введению гидроксильных групп в молекулу субстрата, что является одной из первых стадий утилизации гидрофобных соединений. Оксигеназные системы включают комплекс ферментов, ключевым из которых является цитохром Р-450. Реакции гидроксирования сопряжены с элиминацией галогенводорода, а образующиеся соединения метаболизируются по основному пути [7].

Для подтверждения образования гидроксипроизводного симазина изучали продукты биотрансформации этого гербицида с помощью метода ВЭЖХ-МС. Как видно из результатов, представленных на рис. 2, 3, при биодegradации симазина свободноживущими клетками действительно образуется гидроксипроизводное симазина, имеющее молекулярный ион с  $m/z$  129,1. Среди интермедиатов деградации симазина нами впервые выявлен молекулярный ион соединения 3 (рис. 4), образованный дегидратацией двух молекул гидроксипроизводного симазина с  $m/z$  349,7.

На основании проведенных исследований и данных литературы [8], нами предложен механизм биодegradации симазина ферментными системами бактерий рода *Pseudomonas* (рис. 4). В масс-спектрах интермедиатов биодegradации (см. рис. 3) хорошо идентифицируется молекулярный ион циануровой кислоты (соединение 5), а молекулярный ион соединения 4 обнаружить не удалось, вероятнее всего, из-за быстрой скорости его превращения.

**Выводы.** 1. Разработан метод определения дегалогеназной активности у бактерий.

2. Показан окислительный тип дегалогенирования симазина бактериями рода *Pseudomonas*.

3. Представлен механизм деградации симазина ферментными системами бактерий рода *Pseudomonas*, включающий в себя впервые обнаруженную стадию дегидратации.

### Литература

1. Kaufman D. D., Kearney P. C. // Rev. Residue 1970. Vol. 32. P. 235–265.
2. Бурак И. М., Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И., Гриц Н. В. // Труды БГТУ. 2000. Вып. XII. С. 223–228.
3. Fetzner S., Lingens F. // Microbiol. Rev. 1994. Vol. 58, N 4. P. 641–685.
4. Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И., Бурак И. М. // Матер. междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» Мн., 2002. С. 48–49.
5. Практическая химия белка / Под ред. А. Дарбре. М., 1989.
6. Fetzner S., Lingens F. // Microbiol. Rev. 1994. Vol. 58, N. 4. P. 641–685.
7. Бурак И. М., Леонтьев В. Н. // Труды БГТУ. 2001. Вып. IX. С. 48–52.
8. Jing Ye, Singh A., Ward O. P. // World J. Microbiol. Biotech. 2004. Vol. 20, N 1. P. 117–135.

IGNATOVETS O. S., AKHRAMOVICH T. I., FESKOVA E. V., LEONTIEV V. N.

### MECHANISM OF SIMAZINE DEGRADATION OF BACTERIA GENUS *PSEUDOMONAS*

leontiev@bstu.unibel.by

### Summary

In the article the results of research on degradation of s-triazines herbicide - simazine by ferment systems of bacteria genus *Pseudomonas* are shown. On the basis of kinetic researches the specific dehalogenase activity of the chosen strains was determined. Intermediates of simazine degradation are investigated by the method HPLC-MS.