

УДК 579.861;576.8

ДЕГРАДАЦИЯ СИМ-ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

О.С. Игнатовец, В.Н. Леонтьев

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Сим-триазиновые гербициды применяются для борьбы с сорными растениями на посевах ряда полевых и овощных культур. В результате их многолетнего повсеместного применения и высокой персистентности реальна опасность стойкого загрязнения почвы, как сим-триазинами, так и продуктами их трансформации. При сельскохозяйственном применении они легко уходят в грунтовые воды. Описаны разнообразные негативные эффекты воздействия триазиновых гербицидов как на растительные, так и на животные организмы [1]. По масштабам производства и потребления сим-триазины – одна из ведущих групп гербицидов. Поскольку триазиновые гербициды на сегодняшний день остаются неотъемлемой частью сельскохозяйственных технологий, то речь идет не об отказе от них, а о выборе оптимальных стратегий трансформации и удаления из окружающей среды. Перспективный подход для ремедиации загрязненных почв – применение биопрепаратов на основе микроорганизмов, осуществляющих деградацию сим-триазинов.

Учитывая вышеизложенное, а также тот факт, что бактерии рода *Pseudomonas* являются одними из основных почвенных бактерий, целью настоящей работы явилось изучение особенностей биodeградации прометрина и симазина бактериями рода *Pseudomonas*, как в почвенных модельных системах, так и в условиях кометаболизма.

Методы исследования

В качестве объектов исследований использовали симазин и прометрин, которые были получены из технических препаратов перекристаллизацией из ацетона. В работе использовали штаммы микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* В-22, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas aurantica* В-162 и *Pseudomonas aeruginosa* В-7, отобранные из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Ранее нами была установлена способность штаммов *P. aurantica* В-162 и *P. aeruginosa* В-7 осуществлять деградацию симазина и прометрина соответственно, а также были идентифицированы интермедиаты и предложены механизмы их деградации [2,3].

Для определения активности дегалогеназы использовали клетки бактерий *P. aurantica* В-162 в экспоненциальной фазе роста, выращенные на симазине (0,05%). Клетки осаждали центрифугированием (6000 мин⁻¹, 15 мин), от ионов Cl⁻ отмывали трижды 0,85% раствором KNO₃, дезинтеграцию проводили ультразвуком (44 кГц, 60 с). Объем полученной суспензии разрушенных клеток доводили до 20 мл 0,85 % раствором KNO₃. В гомогенаты вносили симазин (0,05% масс.). Параллельно ставили эксперимент по неферментативному дегалогенированию симазина. Изменение концентрации ионов Cl⁻ измеряли с помощью иономера И-160, оснащенного хлорселективным электродом. Для калибровки электрода готовили стандартные растворы KCl. Количественное определение белка в суспензии бактерий проводили по методу Варбурга и Христиана на спектрофотометре «Specord M40» [4].

Удельную активность дегалогеназы рассчитывали по формуле:

$$A = \Delta C / \Delta t \cdot C_0$$

где A – удельная активность дегалогеназы, г ион/мин·мг белка;

ΔC – разность концентраций Cl⁻, г ион/л;

C_6 – концентрация белка, мг/мл;

Δt – время реакции, мин.

Экстракцию интермедиатов и продуктов деградации симазина проводили равным объемом диэтилового эфира. Эфирный экстракт упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и анализировали с помощью высокоэффективного жидкостного хромато-масс-спектрометра «Waters», оснащенного диодно-матричным детектором PDA 996 и масс детектором «Micromass ZQ-2000» (ионизация – ESI) на колонке «BDS HYPERSIL C₁₈». В качестве подвижной фазы использовали метанол. Скорость элюирования 0,7 мл/мин. Объем анализируемой пробы 25 мкл. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме отрицательных и положительных ионов. Обработку результатов осуществляли при помощи пакета «Mass Lynx».

Для приготовления модельных почвенных систем использовали серую лесную почву, взятую вблизи Минска. Перед использованием почву просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм, затем навеску почвы трижды стерилизовали (1 атм, 30 мин при 120°C) с интервалом в 1 сут. Подготовленную почву помещали в чашки Петри и инкубировали при температуре 18-20°C в течение 6 недель. Чашки ежедневно взвешивали для контроля испарения влаги и при необходимости восполняли ее потерю стерильной водой.

Для внесения инокулянта в почву бактерии штаммов-деструкторов выращивали в жидкой синтетической среде с гербицидом в качестве единственного источника углерода и энергии до середины экспоненциальной фазы роста. Клетки отделяли центрифугированием ($n = 12000 \text{ мин}^{-1}$, $\tau = 15 \text{ мин}$, $t = 10^\circ\text{C}$), разводили физиологическим раствором. Приготовленную таким образом бактериальную суспензию добавляли в почву. Количество вносимой суспензии рассчитывали, исходя из требуемой влажности (40%) и конечной концентрации клеток 10^7 на 1 г сухой почвы. Затем почву в чашках тщательно перемешивали.

Для определения общей численности микроорганизмов и концентрации гербицида в почве отбирали пробы массой 0,5 и 1,0 г соответственно из 3 участков для усреднения. Пробы весом 0,5 г ресуспендировали в 4,5 мл физиологического раствора, тщательно перемешивали, и после соответствующих разведений высевали на чашки с питательным агаром. Чашки инкубировали при 30°C в течение суток. Число колониеобразующих единиц рассчитывали на 1 г сухой почвы.

Определение концентрации гербицидов. Навеску сухой почвы (1 г) экстрагировали в аппарате Сокслета 150 мл метанола в течении 24 ч. Метанольный экстракт упаривали при пониженном давлении на роторном испарителе при 20°C до объема 10 мл и анализировали с помощью метода ВЭЖХ-МС.

Определение степени превращения симазина штаммами *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22 в условиях кометаболизма. Ночную культуру бактерий разводили средой MM-9, в соотношении 1:9, содержащей в качестве субстрата симазин (0,05%), а в качестве ко-субстратов: глюкозу (0,2%); гексан (0,1%); этанол (0,05%) или ацетат (0,1%), инкубировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды 50 мл) на установке Environmental Shaker-incubator ES-20 «BioSan» в условиях аэрации (200 мин^{-1}) при 30°C в течение 72 ч. Экстракцию и хромато-масс-спектрометрический анализ проб осуществляли как описано выше.

Результаты и обсуждение

Как известно из литературных источников, первой стадией трансформации или деградации галогенсодержащих ароматических соединений является их дегалогенирование [5]. В связи с этим, на первом этапе настоящей работы был разработан метод определения дегалогеназной активности бактерий рода *Pseudomonas*. Поскольку при дегалогенировании

органических соединений ферментными системами микроорганизмов образуется стехиометрическое количество галогенид-ионов [5], то для определения концентрации трансформированного ксенобиотика можно использовать концентрацию галогенид-ионов. В связи с тем, что в качестве электрода сравнения применяли хлорсеребряный электрод, для предотвращения попадания хлорид-ионов в анализируемую среду, была выбрана двухкамерная система, соединенная агаровым мостиком. Калибровку хлорселективного электрода и измерение концентрации хлорид-ионов проводили в условиях термокомпенсации для снижения влияния колебаний температуры на погрешность измерения результатов эксперимента. На рисунке 1 представлена схема разработанной экспериментальной установки для определения изменения концентрации хлорид-ионов в растворе.

Максимальная удельная активность дегалогеназ в клетках бактерий *P. aurantica* В-162, выращенных на симазине составляет $4,8 \cdot 10^{-5}$ г ион/мин·мг белка.

Рису

нок 1 – Схема экспериментальной установки и кинетическая кривая дегалогенирования симазина ферментными системами штамма *P. aurantica* В-162

1 – иономер лабораторный И – 160; 2 – хлорсеребряный электрод сравнения; 3 – солевой мостик из фонового раствора (1М р-р KNO_3) с 3% агар-агара; 4 – стакан с фоновым раствором; 5 – магнитная мешалка; 6 – хлорселективный электрод; 7 – стакан с исследуемой средой; 8 – термокомпенсатор; 9 – якорь магнитной мешалки

Для подтверждения образования дегалогенированного продукта симазина изучали продукты биотрансформации этого гербицида с помощью метода ВЭЖХ-МС. На рисунке 2 представлены масс-хроматограммы бесклеточного экстракта после внесения симазина при разном времени ферментативной реакции при регистрации в области положительных ионов.

Анализ полученных хроматографических пиков на рисунке 2 показал, что пик с временем удержания 5,8 мин характерен для симазина (это подтверждено хроматографическим анализом стандартного вещества), второй хроматографический пик с временем удержания 7,30 мин принадлежит гидроксипроизводному симазина, образовавшемуся вследствие реакции дегалогенирования. В связи с тем, что молекулярная масса симазина составляет 202,0 Да, его на хроматограммах идентифицировали в области положительных ионов по иону $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 202,6. Второй пик на масс-хроматограмме с m/z

184,6 обусловлен протонированным гидроксипроизводным симазина $[M+H]^+$. Таким образом, применение хроматографического анализа продуктов биodeградации галогенсодержащих ароматических соединений позволило обнаружить, что одним из первичных метаболитов симазина является 2-гидрокси-4,6-бис(этиламино)-симм-триазин. Принципиально возможны несколько путей его образования: первый – замещение галогена на гидроксил, протекающее в активном центре цитохрома P-450 [6], второй – гидролитическое дегалогенирование, под действием фермента Atz A, протекающее через образование производных CoA [5].

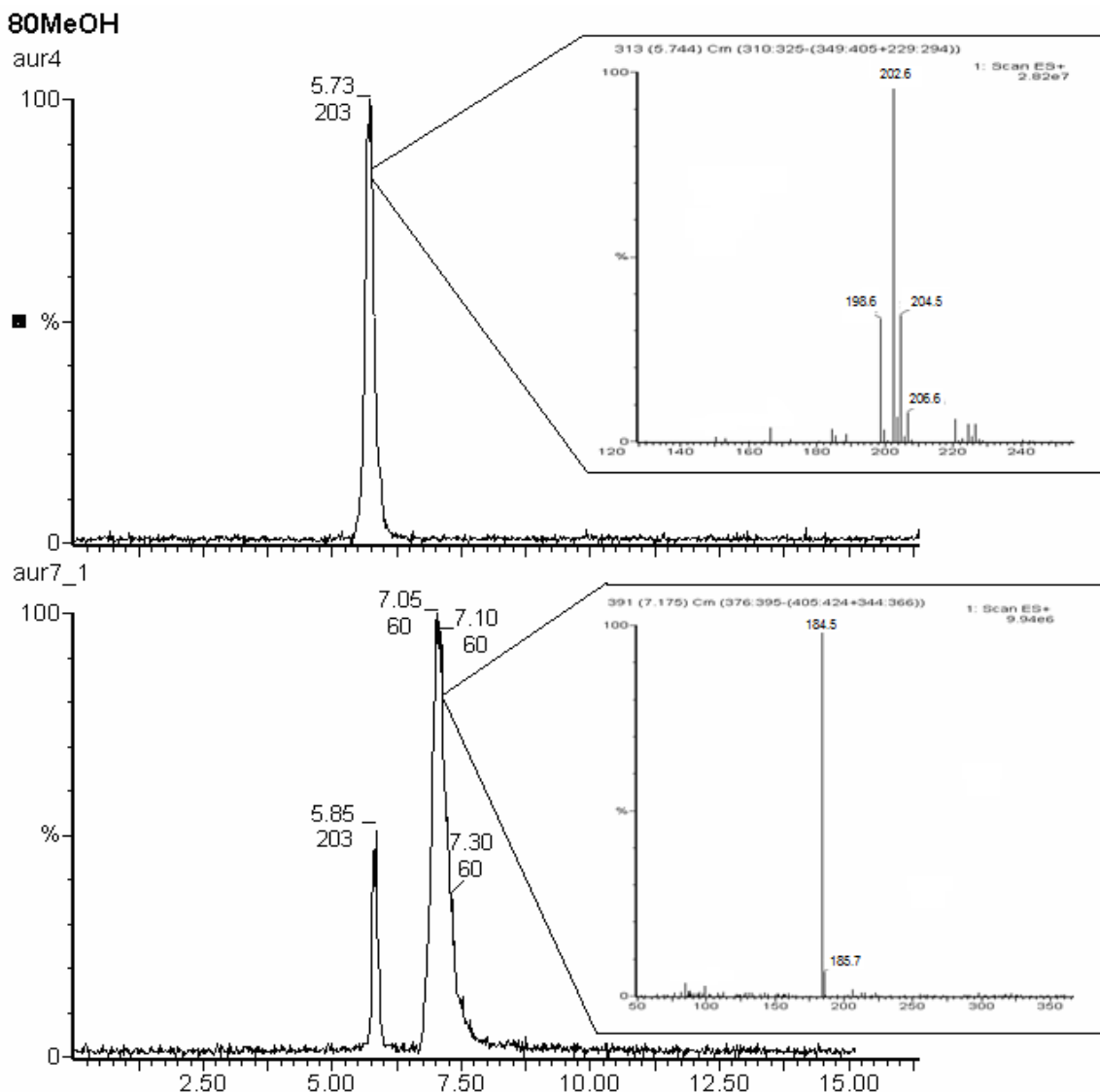


Рисунок 2 – Масс-хроматограммы симазина и продукта его трансформации: а – 0 мин с начала ферментативной реакции; б – 20 ч с начала ферментативной реакции

В связи с тем, что в бесклеточном экстракте кроме 2-гидрокси-4,6-бис(этиламино)-симм-триазина не обнаружено производных симазина с CoA, то можно утверждать, что реализуется первый путь деградации симазина монооксигеназной ферментной системой штамма *P. aurantica* В-162.

Для подтверждения этого вывода были изучены ключевые ферменты монооксигеназной ферментной системы штамма *P. aurantica* В-162. В таблице 1, приведены активности оксидоредуктаз в клетках штамма-деструктора.

Данные по содержанию цитохромов P450 и b₅ в клетках бактерий *P. aurantica* В-162 в стационарной и логарифмической фазах роста, выращенных на различных субстратах в качестве единственного источника углерода, представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках бактерий, выращенных на различных субстратах

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин·мг белка	
	глюкоза	симазин
НАДН: 2,6-ДХФИФ	1,62±0,1	3,32±0,2
НАДФН:2,6-ДХФИФ	1,13±0,08	2,54±0,1
НАДН: цитохром с	1,74±0,12	3,45±0,2
НАДФН: цитохром с	0,72±0,06	1,28±0,05
НАДН: K ₃ Fe (CN) ₆	20,19±0,5	36,87±0,6
НАДФН: K ₃ Fe (CN) ₆	14,62±0,3	16,04±0,4
НАДН: НТ	0,23±0,01	0,37±0,02
НАДФН: НТ	0,18±0,01	0,08±0,01

Таблица 2 – Содержание цитохромов b₅ и P-450 в клетках *P. aurantica* В-162, выращенных на различных субстратах и в зависимости от фазы роста бактерий

Субстрат	Содержание цитохрома b ₅ , нмоль/мг белка		Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка	
	экспонен-циальная фаза	стационарная фаза	экспонен-циальная фаза	стационарная фаза
Глюкоза	0,01	0,01	0,01	0,01
Симазин	0,03	0,01	0,09	0,03

Как видно из таблицы 1, значения активностей оксидоредуктаз в клетках бактерий для обоих субстратов значительно различаются при использовании в качестве донора электронов НАДН и НАДФН. Причём, активности НАДН- и НАДФН-оксидоредуктаз для всех использованных акцепторов в клетках бактерий, выращенных на симазине превышают активности НАДН- и НАДФН-оксидоредуктаз в клетках бактерий, выращенных на глюкозе, за исключением активности НАДФН:НТ-редуктазной активности.

Таким образом, нами установлено, что в окислении симазина клетками бактерий *P. aurantica* В-162 участвует цитохром P-450-содержащая монооксигеназная ферментная система, содержащая 4 компонента, функционирующие как в НАДФН·Н⁺-, так и в НАДН·Н⁺-зависимых электронтранспортных цепях, сопряженных с реакцией окисления

органических субстратов: НАДФН·Н⁺-цитохром Р-450-редуктазу, НАДН·Н⁺-цитохром b₅-редуктазу, цитохром b₅ и цитохром Р-450.

Известно, что ряд микроорганизмов могут осуществлять деградацию ксенобиотиков в присутствии косубстратов. В процессе скрининга были отобраны штаммы *P. fluorescens* В-22 и *P. aeruginosa* PAO1, способные осуществлять трансформацию или деградацию симазина только в условиях кометаболизма. В качестве косубстратов деградации симазина были взяты представители различных классов органических соединений – углеводы (глюкоза), углеводороды (гексан), спирты (этанол), органические кислоты (ацетат натрия). Эксперименты показали, что при использовании различных косубстратов интенсивность трансформационного процесса существенно варьирует (Рис. 3).

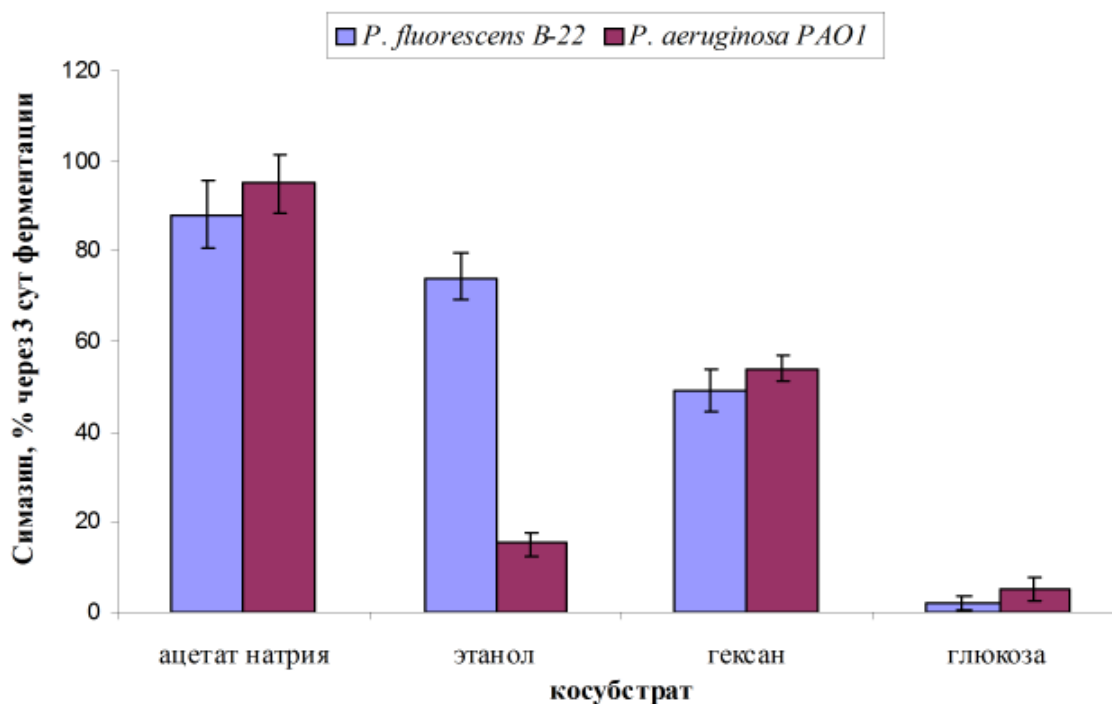


Рисунок 3 – Влияние косубстратов на динамику деградации симазина

Наиболее эффективным косубстратом для обоих штаммов являлась глюкоза, причем роль глюкозы в данном случае не ограничивалась только тем, что она в качестве ростового субстрата обеспечивала большой прирост биомассы, по-видимому, связь здесь намного сложнее, так как в случае с этанолом мы также наблюдали заметный прирост биомассы, но деградация симазина была достаточно слабой. Культура *P. fluorescens* В-22 была более активна в экспериментах со всеми косубстратами, чем *P. aeruginosa* PAO1, за исключением использования этанола в качестве косубстрата. Во всех экспериментах скорость деградации была максимальной в период логарифмической фазы роста клеток.

Одним из способов очистки территорий от загрязнения гербицидами является внесение в почву бактерий, способных быстро их деградировать. Перед интродукцией микроорганизмов в окружающую среду необходимо спрогнозировать их выживаемость, поведение и оценить эффективность биodeградации гербицида. В связи с этим на следующем этапе было проведено исследование микробной деградации прометрина и оценка эффективности данного процесса, осуществляемого штаммом-деструктором в модельной почвенной системе. Изучение процесса деградации прометрина (внесенное количество 1 мг/г сухой почвы) в модельном эксперименте со стерильной почвой показало, что концентрация прометрина в течение 35 сут практически не изменялась.

Деградация прометрина в почве, содержащей интродуцированные клетки штамма-деструктора заметна уже на 5-е сутки (Рис. 4).

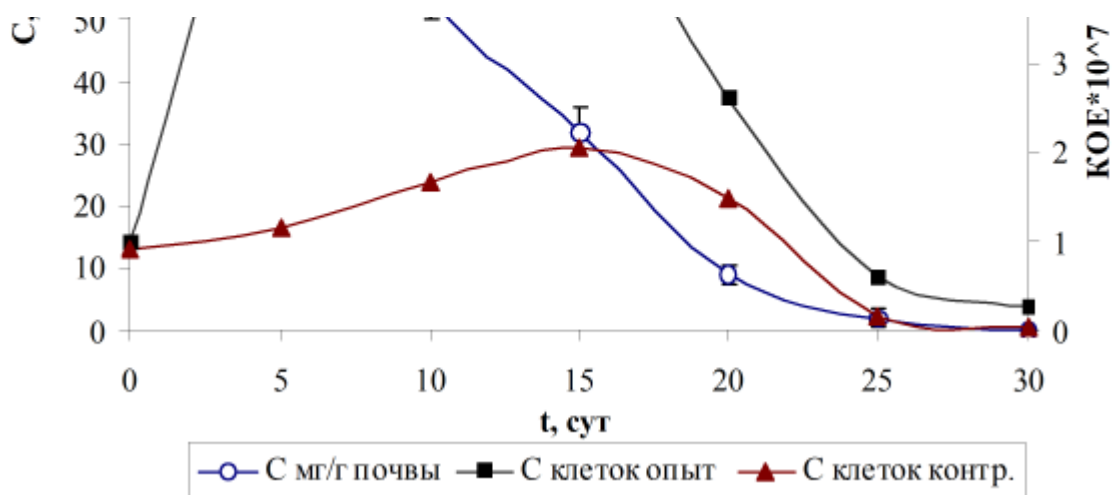


Рисунок 4 – Динамика концентрации прометрина и численности бактерий *P. aeruginosa* В-7 в модельной почвенной системе

Прометрин в почве разлагался достаточно быстро, через 15 суток его остаточное количество составляло 30%, а через месяц гербицид присутствовал в следовых количествах. В процессе биodeградации прометрина в почве обнаруживались различные промежуточные продукты (сульфооксид и сульфон прометрина), но они довольно быстро подвергались дальнейшей трансформации. Помимо анализа изменения концентрации вышеназванных веществ в модельной почве изучали также развитие интродуцированной культуры чашечным методом Коха. В опыте с модельно загрязненной прометрином почвой численность 10^7 КОЕ/г сух. почвы была максимальной на 10-е сутки эксперимента, затем наблюдали снижение КОЕ, вследствие истощения в среде основного источника питания.

В связи с тем, что хромато-масс-спектрометрический анализ экстракта опытной почвы показал наличие сульфоксида и сульфона прометрина, содержание которых изменяется во времени, очевидным является вывод о том, что трансформация прометрина в почве идет по описанному нами ранее механизму [4].

Таким образом, установлено, что штамм *P. aeruginosa* В-7 способен осуществлять практически полную деградацию прометрина в модельно-загрязненной почве с высокой эффективностью, что обеспечивает возможность использования данного штамма в технологиях биоремедиации почв, загрязненных данным гербицидом.

Изучение динамики деградации симазина в модельной почве содержащей интродуцированные клетки штамма *P. aurantica* В-162 показало, что он не разлагается в почве довольно длительное время. Через месяц его остаточная концентрация составляла около 90%. Такой характер снижения концентрации симазина (Рис. 5), видимо обусловлен плохой биодоступностью сорбированного почвой гербицида. Обращает на себя внимание сильное токсическое действие адсорбированного почвой симазина на клетки интродуцированного штамма. После первых пяти суток экспозиции численность КОЕ снизилась на порядок, и затем монотонно снижалась. В конце месяца рост культуры был полностью подавлен и клетки штамма деструктора в модельно-загрязненной почве не обнаруживались.

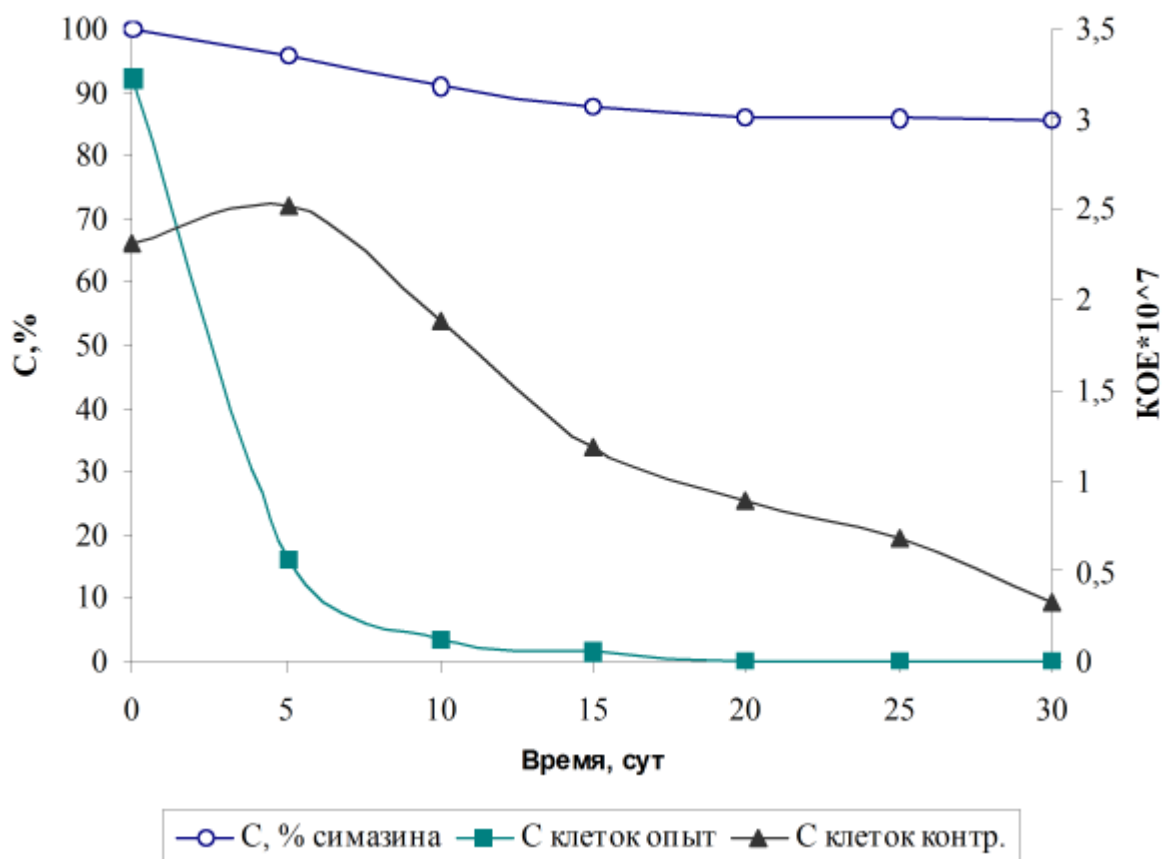


Рисунок 5 – Динамика численности бактерий *P. aurantica* B-162 в модельной почвенной системе и концентрация симазина

Динамика развития культуры *P. aurantica* B-162 в контрольной почве была в общих чертах аналогична таковой для *P. aeruginosa* B-7. В контроле монокультура развивалась следующим образом: максимальная численность КОЕ отмечалась на 5-е сутки, далее следовало замедление роста и к концу месяца численность КОЕ составляла 10% от начальной.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что механизмы деградации свободного и адсорбированного на частицах почвы симазина различны. Деградация адсорбированного симазина на первых своих стадиях протекает с образованием высокотоксичных соединений, губительно действующих на бактериальные клетки и это является свидетельством того, что биодоступность адсорбированного симазина достаточно высока. Установить структуру высокотоксичного интермедиата с помощью метода хромато-масс-спектрометрии не удалось. Проведенные исследования по деградации симазина позволяют сделать вывод о том, что этот штамм может быть использован для эффективной деградации симазина в сточных водах, но категорически нельзя применять интродукцию его в почвы, загрязненные симaziном. Вероятно, в связи с этим токсичным эффектом наблюдается высокое содержание адсорбированного на почве симазина через 5-7 лет после его последнего внесения в почву.

Выводы

В результате проведенных исследований разработан метод определения дегалогеназной активности клеток бактерий. Показано участие монооксигеназной

ферментной системы бактерий рода *Pseudomonas* в деградации сим-триазиновых гербицидов, определены активности ключевых ферментов. Продемонстрирована возможность использования штамма *P. aeruginosa* В-7 для ремедиации почв, загрязненных прометрином.

Литература

1. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации. / О.Н. Горбатова [и др.]. // Успехи биологической химии. – 2006.– Т.46. – С. 323-348.
2. Механизм деградации симазина бактериями рода *Pseudomonas*. О.С. Игнатовец [и др.] // Доклады НАН Беларуси. – 2006. –Т. 51, №. 2. – С. 61-64.
3. Игнатовец, О.С. Механизм деградации прометрина бактериями рода *Pseudomonas* / О.С. Игнатовец, В.Н. Леонтьев // Доклады НАН Беларуси. – 2008. –Т. 52, №. 3. – С. 81-85.
4. Практическая химия белка. Под ред. А. Дарбре – М.: Мир, 1989.
5. Fetzner, S. Bacterial dehalogenation. / S. Fetzner // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. –№ 50. – P. 633-657.
6. Votila J.S. Dehalogenases for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitum* CG-2. // Academic dissertation. – Helsinki, 1993.

DEGRADATION S-TRIAZINE HERBICIDES OF BACTERIA GENUS *PSEUDOMONAS*

O.S. Ignatovets, V.N. Leontiev

Belarusian Technological State University, Minsk, Republic of Belarus

The results of investigations of degradation of s-triazines herbicides by ferment systems of bacteria genus *Pseudomonas* in soil modelling systems and in co-metabolism conditions are presented. Activity of the key enzymes participating in degradation by s-triazines herbicides was determined. The best co-substrate of degradations simazine was glucose.