

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДЕГАЛОГЕНАЗ В ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРСОДЕРЖАЩИХ АРОМАТИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ

In the article the results of researches of microbial degradation chlorocontents aromatic xenobiotic ferment systems bacteria genus *Pseudomonas* are presented. Describe method determination of dehalogenase activity. The metabolites produced by selected strain during degradation 2-chlorophenol are identified by method HPLC-MS. The mechanism of degradation xenobiotic ferment systems bacteria genus *Pseudomonas* offered.

Введение. В окружающей среде в результате хозяйственной деятельности постоянно накапливаются ксенобиотики, которые представляют реальную и потенциальную опасность для человека и для биосферы в целом. Это различные пестициды, растворители и мономеры органического синтеза, красители и др. Многие из них являются галогенированными ароматическими соединениями. Наличие атомов галогенов обуславливает их высокую токсичность и устойчивость к деградации в окружающей среде. Основным фактором детоксикации ксенобиотиков в почве и воде является деятельность микроорганизмов, главным образом бактерий, и в частности тех, которые обладают ферментами, осуществляющими стадию дегалогенирования, – дегалогеназами. В литературе отмечена способность осуществлять дегалогенирование для многих родов основных почвенных бактерий: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* и др. [1–4]. У бактерий существуют разные механизмы дегалогенирования различных соединений. Чаще всего важные в промышленном отношении галогенированные органические соединения являются хлорпроизводными.

Известны три метаболических пути удаления атома хлора из ароматических соединений: 1) окислительное расщепление кольца, сопровождаемое либо нет стадией дегалогенирования; 2) дегалогенирование через гидроксирование – расщепление кольца может иметь место прежде, чем все хлорзаместители будут удалены, или ароматическое кольцо расщепляется после того, как все атомы галогена удалены; 3) восстановительное дегалогенирование – ароматическое кольцо атакуется после удаления атома галогена.

Бактерии рода *Pseudomonas* в течение ряда лет привлекают исследователей реальными перспективами использования в биотехнологических целях. Они обладают уникальной способностью осуществлять биотрансформацию различных природных и синтезированных соединений, а также выступать в качестве деструкторов галогенсодержащих ароматических ксенобиотиков.

Целью настоящей работы являлось создание метода определения активности дегалоген-

наз в клетках бактерий, а также выяснение возможных механизмов деградации хлорсодержащих ароматических ксенобиотиков бактериями рода *Pseudomonas*.

Материалы и методы. В работе использовали следующие реактивы: 2-хлорфенол, 3,4-хлорфенол, 2,4 хлорфенол («Реахим», РФ), диэтиловый эфир («Криохром», РФ), глюкозу (Fluka, Швейцария), метанол для ВЭЖХ (Merck, Германия). Симазин (2-хлор-4,6-бис(этиламино)-симм-триазин) был выделен из технического препарата экстракцией горячим ацетоном. Полученный таким образом симазин представлял собой белый мелкокристаллический порошок с $T_{пл} = 224–225^{\circ}\text{C}$.

В работе использовали штаммы микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* B-22, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas aurantica* B-162, отобранные из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Ранее нами была установлена способность штамма *P. aurantica* B-162 осуществлять деградацию симазина [5]. В работе [6] было продемонстрировано участие основного компонента монооксигеназной ферментной системы бактерий – цитохрома P450 в трансформации алифатических и алициклических соединений у штаммов *P. fluorescens* B-22, *P. aeruginosa* PAO1.

Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 50 мл жидкой синтетической среды на основе солевого концентрата ММ9. В качестве источника углерода и энергетического субстрата использовали глюкозу (0,2%). Индукцию дегалогеназ вызывали внесением в питательную среду хлорсодержащего ароматического ксенобиотика (5 мг/л). Культивирование бактерий осуществляли при 30°C на установке Environmental Shaker-incubator ES-20 «BioSan» в условиях аэрации (200 мин⁻¹). Время выращивания варьировали в зависимости от используемого штамма и ко субстрата в соответствии с кинетикой роста бактерий. Для определения активностей дегалогеназ использовали клетки бактерий в экспоненциальной фазе роста. Клетки осаждали путем центрифугирования при 6000 мин⁻¹ в течении 15 мин, от ионов Cl⁻ отмывали трижды 0,85%-ным раствором KNO₃, дезинтеграцию проводили

на установке УЗДН 2Т при частоте 44 кГц в течение 60 с. Объем полученной суспензии разрушенных клеток доводили до 20 мл 0,85% раствором KNO_3 . В гомогенаты вносили галогенсодержащие ксенобиотики в количестве 0,05% от объема суспензии. Параллельно ставили эксперимент по неферментативному дегалогенированию анализируемых ксенобиотиков. Изменение концентрации ионов Cl^- определяли с помощью иономера И-160, оснащенного хлорселективным электродом. Для калибровки электрода готовили стандартные растворы KCl с концентрациями, моль/л: $1 \cdot 10^{-3}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-5}$. Регистрацию и обработку данных проводили с помощью программного обеспечения для иономера «И-160». Количественное определение белка в суспензии бактерий проводили по методу Варбурга и Христиана на спектрофотометре «Specord M40» [7].

Удельную активность дегалогеназ рассчитывали по формуле:

$$A = \Delta C / \Delta t \cdot C_6,$$

где A – удельная активность дегалогеназы, моль/мин·мг белка; ΔC – разность концентраций Cl^- , г ион/л; C_6 – концентрация белка, мг/мл; Δt – промежуток времени, мин.

Экстракцию интермедиатов и продуктов деградации анализируемых ксенобиотиков проводили равным объемом диэтилового эфира. Эфирный экстракт упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и анализировали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Исследование деградации ксенобиотиков ферментными системами бактерий проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хромато-масс-спектрометра «Waters», оснащенного диодно-матричным детектором PDA 996 и масс-детектором «Micromass ZQ-2000» (ионизация – ESI) на колонке «BDS HYPERSIL C 18» длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм. 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. Параметры масс-спектрометрии были следующими: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 25 В, напряжение на экстракторе – 1 В, температура десольватации – 130°C, общий расход инертного газа – 400 л/ч, расход газа на конусе – 150 л/ч.

Результаты и их обсуждение. Как известно из литературных источников, первой стадией трансформации или деградации галогенсодержащих ароматических соединений является их дегалогенирование [4]. В связи с этим на первом этапе настоящей работы был разработан

метод определения дегалогеназной активности бактерий рода *Pseudomonas*.

В качестве модельных соединений использовали 2-хлорфенол, 3,4-хлорфенол, 2,4-хлорфенол, симазин. Выбор этих соединений обусловлен тем, что, во-первых, они являются структурными элементами многих ксенобиотиков; во-вторых, в литературе отсутствуют данные о зависимости активности дегалогеназ от типа замещения галогена. Кривые бактериального дегалогенирования анализируемых хлорфенолов представлены на рис. 1.

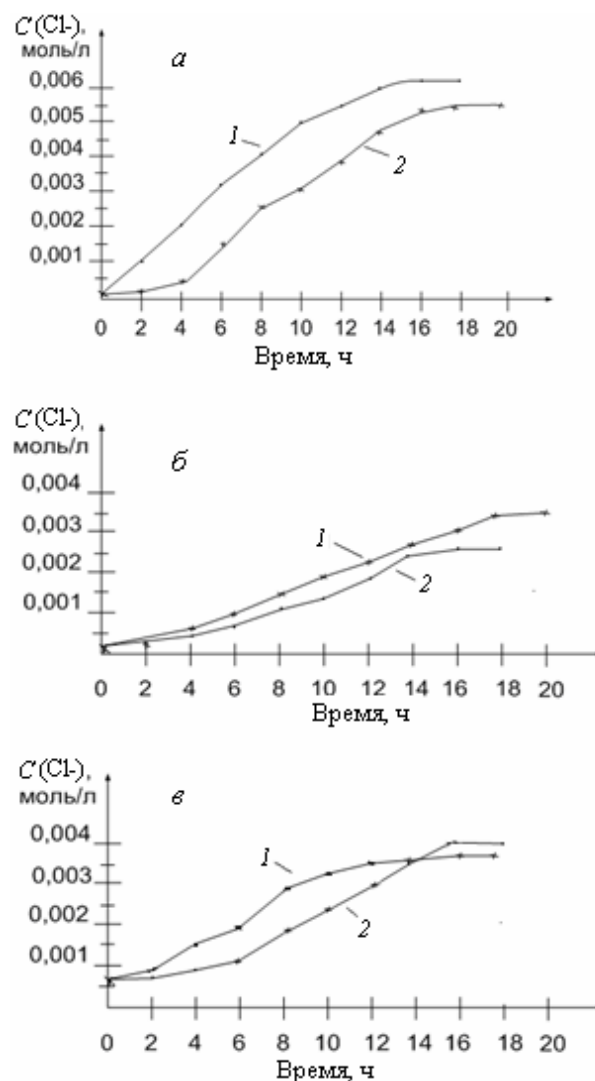


Рис. 1. Кинетические кривые дегалогенирования: 2-хлорфенола (а), 3,4-дихлорфенола (б),

2,4-дихлорфенола ферментными системами (в): 1 – *P. fluorescens* B-22; 2 – *P. aeruginosa* PAO1

Из рис. 1 видно, что скорость дегалогенирования зависит от структуры субстрата и более высокая для монохлорфенола. По мере увеличения числа атомов хлора в молекуле субстрата эффективность ферментативного дегалогенирования снижается, что обусловлено стерическими затруднениями. Для всех хлорфенолов

характерна более высокая скорость дегалогенирования ферментными системами штамма *P. fluorescens* B-22.

На рис. 2 представлена кривая дегалогенирования симазина ферментными системами штамма *P. aurantica* B-162.

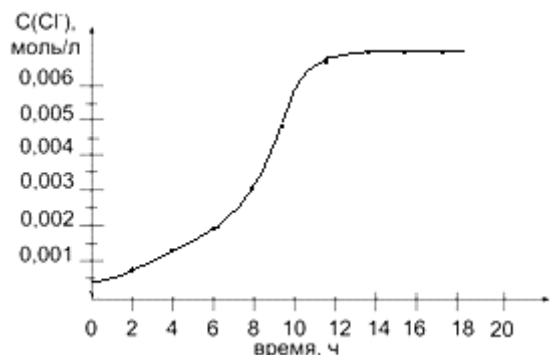


Рис. 2. Кинетическая кривая дегалогенирования симазина ферментными системами штамма *P. aurantica* B-162

В таблице представлены значения удельных активностей дегалогеназ, рассчитанные в точке на кинетической кривой, соответствующей максимальной скорости дегалогенирования. Анализ приведенных данных показывает, что

все исследуемые штаммы обладают дегалогеназной активностью, более высокая активность отмечена у дегалогеназ штамма *P. aurantica* B-162, выращенных в присутствии симазина. Мы склонны считать, что это связано со способностью этого штамма использовать симазин свободноживущими клетками в качестве ростового субстрата, в результате чего клетки должны синтезировать дополнительное количество этого фермента для трансформации в более гидрофильные соединения с последующим включением в свой метаболизм.

Отмечается более существенное изменение активностей дегалогеназ в пределах одного штамма, выращенного на разных косубстратах, например для *P. fluorescens* B-22 дегалогеназная активность при переходе от 2-хлорфенола к 3,4-хлорфенолу уменьшается примерно в 2 раза.

Следующим этапом работы явилось изучение возможных продуктов трансформации хлорфенолов штаммом *P. fluorescens* B-22 с использованием метода ВЭЖХ-МС. На рис. 3 представлена хроматограмма продуктов трансформации 2-хлорфенола ферментными системами штамма *P. fluorescens* B-22.

Пик, обозначенный цифрой 1, является пиком трансформируемого вещества, а пики, обозначенные цифрами 2–4, соответствуют продуктам деградации.

Таблица

Удельная активность дегалогеназ А, $\times 10^{-2}$ моль/мин·мг белка

Штамм	2-Хлорфенол	3,4-Хлорфенол	2,4-Хлорфенол	Симазин
<i>P. fluorescens</i> B-22	1,14	0,52	0,93	—
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,97	0,40	0,86	—
<i>P. aurantica</i> B-162	—	—	—	4,8

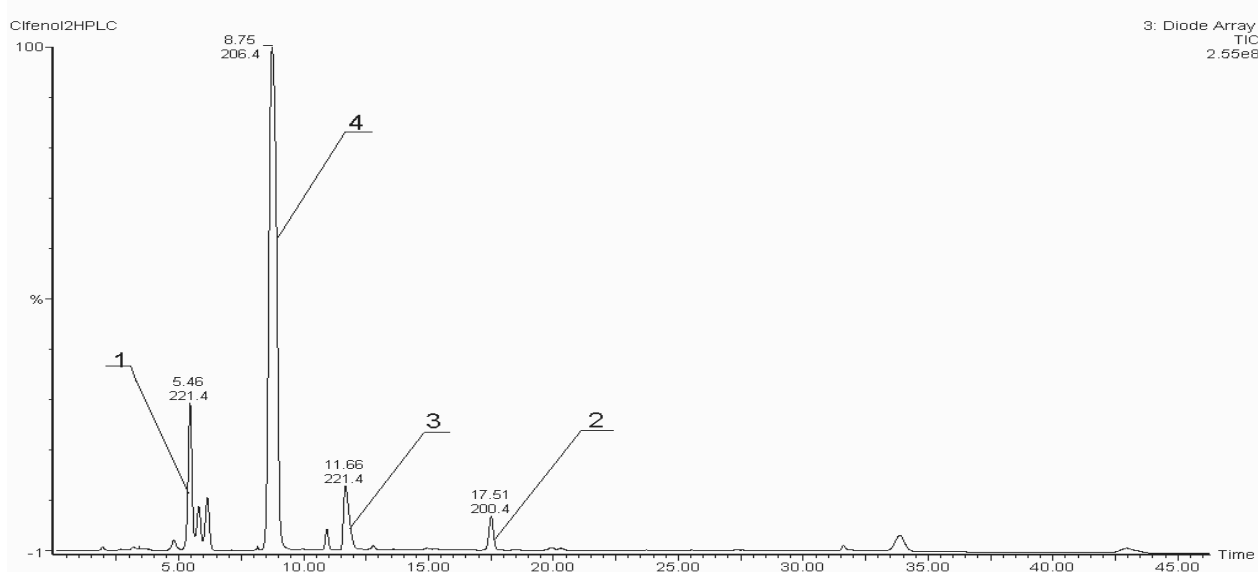


Рис. 3. Хроматограмма продуктов трансформации 2-хлорфенола ферментными системами штамма *P. fluorescens* B-22

В связи с тем что молекулярная масса 2-хлорфенола составляет 128 Da, его на хроматограммах идентифицировали в области отрицательных ионов по молекулярному иону $[M-H]^-$ с m/z 127,2 и в области положительных ионов – по иону $[M+H]^+$ с m/z 129,2. Анализ хроматомасс-спектров продуктов биodeградации всех анализируемых хлорфенолов в области отрицательных ионов показывает наличие пиков с m/z 144,03 и 137,23. Можно предположить, что они обусловлены депротонированными хлорпирокатехином и диенелактоном соответственно. Сигнал в области отрицательных ионов с m/z 110,08 соответствует пирокатехину. Для дополнительной идентификации были записаны электронные спектры анализируемых соединений, что позволило однозначно подтвердить идентифицированные структуры.

В области низких молекулярных масс наблюдается достаточно интенсивный сигнал с m/z 78,84, который является основным продуктом ферментативной реакции. Данное соединение можно отнести к двузарядному иону maleilacetate.

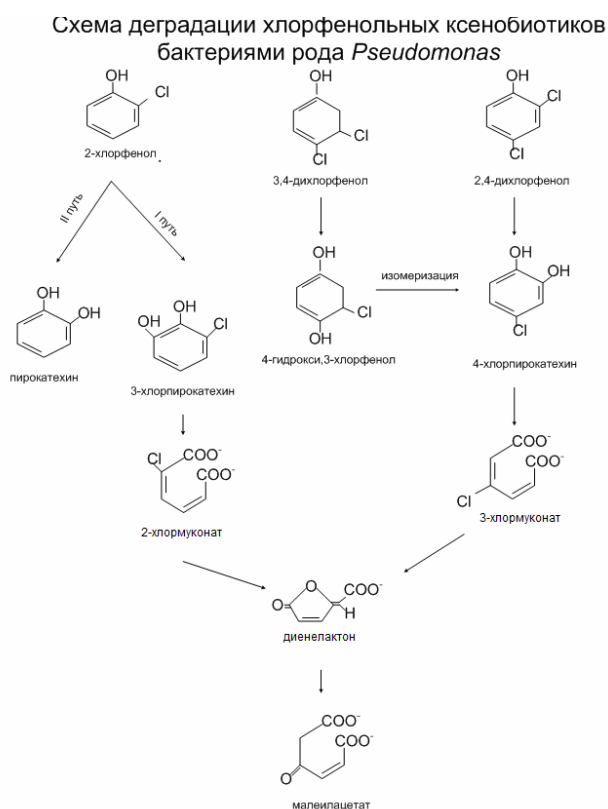


Рис. 4. Возможный механизм деградации хлорфенолов ферментными системами бактерий рода *Pseudomonas*

На основании полученных результатов и данных литературы [8] нами предложен возможный механизм деградации хлорфенолов (рис. 4) бактериями рода *Pseudomonas*.

Закключение. Разработан метод определения дегалогеназной активности в клетках бактерий рода *Pseudomonas*, идентифицированы продукты деградации и трансформации хлорфенольных соединений ферментными системами отобранных штаммов.

Обнаружен путь деградации монохлорфенола, не описанный в литературе, протекающий, вероятнее всего, с участием цитохрома P450 и включающий одновременное дегалогенирование и гидроксирование в орто-положение по отношению к 1-й гидроксильной группе 2-хлорфенола.

Литература

1. Haggbloom, M. M. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction / M. M. Haggbloom, L. Y. Young // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – V. 56. – P. 3255–3260.
2. Reineke, W. Microbial degradation of haloaromatics / W. Reineke, H.-J. Knackmuss // *Annual Review of Microbiology*. – 1988. – № 42. – P. 263–287.
3. Fetzner, S. Bacterial dehalogenase: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications / S. Fetzner // *Microbiol. Rev.* – 1994. – V. 58, № 4. – P. 641–685.
4. Fetzner, S. Bacterial dehalogenation / S. Fetzner // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – № 50. – P. 633–657.
5. Механизм деградации симазина бактериями рода *Pseudomonas* / О. С. Игнатовец [и др.] // *Доклады НАН Беларуси*. – 2006. – Т. 51, № 2. – С. 61–64.
6. Роль цитохром p-450-зависимых монооксигеназных ферментных систем в биodeградации ароматических галогенсодержащих ксенобиотиков / И. М. Бурак [и др.] // *Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органич. в-в.* – 2003. – Вып. XI. – С. 118–121.
7. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 345 с.
8. Solyanikova, I. P. Bacterial Degradation of Chlorophenols: Pathways, Biochemical, and Genetic Aspects / I. P. Solyanikova, L. A. Golovleva // *Journal of environmental science and health. Part B – Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. – 2004. – V. 39, № 3. – P. 333–351.