

УДК 577.151.63

Я. Л. Страх, асп.; О. С. Игнатовец, доц., канд. биол. наук;  
А. М. Шимкевич, ст. преп., канд. биол. наук;  
В. Н. Леонтьев, канд. хим. наук, доц.  
(БГТУ, г. Минск)

## ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГАЛОГЕНАЗ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ 2,4-Д (2-ЭТИЛГЕКСИЛОВЫЙ ЭФИР)

Хлорорганические пестициды достаточно широко применяются в сельском хозяйстве для уничтожения сорняков. Одним из наиболее типичных представителей гербицидов данной группы является 2,4-Д (2-этилгексировый эфир). После применения гербицида он легко переносится в подземные воды, из-за его высокой растворимости (600 мг/л при 25°C). Даже после длительного периода неиспользования, значительное количество данного вещества или его основные продукты деградации, 2,4-дихлорфенол (2,4-ДХФ), могут быть найдены в поверхностных и грунтовых водах. Основным фактором, влияющим на разложение пестицидов в почве, является деятельность микроорганизмов [1]. Как известно из литературных источников, одной из возможных первых стадий трансформации или деградации галогенсодержащих ароматических соединений является их дегалогенирование. В литературе отмечена способность осуществлять дегалогенирование для многих родов основных почвенных бактерий, среди которых наиболее часто упоминаются *Pseudomonas* [2, 3].

Таким образом, целью научной работы являлось определение активности ферментов бактерий-деструкторов – дегалогеназ, являющихся ключевыми в процессах деградации галогенароматических пестицидов.

На первом этапе стационарные культуры бактерий разводили синтетической средой ММ9 с глюкозой (0,2%) и 2,4-Д(2-этилгексировый эфиром) (0,05%) инкубировали в конических колбах с аэрацией. Клетки отделяли центрифугированием, отмывали трижды изотоническим раствором  $\text{NaNO}_3$ , дезинтеграцию проводили 3-х кратным замораживанием-оттаиванием. Объем полученной суспензии дезинтегрированных клеток довели до 20 мл изотоническим раствором  $\text{NaNO}_3$ . В гомогенаты вносили 2,4-Д(2-этилгексировый эфир) в количестве 0,05% от объема суспензии и проводили измерения значений электродвижущей силы (ЭДС) на иономере ЭВ-74, оснащенный серебряным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения (внутри залит 1 М раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

Удельную активность дегалогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \Delta C / \tau \cdot C_6$$

где  $A$  – удельная активность дегалогеназы, моль·эquiv / мин·мг белка;

$\Delta C$  – разность концентраций  $Cl^-$ , моль·эquiv / л;

$C_6$  – концентрация белка, мг/мл;

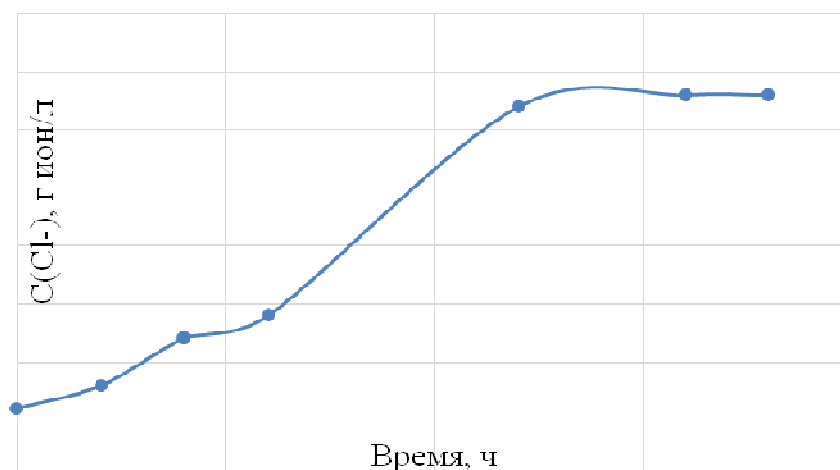
$\Delta t$  – промежуток времени, мин.

Поскольку при дегалогенировании органических соединений ферментными системами микроорганизмов в среде образуется стехиометрическое количество галогенид-ионов, 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, электрод заполняли 1 М раствором  $(NH_4)_2SO_4$ .

В экспериментах с отмытыми неразрушенными клетками бактерий-деструкторов после 2–3 ч регистрировали образование хлорид-ионов в анализируемой среде. Их образование свидетельствует о появлении в среде внеклеточных дегалогеназ. Таким образом, в экспериментах с клетками бактерий-деструкторов накопление хлорид-ионов в среде происходит за счет функционирования как внутри-, так и внеклеточных дегалогеназ. В связи с этим были рассчитаны удельные активности этих ферментов. Удельная активность внеклеточных дегалогеназ составляла  $6 \pm 1,5\%$  от активности внутриклеточного фермента, поэтому, в последующих экспериментах исследования проводили с внутриклеточными дегалогеназами.

Наращивание биомассы до середины логарифмической фазы роста осуществляли для получения клеток с наибольшей метаболической активностью, причем для индукции биосинтеза дегалогеназ в питательную среду вносили 2,4-Д (2-этилгексильный эфир). Клетки отделяли центрифугированием и подвергали дезинтеграции. Проводили анализ дегалогеназной активности. Так же для расчета удельной активности дегалогеназ определяли концентрацию белка по методу [4], которую использовали для расчета удельной дегалогеназной активности.

На рисунке 1 представлена кривая дегалогенирования 2,4-Д (2-этилгексильного эфира) ферментными системами бактерий М2.



**Рисунок 1 - Кривая дегалогенирования 2,4-Д (2-этилгексилового эфира) ферментными системами бактерий М2**

Полученная зависимость является типичной кинетической кривой ферментативной реакции и свидетельствует о достаточно высокой скорости дегалогенирования 2,4-Д (2-этилгексилового эфира) в первые 10 ч. Удельная активность дегалогеназа рассчитанная в точке на кинетической кривой, соответствующей максимальной скорости дегалогенирования составила  $A = (0,62 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$  моль·экв/ мин мг белка.

Полученные при выполнении настоящей работы результаты могут быть использованы для дальнейших исследований и разработок, направленных на создание препаратов для биоремедиации почв, загрязнённых такими пестицидами, как 2,4-Д(2-этилгексильный эфир).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Поведение пестицидов в окружающей среде. Биотическая и абиотическая их деградация / Л.А. Головлева [и др.]. – Агрохимия, 1987. – № 8, 132 с.
2. Bengtsson, G. Degradation of dissolved and sorbed 2,4-dichlorophenol in soil columns by suspended and sorbed bacteria / G. Bengtsson, S. Carlsson. – Biodegradation, 2001. – Vol. 12, № 6, 419-432 p.
3. Горбатова, О.Н. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации / О.Н. Горбатова, А.В. Жердев, О.В. Королева. – М.: Успехи биол. химии, 2006. – 523 с.
4. Ручай, Н. С. Экологическая биотехнология: учеб. пособие для студентов специальности «Биоэкология» / Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич – Минск: БГТУ, 2006. – 312 с.