

УДК 577.151.63

О. С. Игнатовец, Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович

Белорусский государственный технологический университет

**РОЛЬ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ В ДЕГРАДАЦИИ 2,4-Д И ТРИБЕНУРОН-МЕТИЛА**

Клетки многих бактерий, способных деградировать различные ксенобиотики, содержат гидроксилирующие ферментные системы с цитохромом P-450 в качестве терминальной оксидазы. Функционирование цитохром P-450-содержащей монооксигеназной системы требует участия оксидоредуктаз НАДФН · Н⁺- и НАДН · Н⁺-зависимых электронтранспортных цепей, цитохромов b₅ и P-450. С целью изучения роли НАДФН · Н⁺- и НАДН · Н⁺-зависимых электронтранспортных цепей бактерий в деградации 2,4-Д и ТУМ были измерены активности оксидоредуктаз с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками. Экспериментально установлено, что при замене углеводного субстрата на гербициды для штамма бактерий-деструкторов происходит увеличение всех видов НАДН · Н⁺-редуктазных активностей, при этом НАДФН · Н⁺-редуктазные активности увеличиваются незначительно. Разнонаправленные изменения активностей различных оксидоредуктаз объясняются различием химических реакций, протекающих на цитохроме P-450 в процессах деградации субстратов. Также установлено, что замена такого субстрата, как глюкоза, на гербициды вызывает активацию биосинтеза цитохромов b₅ и P-450 в клетках бактерий-деструкторов. Значительное увеличение содержания ферментов в клетках бактерий наблюдается в экспоненциальной фазе роста. Таким образом, можно сделать вывод, что цитохром P-450-зависимые монооксигеназные ферментные системы бактерий T4 являются ключевыми в биодеградации 2,4-Д и ТУМ. Активности оксидоредуктаз электрон-транспортной цепи и содержание цитохромов P-450 и b₅ у данных бактерий зависят от структуры субстрата.

Ключевые слова: монооксигеназы, цитохром P-450, цитохром b₅, НАДН · Н⁺-зависимая редуктаза, НАДФН · Н⁺-зависимая редуктаза, бактерии-деструкторы, пестицид, 2,4-Д, трибенурон-метил, спектрофотометрия.

O. S. Ignatovets, A. Feskova, V. N. Leontiev, T. I. Ahramovich

Belarusian State Technological University

**THE ROLE OF MONOOXYGENASE ENZYME SYSTEM
OF BACTERIA-DESTRUCTORS IN 2,4-D AND THRYBENURON-METHYL DEGRADATION**

The cells of many bacteria capable of degrading various xenobiotics contain hydroxylating enzyme systems with cytochrome P-450 as terminal oxidase. The functioning of the cytochrome P-450-containing monooxygenase system requires the participation of oxidoreductases NADPH · H⁺- and NADH · H⁺-dependent electron transport chains, cytochrome b₅ and P-450. In order to study the role of NADPH · H⁺- and NADH · H⁺-dependent electron transport chains of bacteria in 2,4-D and TUM degradation, the activities of oxidoreductases were measured using added electron acceptors, the redox potential of which allows them to interact with strictly defined carriers. It was experimentally established that when replacing a carbohydrate substrate with herbicides for a strain of bacteria- destructors, an increase in all types of NADH · H⁺-reductase activities occurs, while NADPH · H⁺-reductase activities increase slightly. The multidirectional changes in the activity of various oxidoreductases are explained by the difference in chemical reactions that occur on cytochrome P-450 in the processes of substrate degradation. It was also found that the replacement of a substrate such as glucose with herbicides causes activation of the cytochrome b₅ and P-450 biosynthesis in the cells of the bacterial-destructors. A significant increase in the content of enzymes in bacterial cells is observed in the exponential growth phase. Thus, we can conclude that cytochrome P-450-dependent monooxygenase enzyme systems of T4 bacteria are the key-note in the 2,4-D and TUM biodegradation. The activities of the oxidoreductases of the electron transport chain and the content of cytochromes P-450 and b₅ in these bacteria depend on the structure of the substrate.

Key words: monooxygenases, cytochrome P-450, cytochrome b₅, NADH · H⁺-dependent reductase, NADPH · H⁺-dependent reductase, bacteria-destructors, pesticide, 2,4-D, trybenuron-methyl, spectrophotometry.

Введение. Пестициды группы сульфонилмочевины, а также хлорароматические производные подвергаются деградации в окружающей среде в основном за счет ферментных систем микроорганизмов. Анализ литературы по деградации производных сульфонилмочевины с заместителями в боковой цепи в опытах с чистыми культурами грибов и бактерий позволил сделать предположение об окислительном отщеплении α -алкильных боковых цепей. В процессе биодеградации этих соединений важными являются реакции окислительного N-, O-, S-деалкилирования, дегалогенирования, гидроксирования, а также N- и S-окисления [1].

Все процессы биологического окисления катализируются тремя большими группами ферментов: дегидрогеназами, оксидазами, оксигеназами [2]. Реакции, катализируемые монооксигеназами, весьма разнообразны.

Для большинства ксенобиотков биодеградация сопровождается активацией молекулярного кислорода ферментом. В ходе процесса один атом активированной молекулы кислорода передается на субстрат, в то время как другой восстанавливается до воды.

Источниками монооксигеназ являются аэробные бактерии, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, метанотрофные бактерии и др. [3].

Бактериальные монооксигеназы можно разделить на 2 группы: флавиносодержащие ферменты и железосодержащие белки, действующие только в сочетании с другими белковыми компонентами. Представители первой группы, содержащие в качестве простетической группы ФАД или ФМН, изучены недостаточно.

Среди железосодержащих монооксигеназ наиболее изучены гемопротеины b-типа, активный центр которых присоединяет гидрофобный субстрат и молекулярный кислород. По своим характеристикам бактериальные гемопротеины относятся к группе цитохромов P-450. Указанный фермент характеризуется атипичным положением полосы Core его карбонильного комплекса в восстановленном состоянии при $\lambda = 450$ нм и содержит простетическую группу – производное гема – циклическую тетрагидропиррола (протопорфирина IX) с атомом железа (II), связанным хелатной связью в кольцевой системе [4]. Бактериальная монооксигеназная система состоит из цитохрома P-450, Fe, S-белка и флавопротеина – НАДН · H^+ -зависимой редуктазы. Механизмы функционирования цитохром P-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы хорошо изучены для животных клеток. Существует целый ряд доказательств того, что в микромире монооксигеназная система функционирует аналогичным образом.

Реакции окислительного дегалогенирования важны при разложении галогенароматических и галогеналифатических соединений. Такому окислению подвергаются галогенированные алкены, алканы с короткой цепью и некоторые галогенароматические соединения (рис. 1).

Новой интересной областью в энзимологии дегалогенирования являются исследования цитохрома P-450, который принимает участие в реакциях окислительного дезалкилирования, гидроксирования циклических соединений, алифатических соединений, N-окисления, восстановления азо- и нитросоединений.

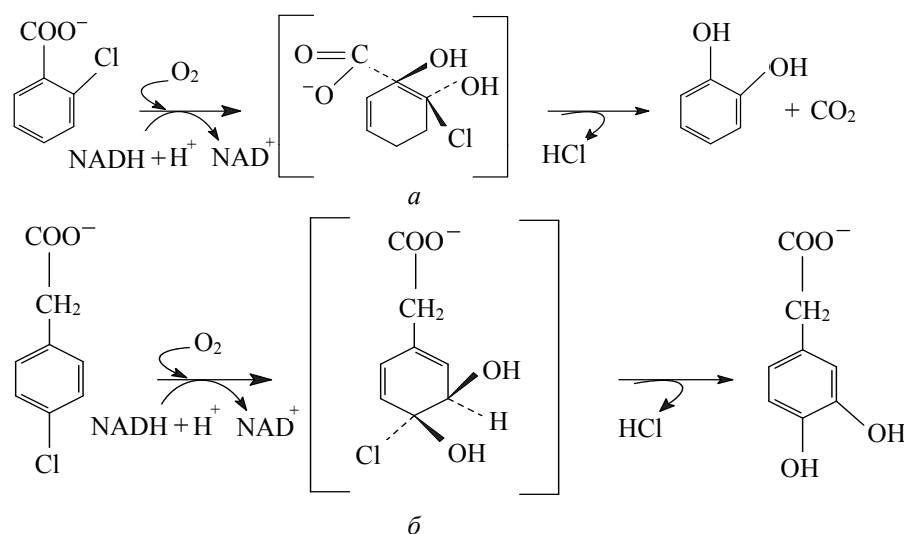


Рис. 1. Дехлорирование хлорароматических соединений с помощью бактериальных оксигеназ [5]:
 а – дехлорирование 4-хлорфенилацетата с помощью оксигеназы из *Pseudomonas sp.* CBS3;
 б – дехлорирование 2-галогенбензоата с помощью оксигеназы из *Pseudomonas sp.* CBS2

Таким образом, исследования, направленные на изучение ферментных систем микроорганизмов-деструкторов, позволяют изучить механизмы деградации ксенобиотиков, а также произвести отбор наиболее перспективных штаммов для создания биопрепаратов с целью ремедиации природных сред, загрязненных остаточными количествами пестицидов.

Основная часть. Объектами исследования в данной экспериментальной работе являлись почвенные бактерии-деструкторы 2,4-Д и трибенурон-метила (штамм Т4). Цель работы – изучение ферментных систем, участвующих в деградации 2,4-Д и трибенурон-метила (ТУМ), а также механизмов деградации указанных ксенобиотиков наиболее активным штаммом-деструктором.

При определении активностей оксидоредуктаз в клетках бактерий использовали акцепторы электронов: 2,6-дихлорфенолиндифенолят натрия (2,6-ДХФИФ), цитохром с, феррицианид калия $K_3Fe(CN)_6$ и неогетразолий синий (НТ). Активность НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : 2,6-ДХФИФ-, НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : цитохром с, а также НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : феррицианидредуктаз определяли по методу, описанному в источнике [6], а активность НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : НТ-редуктаз – по методу, описанному в источнике [7].

Измерение содержания цитохромов b_5 и Р-450 в клетках бактерий проводили спектрофотометрически по методу Омуры и Сато [8]. Определение содержания цитохрома b_5 основано на измерении разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм гемопротеина, а цитохрома Р-450 – на измерении величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома Р-450 с СО при 450 нм. В качестве восстановителя использовали дитионит натрия.

Количественное определение белка в суспензии бактерий проводили по методу Варбурга и Христиана [8]. Клетки бактерий разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора при частоте 44 кГц в течение 30 с.

Клетки бактерий родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Xanthobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, способных окислять ксенобиотики, содержат монооксигеназные ферментные системы с цитохромом Р-450 в качестве терминальной оксидазы. Функционирование цитохром Р-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы требует участия оксидоредуктаз НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ -зависимых электронтранспортных цепей, цитохромов b_5 и Р-450. С целью изучения роли НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ -зависимых электронтранспортных цепей бактерий в окислении различных по структуре субстратов были измерены активности оксидоредуктаз с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со стро-

го определенными переносчиками. Для этого нами была адаптирована методика измерения активностей оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в микросомах печени животных.

Принцип метода основан на определении измерения поглощения акцепторов электронов при переходе их из окисленной формы в восстановленную. Активность оксидоредуктаз или скорость переноса электронов в редокс-цепях может быть измерена по скорости окисления НАДН · H^+ или НАДФН · H^+ .

Определение активностей оксидоредуктаз осуществляли в дезинтегрированных ультразвуком клетках бактерий, выращенных на синтетической среде с 2,4-Д и ТУМ в качестве источников углерода, до середины логарифмической фазы роста, как наиболее метаболически активной. Экспериментально было установлено, что оптимальным режимом дезинтеграции клеток данных бактерий ультразвуком, при котором НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : $K_3Fe(CN)_6$ -редуктазные активности имеют максимальные значения, являются следующие условия: частота дезинтеграции 44 кГц, время дезинтеграции 30 с.

Для получения воспроизводимых результатов представлялось целесообразным выбрать оптимальную концентрацию белка, при которой значения оксидоредуктазных активностей практически не изменялись бы. Установлено, что оптимальной концентрацией белка для штамма-деструктора являются значения в пределах от 1 до 5 мг/мл, расположенные на начальных участках кривых зависимости НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : $K_3Fe(CN)_6$ -редуктазных активностей от концентрации белка, где данные редуктазные активности мало зависят от концентрации белка (рис. 2).

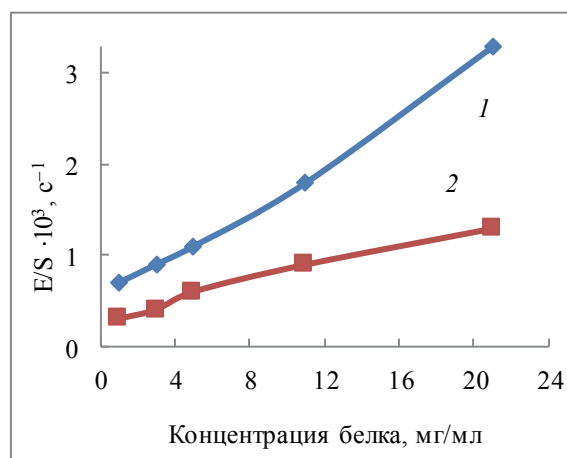


Рис. 2. Влияние концентрации белка на НАДН · H^+ - и НАДФН · H^+ : $K_3Fe(CN)_6$ -редуктазные активности:

1 – НАДН · H^+ : $K_3Fe(CN)_6$ -редуктазные активности;
2 – НАДФН · H^+ : $K_3Fe(CN)_6$ -редуктазные активности

Что касается концентрации белка в пробе при измерении остальных редуктазных активностей, эта величина также соответствовала значениям 1–5 мг/мл, которые были определены пропорционально количеству вносимого белка микросом.

На следующем этапе НИР в клетках бактерий, выращенных на различных субстратах, дезинтегрированных ультразвуком при 44 кГц в течение 30 с и добавленных в среду инкубации до концентрации белка 1–5 мг/мл, были измерены НАДН(Ф) · Н⁺-2,6-ДХФИФ-, НАД(Ф)Н · Н⁺-цитохром с-, а также НАД(Ф)Н · Н⁺-К₃Fe(CN)₆- и НАД(Ф)Н · Н⁺-НТ-редуктазные активности, значения которых приведены в табл. 1. Значения активностей оксидоредуктаз являются средними из трех измерений.

Как видно из таблицы, при замене углеводного субстрата на ксенобиотики происходит увеличение всех видов НАДН · Н⁺-редуктазных активностей за исключением НАДН · Н⁺-НТ-редуктазных активностей в клетках бактерий, выращенных на ТУМ, в то время как НАДФН · Н⁺-редуктазные активности увеличиваются незначительно. Небольшие изменения всех видов активностей

при использовании ТУМ в качестве субстрата могут объясняться тем, что пестициды группы сульфонилмочевин подвергаются деградации в большей степени за счет химического гидролиза, а биохимические процессы дают второстепенный вклад.

Максимальные значения НАДН · Н⁺- и НАДФН · Н⁺-феррицианидредуктазных активностей свидетельствуют о том, что наибольшее влияние ксенобиотики оказывают на активность НАДН · Н⁺-цитохром b₅-редуктаз и НАДФН · Н⁺-цитохром Р-450-редуктаз, участвующих в транспорте электронов от НАДН · Н⁺ и НАДФН · Н⁺ соответственно к цитохромам b₅ и Р-450. Это, в свою очередь, свидетельствует о непосредственном участии цитохромов b₅ и Р-450 в окислении субстратов клетками бактерий. Содержание гемопротеинов в этом случае непременно должно возрастать по сравнению с содержанием в клетках, выращенных на глюкозе. Для подтверждения данного факта нами было измерено содержание цитохромов b₅ и Р-450 в клетках данных бактерий, выращенных на различных субстратах, и в зависимости от фазы роста культуры (табл. 2).

Таблица 1

Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках бактерий, выращенных на различных субстратах (экспоненциальная фаза)

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин·мг белка			
	глюкоза	ТУМ + 2,4-Д	ТУМ	2,4-Д
НАДН : 2,6-ДХФИФ	1,71	2,35	1,70	1,98
НАДФН : 2,6-ДХФИФ	1,12	1,94	1,37	1,81
НАДН : цитохром с	1,02	1,73	1,15	1,42
НАДФН : цитохром с	0,12	0,29	0,19	0,22
НАДН : К ₃ Fe(CN) ₆	13,48	17,14	12,24	15,48
НАДФН : К ₃ Fe(CN) ₆	5,29	8,07	6,22	7,56
НАДН : НТ	0,17	0,32	0,19	0,21
НАДФН : НТ	0,09	0,15	0,11	0,14

Таблица 2

Содержание цитохромов b₅ и Р-450 в клетках бактерий, выращенных на различных субстратах и в зависимости от фазы роста бактерий

Субстрат	Содержание цитохрома b ₅ , нмоль/мг белка		Содержание цитохрома Р-450, нмоль/мг белка	
	экспоненциальная фаза	стационарная фаза	экспоненциальная фаза	стационарная фаза
Штамм Т4				
Глюкоза	0,01	0,01	0,03	0,02
2,4-Д + ТУМ	0,04	0,02	0,05	0,02
2,4-Д	0,02	0,01	0,04	0,02
ТУМ	0,02	0,01	0,03	0,01

Заключение. Таким образом, нами установлено, что в окислении 2,4-Д и ТУМ участвует цитохром Р-450-содержащая монооксигеназная ферментная система, имеющая 4 компонента, функционирующих 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. Активности оксидоредуктаз электрон-транспортной цепи и содержание цитохромов Р-450 и b₅ у данных бактерий зависят от структуры субстрата. Полученные данные можно использовать при изучении путей деградации ксенобиотиков сульфонилмочевины, а также галогенароматических производных.

Список литературы

1. Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management / Rijeka, Croatia: In Tech, 2011. 520 p.
2. Горбатова О. Н., Жердев А. В., Королева О. В. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации. М.: Успехи биол. химии, 2006. 523 с.
3. Wiseman A. W., King D. G. Microbial oxygenases and their potential application // Topics in enzyme a. fermentation biotechnology. Chichester. 1982. Vol. 6. P. 151–206.
4. Munro A. W., Lindsay Y. C. Bacterial cytochromes P-450 // Molecular Microbiology. 1996. Vol. 20, no 6. P. 1115–1125.
5. Solyanikova I. P., Golovleva L. A. Bacterial degradation of chlorophenols : pathways, biochemical, and genetic aspects // J. of Environmental Science a. Health. Pt. B : Pesticides, Food Contaminants, a. Agriculture Wastes. 2005. Vol. 39, no 3. P. 333–351.
6. Dallner G. Studies on the structural and enzymic organisation of the membraneous elements of liver microsomes // Acta Pathologica Microbiol. Scand. 1963. Suppl. 166. P. 1–194.
7. Roerig D. L., Mascaro L., Aust S. D. Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase // Arch. of Biochemistry a. Biophysics. 1972. Vol. 153, no 2. P. 475–479.
8. Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И. Биохимия. Лабораторный практикум. Минск, БГТУ, 2008. 216 с.

References

1. Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. Rijeka, Croatia: In Tech, 2011. 520 p.
2. Gorbatova O. N., Zherdev A. V., Koroleva O. V. *Triazinovyie pestitsidy: struktura, deystviye na zhivyye organizmy, protsessy degradatsii* [Triazine pesticides: structure, effects on living organisms, degradation processes]. Moscow, Uspekhi biologicheskoy khimii Publ., 2006. 523 p.
3. Wiseman A. W., King D. G. Microbial oxygenases and their potential application. *Topics in enzyme a. fermentation biotechnology. Chichester*, 1982, vol. 6, pp. 151–206.
4. Munro A. W., Lindsay Y. C. Bacterial cytochromes P-450. *Molecular Microbiology*, 1996, vol. 20, no 6, pp. 1115–1125.
5. Solyanikova I. P., Golovleva L. A. Bacterial degradation of chlorophenols : pathways, biochemical, and genetic aspects. *J. of Environmental Science a. Health. Pt. B : Pesticides, Food Contaminants, a. Agriculture Wastes*, 2005, vol. 39, no 3, pp. 333–351.
6. Dallner G. Studies on the structural and enzymic organisation of the membraneous elements of liver microsomes. *Acta Pathologica Microbiol. Scand*, 1963, Suppl. 166, pp. 1–194.
7. Roerig, D. L., Mascaro L., Aust S. D. Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase. *Arch. of Biochemistry a. Biophysics*, 1972, vol. 153, no 2, pp. 475–479.
8. Leont'yev V. N., Akhramovich T. I. *Biokhimiya. Laboratornyy praktikum* [Biochemistry. Laboratory practice]. Minsk, BGTU Publ., 2008. 216 p.

Информация об авторах

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatovets@belstu.by

Феськова Елена Владимировна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Ахрамович Татьяна Игоревна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ahramovich@belstu.by

Information about the authors

Ignatovets Olga Stepanovna – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

Feskova Alena – PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Leontiev Viktor Nikolaevich – PhD (Chemistry), Associate Professor, Head of the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Ahramovuch Tatyana Igorevna – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ahramovich@belstu.by

Поступила 20.04.2020