

циду. Для бактерий *B. subtilis* и биоцида ПГМГ эта величина составила 0,010 %, для *E. coli* и ХГ – 0,015 %.

Как показывают данные таблицы после адаптации микроорганизмов в присутствии антисептиков уровень подавления тепловыделения клеток снижается, что указывает на образование резистентных форм клеток.

Таблица

Характеристика подавления тепловыделения *Pseudomonas aeruginosa* до и после 3-х суточной адаптации клеток в присутствии антимикробных веществ

Антимикробный препарат	Концентрация микроорганизма, кл/мл	Концентрация препарата, %	Уровень подавления тепловыделения, %	
			до адаптации	после адаптации
Хлоргексидин	10^7	0,05	100	60
Гефал	10^7	0,09	60	10
Септомирин	10^8	0,01	100	45

Метод микрокалориметрии позволяет быстро оценить активность антимикробных препаратов, определить бактериостатический и биоцидный эффекты их действия на микроорганизмы и провести анализ адаптационных свойств микроорганизмов.

Литература

1. Имшенецкий, А.А. Адаптация у микроорганизмов. – М.: Изд-во ин. лит., 1956. – 519 с.
2. Игнатенко А.В., Гриц Н.В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия. Лабораторный практикум. – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.
3. Феофилова, Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикладная биохимия и микробиология – 2003. – Т.39, № 1. – С.5–24.

МЕХАНИЗМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ СИМ-ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

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

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь
leontiev@bstu.unibel.by

Сим-триазиновые гербициды применяются, в основном, для борьбы с сорными растениями на посевах ряда полевых и овощных культур. По масштабам производства и потребления сим-триазины – одна из ведущих групп гербицидов [1]. В результате их многолетнего повсеместного применения и высокой персистентности весьма реальна опасность стойкого загрязнения почвы и водоемов, как сим-триазинами, так и токсичными продуктами их трансформации. В настоящее время в основе технологий биоремедиации окружающей среды лежит интродукция микроорганизмов деструкторов. Незначительные перестройки молекул химических соединений под действием ферментных систем микроорганизмов часто полностью снимают токсичность ксенобиотиков для живых организмов, но в некоторых случаях образующиеся интермедиаты обладают еще большей токсичностью, чем исходные сим-триазины. С этой точки зрения становится очевидной необходимость в получении информации о механизмах биотрансформации ксенобиотиков триазинового ряда. Целью настоящей работы явилось изучение путей биодеградации сим-триазиновых гербицидов почвенными бактериями рода *Pseudomonas*.

В качестве объектов исследований были использованы симазин (2-хлор-4,6-бис(этиламино)-симм-триазин) и прометрин (2-метилтио-4,6-бис(изопропиламино)-симм-триазин), которые были получены из технических препаратов перекристаллизацией из ацетона. Ранее нами были отобраны чистые культуры бактерий, способные полностью разлагать данные гербициды, а также были проведены работы по исследованию ключевых ферментов деградации симм-триазиновых гербицидов штаммами-деструкторами. Нами отмечалось возможное участие в деградации этих соединений основного компонента монооксигеназной ферментной системы бактерий – цитохрома P450 [2]. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* В-7 обладал способностью использовать прометрин в качестве ростового субстрата. Штамм *Pseudomonas aurantica* В-162 использовал симазин в качестве единственного источника углерода и энергии.

При изучении механизмов деградации прометрина и симазина в разных системах (периодическое культивирование и модельные почвенные системы) нами был разработан метод идентификации промежуточных продуктов биотрансформации, а также количественного определения анализируемых пестицидов. Экстракцию гербицидов и их метаболитов из модельных почвенных систем осуществляли метанолом, из культуральной жидкости – диэтиловым эфиром. Метанольную фракцию центрифугировали, супернатант анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Эфирную фракцию сушили безводным сульфатом натрия, эфир упаривали, а остаток растворяли в подвижной фазе и подвергали хроматографическому анализу.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Waters (США), с использованием колонки BDS HYPERSIL C 18, 250*4,6 мм, 5 мкм (Thermo Electron Corporation). В качестве подвижной фазы при разделении симазина и промежуточных продуктов использовали смесь деионизированной воды и ацетонитрила, с 0,1 % муравьиной кислоты (v/v). Оптимальное разделение симазина и промежуточных продуктов его деградации происходило при следующем составе элюирующей смеси: 0–5 мин – содержание ацетонитрила изменялось от 50 до 80 %, 5–10 мин – поддерживалось на уровне 80 %, 10–15 мин – линейно увеличивалось до 100 %, 15–40 мин – поддерживалось на уровне 100 %. Скорость подачи элюента – 0,7 мл/мин. Регистрацию осуществляли при помощи диодно-матричного детектора PDA 996 в диапазоне длин волн 200–400 нм. Объем пробы – 25 мкл.

При разделении прометрина и продуктов его деградации в качестве подвижной фазы применяли смесь 0,05 М аммоний ацетатного буфера (рН 5,2) и метанола с 0,1 % муравьиной кислоты (v/v). Состав элюирующей смеси: 0–5 мин – содержание метанола поддерживалось на уровне 80 %, 5–10 мин – линейно увеличивалось с 80 до 100 %, 10–25 мин – поддерживалось на уровне 100 %. Количественное определение гербицидов проводили методом абсолютной калибровки. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы анализируемых гербицидов.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме отрицательных и положительных ионов с помощью масс детектора «Waters Micromass ZQ-2000» (ионизация – ESI). Обработку результатов осуществляли при помощи пакета «Mass Lynx».

Симазин подвергается трансформации штаммом-деструктором с образованием четырех устойчивых интермедиатов (рисунок 1).

На первой стадии биodeградации симазина образуется его гидроксипроизводное, имеющее молекулярный ион с m/z 184,5. На следующих стадиях деградации образуются 2-окси-4,6-бис(амино)-симм-триазин и циануровая кислота. Среди интермедиатов деградации симазина нами впервые выявлен молекулярный ион соединения, образованного дегидратацией двух молекул гидроксипроизводного симазина с m/z 349,7.

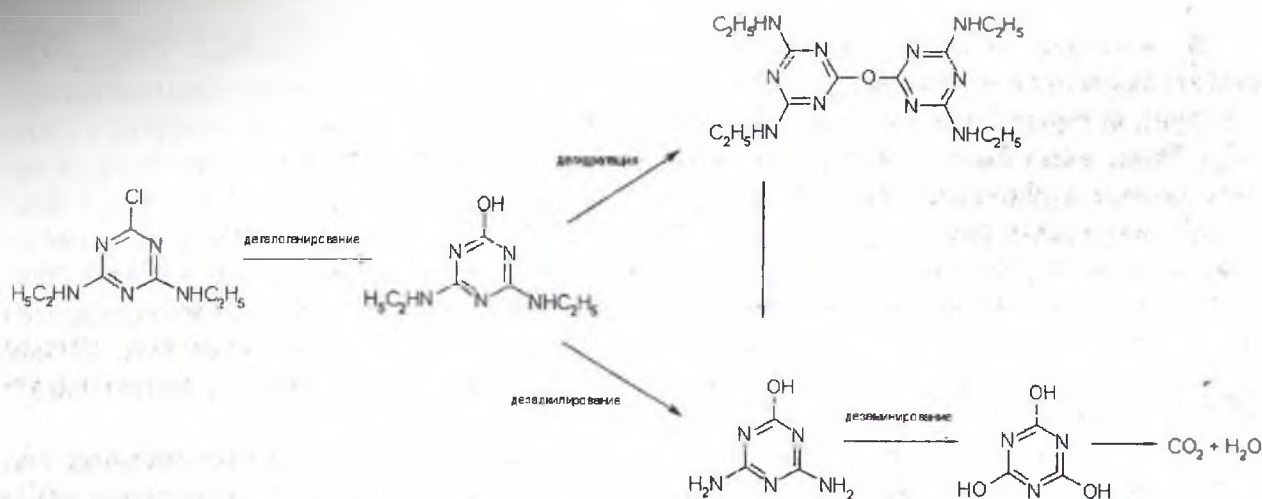


Рис. 1. Механизм деградации симазина ферментными системами штамма *P. aurantica* В-162.

При микробной деградации прометрина нами идентифицированы три метаболита (рисунок 2): сульфоксид (m/z 258,1) и сульфон прометрина (m/z 274,8), а также циануровая кислота (m/z 130,2). Анализ изменения содержания образующихся метаболитов прометрина показывает, что концентрации сульфоксида и сульфона прометрина в КЖ сначала увеличивается, а затем существенно снижается и остается на некотором постоянном уровне.

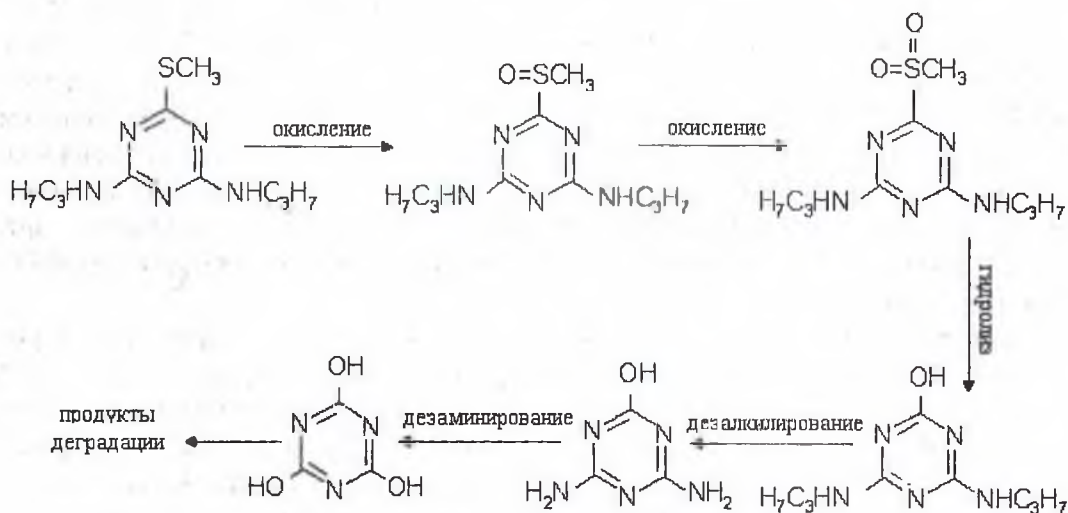


Рис. 2. Механизм деградации прометрина ферментными системами штамма *P. aeruginosa* В-7.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали возможность деградации сим-триазиновых гербицидов почвенными бактериями рода *Pseudomonas* и позволили предложить механизмы биотрансформации.

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. Леонтьев В.Н., Ахрамович Т.И., Бурак И.М. Цитохром Р450-содержащие монооксигеназные ферментные системы бактерий рода *Pseudomonas*. Матер. междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия». Минск, 2002. – С.48–49.