

Предварительно выращенные до максимальной концентрации биомассы на синтетической среде с глюкозой и тщательно отмытые от ростовой среды клетки бактерий *P.aeruginosa* PAO1 и *P.fluorescens* B-22 для активации монооксигеназной ферментной системы переносили в синтетическую среду с нонаном в качестве единственного источника углерода и энергии и предынкубировали в условиях аэрации до достижения культурой середины логарифмической фазы роста. Биомассу отделяли, промывали, переносили в безазотную среду с ноненом-4 (концентрация в среде 0,05%) в качестве субстрата и проводили эпоксицирование нонена-4 в условиях аэрации в течение 24 ч. Эфирные экстракты культуральной жидкости анализировали методом ГЖХ. В качестве маркера использовали химически синтезированный 4,5-эпоксинонан [3]. На рис. 2 представлены хроматограммы экстрактов культуральной жидкости бактерий *P.aeruginosa* PAO1 и *P.fluorescens* B-22 после 24 ч окисления ими нонена-4.

Как видно из рис. 2, транс-изомер нонена-4 не подвергается окислению клетками бактерий обоих видов, а пик, соответствующий цис-изомеру нонена-4, полностью отсутствует на хроматограмме. Как и следовало полагать, химически более активная двойная связь цис-изомера нонена-4 легче подвергается окислению.

Доказательством того, что микробиологическое окисление цис-изомера нонена-4 приводит к образованию 4,5-эпоксинонана, служат результаты, представленные на рис. 3. Идентификацию хроматографического пика 4,5-эпоксинонана, полученного окислением нонена-4 бактериями *P.fluorescens* B-22, проводили методом присадки с использованием химически синтезированного эпоксида.

Таким образом, проведенные исследования показали, что монооксигеназные ферментные системы бактерий *P.aeruginosa* PAO1 и *P.fluorescens* B-22 высокоспецифично эпоксицируют цис-изомер нонена-4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрамович Т.И., Гриц Н.В., Леонтьев В.Н. Микробиологический синтез 4,5-эпоксинонана // Труды БГТУ. Вып.8. – 2000. – С.219-222.
2. Patel R.N., Hou C.T., Laskin A.I. e.a. Epoxidation of alkenes and hydroxylation of alkanes by soluble methane monooxygenase: regeneration of cofactor NADH // J.Appl.Biochem. – 1982. – V.4. - № 2. – P.175-184.
3. Besse P., Sokoltchik T., Veschambre H. Chemoenzymatic synthesis of α -halogeno-3-octanol and 4- or 5-nonanol. Application to the preparation of chiral epoxydes // Tetrahedron: Asymmetry. – 1998. – V.9. – P.4441-4457.

УДК 579.861:576.8

И.М. Бурак, аспирант; В.Н. Леонтьев, доцент

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДЕГАЛОГЕНАЗ В БИОДЕГРАДАЦИИ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ КСЕНОБИОТИКОВ

The role of bacterial dehalogenases in a biodegradation of halogenated organic compounds (mainly pesticides) discussed in this article. Dehalogenation is one in the first and important steps of process biodegradation.

Галогенсодержащие органические соединения составляют одну из наиболее распространенных групп загрязнителей окружающей среды. Они широко используются в сельском хозяйстве в качестве пестицидов, в химической промышленности в качестве

растворителей и мономеров для органического синтеза, а также при производстве некоторых лекарственных препаратов. Высокая токсичность, устойчивость к химическому и биологическому разложению галогенсодержащих органических соединений позволяют назвать проблему загрязнения ими биосферы одной из важнейших экологических проблем современности.

Основная роль в детоксикации попавших в окружающую среду галогенированных ксенобиотиков принадлежит микроорганизмам, в частности бактериям. В большинстве случаев элиминирование атома галогена из молекулы субстрата обусловлено наличием у бактерий специфических ферментов – дегалогеназ, и лишь иногда реакция дегалогенирования протекает спонтанно, в случае образования неустойчивого интермедиата по одному из основных метаболических путей.

В настоящее время известно семь путей ферментативного дегалогенирования ксенобиотиков [1], которые представлены схематично на рисунке.

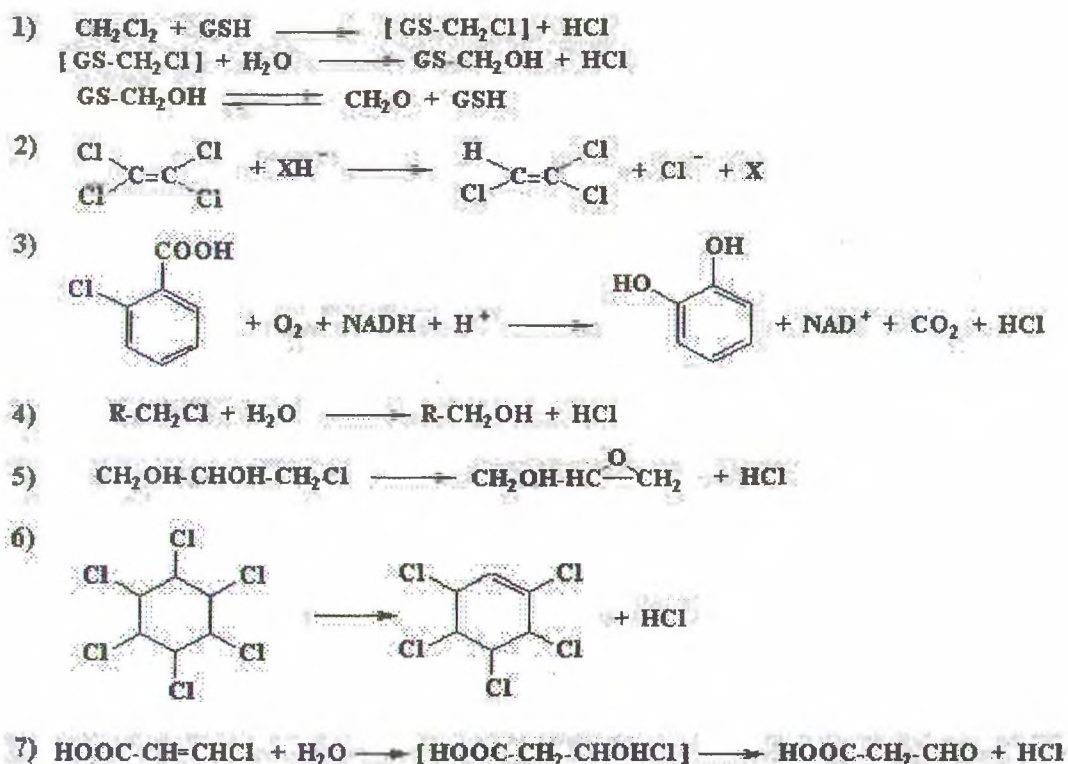


Рис. Пути ферментативного дегалогенирования ксенобиотиков

1. «Тиолитическое» дегалогенирование.

У бактерий, утилизирующих дихлорметан, дегалогенирование катализирует глутатион-S-трансфераза с образованием S-хлорметилглутатиона и с последующим его дехлорированием.

Способность утилизировать дихлорметан с образованием формальдегида отмечена у многих штаммов *Pseudomonas*, *Nurhomicrobium*, *Methylobacterium*. Дегалогеназа *Nurhomicrobium* sp. DM2 характеризуется как 195-кДа гомогексамерный белок с молекулярной массой субъединицы 33 кДа, требующий для своей работы присутствия глутатиона [2, 3]. В дальнейшем при исследовании структуры и кинетических свойств глу-

татион-S-трансфераз различных штаммов бактерий были обнаружены 2 группы этих ферментов. Ферменты группы А, представленные дегалогеназами *Nurhomicrobium* sp. DM2 и *Methylobacterium* sp. DM4, состоят из субъединиц молекулярной массой 33 кДа и имеют α_6 -структуру, тогда как дегалогеназа *Methylobacterium* sp. DM11, отнесенная к группе В, имеет α_2 -структуру и субъединицы массой 34 кДа [4]. Металлы или другие кофакторы в дихлорметандегалогеназах не обнаружены.

2. Восстановительное дегалогенирование.

В этом случае атом галогена замещается водородом. Реакции такого типа могут протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях, причем в аэробных условиях возрастает способность к деградации полигалогенированных соединений. У галогенированных алифатических соединений этот процесс протекает только в анаэробных условиях. Восстановительное дегалогенирование отмечено у многих соединений: галогенированных бензолов, толуолов, бензоатов, бром- и хлорфенолов, полихлорированных бифенилов, в разной степени замещенных хлорэтана и хлорэтилена. Процесс может быть одностадийным, когда донором электронов и протона является молекулярный водород, или двухстадийным, когда сначала происходит восстановление органическим соединением, а затем присоединение протона, происходящего из растворителя. Дегалогеназы такого типа часто являются глутатион-зависимыми ферментами. Так, выделенная из *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 глутатион-S-трансфераза представляла собой гомодимерный белок (субъединицы по 30 кДа) и осуществляла последовательное восстановительное дехлорирование тетрахлоргидрохинона с образованием 2-монохлоргидрохинона [5, 6]. Многие дегалогеназы галогенированных алифатических соединений используют в качестве кофакторов порфирины и коррины.

3. Окислительное дегалогенирование.

Реакции такого типа катализируются монооксигеназами или диоксигеназами, которые внедряют соответственно один или два атома молекулярного кислорода в молекулу субстрата. Эти реакции являются наиболее изученными. Они 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 P-450. Реакции гидроксирования сопряжены с элиминацией галогенводорода, а образующиеся соединения метаболизируются по основному пути.

4. Гидролитическое дегалогенирование.

Реакция катализируется гидролазами, при этом атом галогена замещается гидроксильной группой, происходящей из молекулы воды. Протекание реакций данного типа установлено в клетках многих бактерий. Это *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, *Corynebacterium* sp. m15-3, *Rhodococcus erythropolis* Y2, *Rhodococcus* sp. HA1, *Pseudomonas paucimobilis* UT26 и др. Обнаруженные у них дегалогеназы имеют молекулярные массы в интервале от 28 до 36 кДа и используют в качестве субстрата широкий круг соединений: C_1 - C_{16} -1-галоген-*n*-алканы, C_2 - C_{10} - α, ω -дихлор(дибром)-*n*-алканы, C_2 - C_6 галогенированные спирты.

5. Внутримолекулярное замещение.

Внутримолекулярное нуклеофильное замещение идет с образованием эпоксидов. В этом случае в реакцию дегалогенирования вовлекаются вицинальные галогенсодержащие спирты.

Способность к деградации дигалогенированных спиртов и кетонов была обнаружена у *Pseudomonas* sp. AD1, *Arthrobacter* sp. AD2, AD3. Дегалогеназа штамма AD2 конвертирует C₂- и C₃- бром- и хлоргидрины и обладает активностью по отношению к хлорацетону и 1,3-дихлорацетону, образуя эпоксиды в качестве продуктов и не требуя кофакторов и кислорода. Нативный белок имеет димерную структуру и субъединицы по 29 кДа [7]. В клеточных экстрактах *Corynebacterium* sp. N-1074 были обнаружены две 1,3-дихлор-2-пропанол-дегалогеназы (1а и 1в) и две эпихлоргидрингидролазы (2а и 2в). Ферменты 1в и 2в проявили значительную энантиоселективность, образовав R-3-хлор-1,2-пропандиол. Дегалогеназа 1а – тетрамерный фермент из субъединиц по 28 кДа, не содержащий металлов. Дегалогеназа 1в также имеет тетрамерную структуру, в которой субъединицы молекулярной массой 32 или 35 кДа комбинируются в различных соотношениях (4:0/3:1/2:2/1:3/0:4) [8].

6. Дегидрогалогенирование.

При дегидрогалогенировании галогенводород элиминируется из молекулы субстрата с образованием двойной связи. Примером соединения, деградируемого по этому пути, является пестицид линдан (γ-гексахлорциклогексан), из молекулы которого на первых стадиях последовательно ферментативно элиминируются две молекулы хлороводорода, а третья элиминируется спонтанно и приводит к образованию 1,2,4-трихлорбензола. Ответственный за дегидрохлорирование белок, выделенный из клеток *Pseudomonas raucimobilis* UT26, состоит из четырех идентичных субъединиц по 16,5 кДа и не требует кофакторов [9].

7. Гидратация.

Гидратаза катализирует присоединение воды к двойной связи, а дегалогенирование происходит в результате распада образующегося неустойчивого интермедиата. Этот процесс протекает без участия дегалогеназ.

Таким образом, можно отметить уникальность и многообразие бактериальных дегалогеназ. Участие в деградации того или иного типа дегалогеназ обусловлено видовой и родовой принадлежностью микроорганизмов, а также химической структурой деградируемого соединения. Участие в осуществлении наиболее ранних и трудно протекающих стадий разложения субстрата определяет ключевую роль этих ферментов в метаболизме ксенобиотиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fetzner S., Lingens F. Bacterial dehalogenase: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications // *Microbiol. Rev.*-1994.-V.58.-N.4.-P.641-685.
2. Kohler-Staub D., Leisinger T. Dichloromethane dehalogenases of *Hyphomicrobium* sp. strain DM2 // *J. Bacteriol.*-1985.-V. 162.-P.676-681.
3. Leisinger T., Kohler-Staub D. Dichloromethane dehalogenases from *Hyphomicrobium* DM2 // *Methods Enzymol.*-1990.-V.188.-P.355-361.

4. Kohler-Staub D., Hartmans S., Gälli R., Suter F., Leisinger T. Evidence for identical dichloromethane dehalogenases in different methylotrophic bacteria // *J. Gen. Microbiol.*-1986.-V.132.-P.2837-2843.
5. Xun L., Topp. E., Orser C. S. Glutathione is the reducing agent for the reductive dehalogenation of tetrachloro-p-hydroquinone by extracts from a *Flavobacterium* sp. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*-1992.-V.182.-P.361-366.
6. Xun L., Topp. E., Orser C. S. Purification and characterization of a tetrachloro-p-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. // *J. Bacteriol.*-1992.-V.174.-P.8003-8007.
7. Van den Wijngaard A. J., Janssen D.V., Reuvekamp P. T. W. Purification and characterization of haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2 // *J. Bacteriol.*-1991.-V.173.-P.124-129.
8. Nakamura T., Yu F., Mizunashi W., Watanabe I. Production of (R)-3-chloro-1,2-propanediol from prochiral 1,3-dichloro-2-propanol by *Corynebacterium* sp. strain N-1074 // *Appl. Environ. Microbiol.*-1993.-V.55.-P.227-230.
9. Nagata Y., Natta T., Imai R., Kimbara K., Fukuda M., Yano K., Takagi M. Purification and characterization of (γ -HCH) dehydrochlorinase (Lin A) from *Pseudomonas paucimobilis* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.*-1993.-V.57.-P.1582-1583.

УДК 616.9-022.3: 615.281

О.П. Собещук, ст. преподаватель

ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ И АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

The ecological aspects of inter-hospital infections have been considered in this article. .

The limits of endurance of Minsk population of staphylococci of different origin including 755 strains in regard to antimicrobial agents have been discovered.

On the basis of the literature's analysis and our own experimental research the conclusion have been made about the universality of the problem of the inter-hospital infections, wich is in the adaptation of the microorganisms to the extreme factors of the environment as the realisation of biological regularity.

Внутрибольничная инфекция (госпитальная, нозокомиальная) является одной из форм ятрогенных (связанных с медицинскими вмешательствами) заболеваний. Возникает такого рода инфекция, как правило, в больничных учреждениях. Присоединение внутрибольничной инфекции к основному заболеванию ухудшает исход болезни, в том числе повышает летальность и частоту перехода болезни в хроническую форму, увеличивает длительность пребывания человека в стационаре, расходы на уход и лечение, трудовые потери [1].

Проблема внутрибольничных инфекций возникла, по-видимому, с началом применения для лечения инфекционных заболеваний химиотерапевтических препаратов в больничных учреждениях.

В этиологии внутрибольничных инфекций основная роль принадлежит условно-патогенным микроорганизмам. Причем в период до антибиотикотерапии основными возбудителями были стрептококки, а в период антибиотикотерапии в 50-60-е гг. – стафилококки, в 90-е годы резко возрос удельный вес других групп микроорганизмов