

8. Hayshida S. // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1975. – V. 39. – P. 2093.
 9. Yamasaki Y., Suzuki Y., Ozawa J. // *Agricultural and Biological Chemistry*. – 1977. – V. 49. – P. 2149.
 10. Spencer-Martins I., van Uden N. // *European Journal of Applied Microbiology and Biothechnology*. – 1979. – V. 6. – P. 241.

УДК 579.861; 576.8

И.М. Бурак, аспирант; В.Н. Леонтьев, доцент; Т.И. Ахрамович, ассистент;
 Н.В. Сухова, студент

ВЛИЯНИЕ АТОМА ХЛОРА В МОЛЕКУЛЕ СУБСТРАТА НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМ Р450-СОДЕРЖАЩЕЙ ОКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

The influence of atom Cl in the structure of organic substrat on the activity of cytochrome P450 containing monooxygenase of bacteria genus *Pseudomonas* was investigated.

Вопросам биodeградации загрязнителей окружающей среды посвящено немало литературы. Большую группу загрязнителей представляют собой гидрофобные органические вещества, попадающие в биосферу в результате хозяйственной деятельности человека. Зачастую микробиологический путь разложения таких ксенобиотиков включает в себя аэробные процессы, к осуществлению которых способны микроорганизмы, обладающие оксигеназной ферментной системой. Монооксигеназы и диоксигеназы, являющиеся обязательными компонентами таких систем, внедряют соответственно один или два атома кислорода в молекулу субстрата, чаще всего в виде гидроксильных групп. Такая первоначальная модификация гидрофобных ксенобиотиков увеличивает их гидрофильность, облегчает их последующую утилизацию и является одной из первых стадий их метаболизма [1].

Оксигеназные ферментные системы бактерий весьма разнообразны по количеству и типам включающих в себя ферментов. Очень часто в их состав в качестве терминальной оксидазы входит уникальный гемопротейн – цитохром Р450, являющийся гемопротейном b-типа. В присутствии доноров электронов (НАД(Ф)Н·Н⁺) цитохром Р450 способен активировать молекулярный кислород, один атом которого затем внедряется в молекулу окисляемого субстрата, а другой восстанавливается до воды. Оксигеназные реакции, катализируемые цитохромом Р450, весьма разнообразны. Это реакции окислительного дезалкилирования, гидроксилирования алифатических, ароматических, гетероциклических углеводов, N-окисления и многие другие [2].

Ранее было показано, что такие загрязнители, как гербициды прометрин и симазин, способны деградироваться специально отобранными штаммами бактерий рода *Pseudomonas*, которые утилизируют их в качестве единственного источника углерода и энергии [3]. В связи с тем, что прометрин и симазин, являющиеся гидрофобными соединениями, подвергаются деградации в аэробных условиях, представлялось интересным изучить биохимические основы их метаболизма.

На первом этапе проводили определение содержания цитохромов b₅ и Р450 в клетках бактерий *Pseudomonas aurantica* В-162 и *Pseudomonas aeruginosa* В-7, выращенных на среде с симaziном и прометрином соответственно.

В выращенных на синтетической среде с пестицидом до стационарной фазы роста и тщательно отмытых клетках *P. aurantica* В-162 и *P. aeruginosa* В-7 измеряли содержание цитохромов b_5 и P450. Измерение содержания цитохромов b_5 и P450 проводили на спектрофотометре Specord M-40 по методу Омуры и Сато [4]. Определение содержания цитохрома b_5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротейна, а цитохрома P450 – на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома P450 с СО при 450 нм. В качестве восстановителя использовали дитионит натрия. Результаты измерения содержания цитохромов b_5 и P450 в клетках *P. aurantica* В-162 и *P. aeruginosa* В-7 представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, содержание цитохрома b_5 у обоих штаммов одинаково и соответствует содержанию этого гемопротейна в клетках других бактерий [5].

Таблица 1

Содержание цитохромов b_5 и P450 в клетках *P. aurantica* В-162 и *P. aeruginosa* В-7

Микроорганизмы	Содержание цитохрома b_5 , нмоль/мг белка	Содержание цитохрома P450, нмоль/мг белка
<i>P. aeruginosa</i> В-7	0,02	0,01
<i>P. aurantica</i> В-162	0,02	0,04

В то же время содержание цитохрома P450 существенно различается. Более высокое содержание цитохрома P450 отмечено в клетках *P. aurantica* В-162, выращенных на хлорпроизводном симм-триазинов – симазине. Мы склонны считать, что дегалогенирование симазина может приводить к инактивации части молекул цитохрома P450, в результате чего клетки должны синтезировать дополнительное количество этого фермента, т.е. должен включаться механизм индукции биосинтеза цитохрома P450.

Исходя из механизма действия цитохром P450-содержащей гидроксилирующей ферментной системы, а также с целью изучения редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении пестицидов микробными клетками, нами были измерены активности оксидоредуктаз в клетках *P. aeruginosa* В-7 и *P. aurantica* В-162, выращенных на средах с прометрином и симaziном соответственно, с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками. Принцип метода основан на определении изменения поглощения акцепторов электронов при переходе их из окисленной формы в восстановленную. Участки редокс-цепей, с которых снимаются электроны, указаны на схеме (рис.) штриховыми линиями.

Активность оксидоредуктаз, или скорость переноса электронов в редокс-цепях, может быть измерена по скорости окисления НАДН·Н⁺ или НАДФН·Н⁺.

Для измерения активностей оксидоредуктаз использовали культуры бактерий *P. aeruginosa* В-7 и *P. aurantica* В-162, выращенных на синтетической среде с пестицидом до стационарной фазы роста. Клетки тщательно отмывали от ростовой среды и разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе.

Значения активностей оксидоредуктаз представлены в табл. 2. Некоторый разброс полученных значений объясняется тем, что культура бактерий при каждом измерении активностей оксидоредуктаз является несинхронизированной.

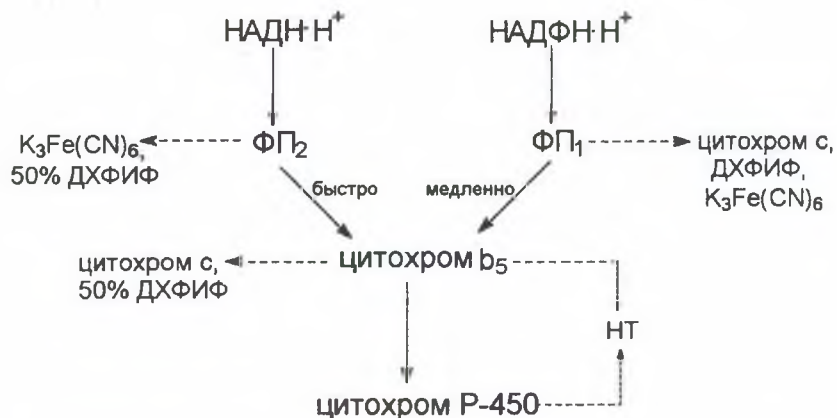


Рис. Схема редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении органических субстратов: ФП₁ – цитохром Р 450-редуктаза; ФП₂ – цитохром b₅-редуктаза; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндифенилат натрия; НТ – неотетразолий синий

Как видно из табл. 2, значения активностей оксидоредуктаз в клетках бактерий обоих видов достаточно близки при использовании в качестве донора электронов как НАДН·Н⁺, так и НАДФН·Н⁺. Причем активности НАДН·Н⁺- и НАДФН·Н⁺-оксидоредуктаз для всех использованных акцепторов электронов в клетках бактерий, выращенных на прометрине, превышают активности НАДН·Н⁺- и НАДФН·Н⁺-оксидоредуктаз в клетках бактерий, выращенных на симазине, за исключением НАДН:НТ-редуктазной активности при использовании прометрина.

Таблица 2

Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках *P.aeruginosa* В-7 и *P.aurantica* В-162

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин·мг	
	Прометрин	Симазин
НАДН: 2,6-ДХФИФ	3,76	3,32
НАДФН: 2,6-ДХФИФ	2,45	0,54
НАДН: цитохром с	3,69	3,35
НАДФН: цитохром с	1,92	1,28
НАДН: K ₃ Fe (CN) ₆	39,52	36,87
НАДФН: K ₃ Fe (CN) ₆	22,41	16,04
НАДН: НТ	0,32	0,37
НАДФН: НТ	0,27	0,08

Вместе с тем активности НАДН·Н⁺-оксидоредуктаз в клетках обеих бактерий численно превышают активности НАДФН·Н⁺-оксидоредуктаз для всех использованных искусственных акцепторов электронов. Причем значительное уменьшение НАДФН:2,6-ДХФИФ- и НАДФН:НТ-редуктазных активностей по сравнению с аналогичными НАДН·Н⁺-редуктазными активностями наблюдается в клетках *P.aurantica* В-162, выращенных на симазине. Согласно схеме редокс-цепей переноса электронов, это свиде-

тельствует о замедлении процессов переноса электронов по НАДФН·Н⁺-зависимой электронтранспортной цепи и, следовательно, об уменьшении активности НАДФН·Н⁺-цитохром Р450-редуктазы, цитохромов b₅ и Р450 при окислении прометрина и симазина.

Уменьшение активностей оксидоредуктаз, а следовательно, и активностей цитохромов b₅ и Р450 в клетках бактерий, выращенных на симазине, по сравнению с активностями оксидоредуктаз в клетках бактерий, выращенных на прометрине, вероятно, объясняется механизмом ферментативного расщепления симазина, включающим сначала процесс дегалогенирования гетероциклического кольца, а затем его дезалкилирования. Механизм процесса дегалогенирования еще до конца не изучен, однако велика вероятность протекания радикальных реакций, оказывающих ингибирующее действие на активность цитохромов b₅ и Р450, принимающих участие в реакциях дезалкилирования симазина.

Вместе с тем полученные результаты согласуются с кривыми роста бактерий на симазине, где наблюдается более длительный период адаптации клеток к субстрату по сравнению с прометрином.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в биодеградации симметризиновых пестицидов принимает участие монооксигеназная ферментная система. В связи с тем, что в отличие от прометрина биодеградация симазина протекает через стадию дегалогенирования, в процессе которого могут образовываться активные частицы, снижена активность оксидоредуктаз в клетках бактерий *P. aurantica* В-162, выращенных на симазине, причем наиболее существенное снижение активности наблюдается для двух НАДФН·Н⁺-зависимых ферментов – НАДФН:2,6-ДХФИФ- и НАДФН:НГ-редуктаз. Этим же различием в механизмах биодеградации пестицидов объясняются и различия в содержании цитохрома Р450 в клетках, выращенных на симазине, где содержание этого фермента в 4 раза выше, чем в клетках, выращенных на прометрине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jussi Uotila. Dehalogenases for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitum* CG-2 // Academic dissertation, Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki. – 1993.
2. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. – М.:Наука, 1982. – 255 с.
3. Бурак И.М., Леонтьев В.Н., Ахрамович Т.И., Гриц Н.В. Биодеградация симметризиновых гербицидов // Труды БГТУ, выпуск 8. – 2000. – С.223–228.
4. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature // J.Biol.Chem. – 1964. – Vol.239. – P.2370–2378.
5. Сокольчик Т.И., Леонтьев В.Н., Гриц Н.В. Зависимость активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b₅ и Р-450 у бактерий рода *Pseudomonas* от структуры шестиуглеродного субстрата // Микробиол. – 1999. – Т.68. №3. – С. 299–303.