

ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНТЕРМЕДИАТОВ ДЕГРАДАЦИИ ПРОМЕТРИНА БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

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

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь, e-mail: leontiev@bstu.unibel.by

Сим-триазиновые гербициды применяются, в основном, для борьбы с однолетними двудольными и однодольными растениями. 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. [2]. 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 минерализацию сим-триазинов. Одним из распространенных сим-триазиновых пестицидов является прометрин (2-метилтио-4,6-бис(изопропиламино)-1,3,5-триазин). В зависимости от агроэкологических условий персистентность его в почве составляет от 1 до 18 месяцев. Период полураспада прометрина в почве в полевых условиях от 14 до 158 дней (в среднем 50 дней). Следует отметить недостаток имеющихся в литературе данных о бактериальном разложении триазинов. Учитывая выше изложенное, а также тот факт, что бактерии рода *Pseudomonas* являются одними из основных почвенных бактерий, целью настоящей работы явилось изучение возможности биodeградации прометрина бактериями рода *Pseudomonas* с участием монооксигеназных ферментных систем, а также идентификация интермедиатов и продуктов деградации гербицида.

Нами была проведена работа по отбору штамма-деструктора прометрина из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* В-7 обладал способностью использовать прометрин в качестве ростового субстрата. Прометрин был выделен из технического препарата экстракцией горячим ацетоном. Полученный таким образом гербицид представлял собой белый мелко кристаллический порошок с $T_{пл}$ 120°C. Количественный анализ прометрина в культуральной жидкости проводили методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Пробы культуральной жидкости объемом 3 мл отбирали с интервалом 6 ч с начала ферментации. Клетки отделяли центрифугированием, прометрин и продукты его биodeградации из супернатанта экстрагировали диэтиловым эфиром, эфирный слой отделяли, сушили безводным Na_2SO_4 , эфир упаривали, а сухой остаток растворяли в 1,0 мл подвижной фазы и анализировали 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».

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа прометрина и продуктов его деградации в культуральной жидкости бактерий *P. aeruginosa* В-7 представлены на рисунке 1.

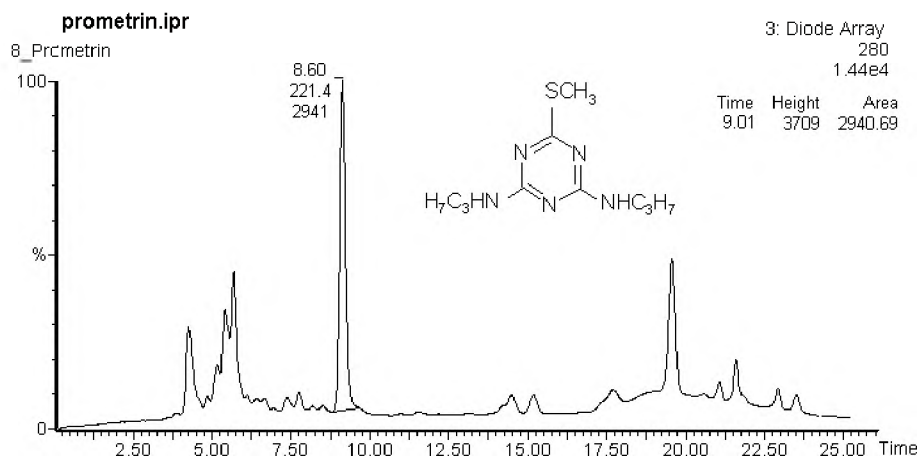


Рисунок 1. Хроматограмма прометрина и промежуточных продуктов его деградации.

Хроматографический пик с временем удержания 8,6 мин соответствует прометрину. Для исследования изменения концентрации прометрина в КЖ использовали калибровочный график, для

построения которого использовали стандартные растворы прометрина с концентрацией мг/мл: 0,02, 0,05 и 0,1.

Скорость деградации прометрина бактериями зависела от фазы роста. Интенсивное потребление гербицида культурой клеток происходило в период экспоненциальной фазы роста. К выходу культуры на стационарную фазу роста, содержание прометрина в КЖ составляло около 15 % от исходного, после этого скорость деградации гербицида существенно снижалась.

Для выяснения механизма деградации прометрина идентифицировали интермедиаты в КЖ. На рисунке 2 представлены масс-спектры идентифицированных соединений, принадлежащие прометрину, его монооксопроизводному – сульфоксиду, а также сульфону и циануровой кислоте. В связи с тем, что молекулярная масса прометрина составляет 241 Da, его на хроматограммах идентифицировали в области отрицательных ионов по молекулярному иону $[M-H]^-$ с m/z 240,7 и в области положительных ионов – по иону $[M+H]^+$ с m/z 242,7.

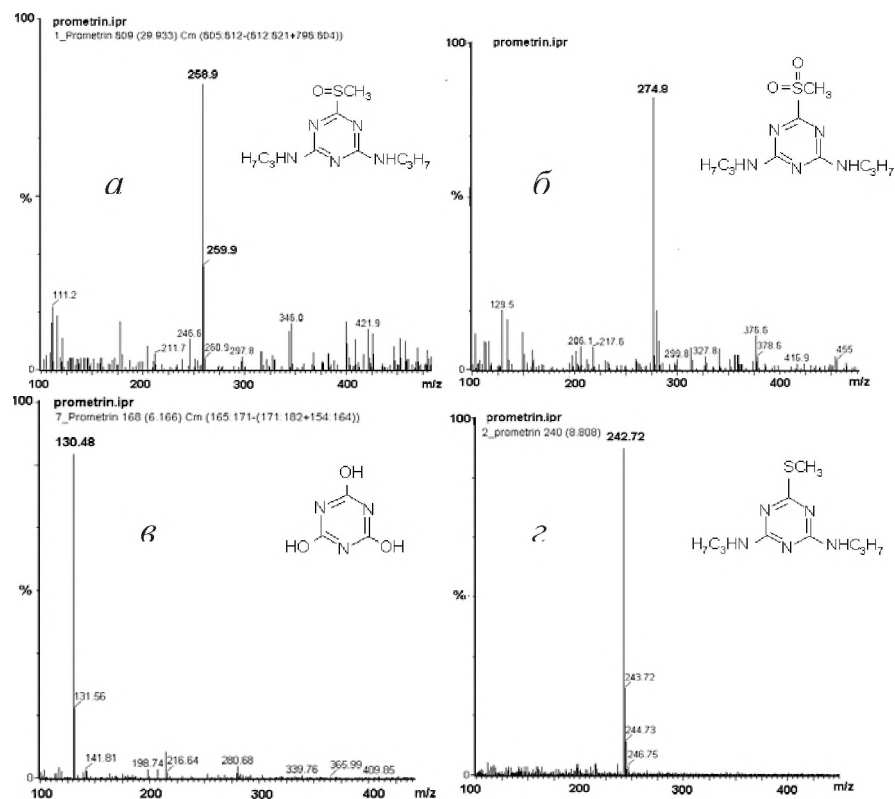


Рисунок 2. Масс-спектры сульфоксида прометрина (а), сульфона прометрина (б), циануровой кислоты (в), прометрина (г)

Из рисунка 2 видно, что пик с m/z 258,1 обусловлен протонированным сульфоксидом прометрина $[M+H]^+$ и пик с m/z 274,8 соответствует сульфону прометрина $[M+H]^+$, циануровую кислоту идентифицировали в области положительных ионов по пику с m/z 130,4.

Для дополнительной идентификации анализируемых соединений регистрировали их электронные спектры. Спектральный анализ показал, что все они имеют максимум поглощения с $\lambda = 221$ нм. Это свидетельствует о том, что продукты трансформации прометрина имеют близкие спектральные характеристики, поскольку содержат одинаковую хромофорную группу. Этот вывод согласуется с данными литературы [3].

На основании проведенных исследований и данных литературы [4], нами предложен механизм деградации прометрина ферментными системами штамма бактерий *P. aeruginosa* B-7 (рисунок 3).

В результате проведенных исследований: отобран штамм бактерий рода *Pseudomonas*, использующий прометрин в качестве единственного источника углерода и энергии; разработана методика количественного анализа прометрина и промежуточных продуктов его деградации в КЖ; изучена кинетика биodeградации прометрина; на основании проведенных исследований предложен возможный механизм деградации прометрина ферментными системами бактерий *P. aeruginosa* B-7.

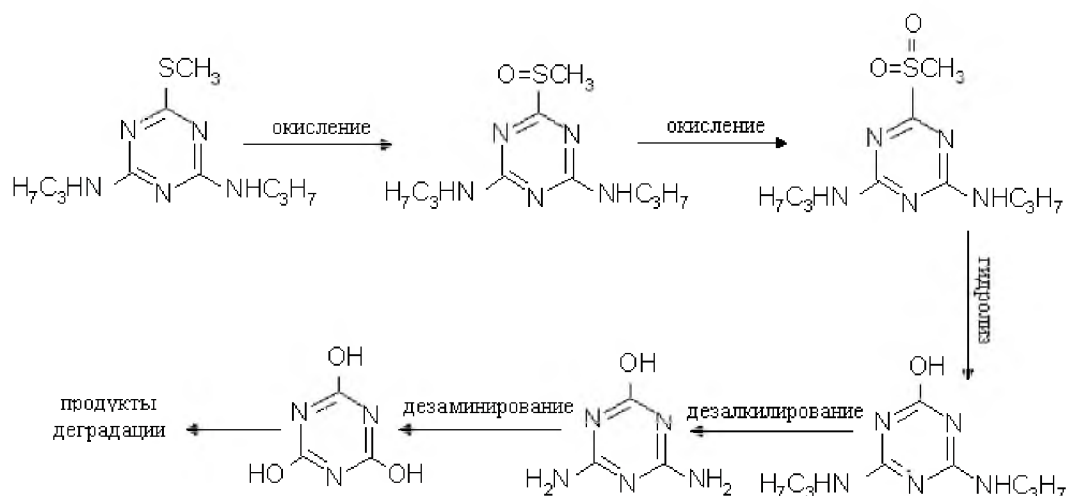


Рисунок 3. Возможный механизм деградации прометерина ферментными системами бактерий штамма *Pseudomonas aeruginosa* B-7

Список литературы

1. Самгин П.А. Инактивация и передвижение триазиновых гербицидов в почве. М., 1975. – 60 с.
2. Каспаров, В.А., Промоненков, В.К. Применение пестицидов за рубежом. М., 1990. – 224 с.
3. Ward T.M., Weber J.B. Ultraviolet absorption spectra of alkylamino-s-triazines. // Spectrochim. acta. – 1969. – V. 25, № 7. – P. 1167–1176.
4. Триазиновые пестициды: структура, действие на живые организмы, процессы деградации. / О.Н. Горбатова [и др.]. // Успехи биологической химии. – 2006. – Т.46. – С. 323-348

ЛЕГЕНДА СИБИРСКОЙ ТАЙГИ – КСИЛОТРОФНЫЙ БАЗИДИОМИЦЕТ

Огарков Б.Н.¹, Теплякова Т.В.², Огаркова Г.Р.¹, Самусенок Л.В.¹

¹Научно-исследовательский институт биологии при Иркутском государственном университете, Иркутск, Россия, e-mail: bornik@bk.ru

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск, Россия, e-mail: mushroom@online.sinor.ru

Среди ксилотрофных базидиомицетов встречается довольно большое количество лекарственных грибов. Это такие широко известные грибы, как *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, которые в странах Юго-Восточной Азии использовались еще в глубокой древности как лекарственные средства.

Наиболее известная группа в порядке афиллофоровых грибов, обладающие выраженными лекарственными свойствами, трутовые грибы, вызывающие поражение и последующую гибель деревьев. Вегетативное тело гриба развивается и функционирует в древесине живых или мертвых стволов, корней, пней. Многие из трутовых грибов хорошо изучены и используются в качестве лекарственного сырья, это такие грибы, как трутовик косотрубчатый (чага), лиственничная губка. Но среди грибов трутовиков в сибирской тайге есть виды, которые с полным правом можно отнести к легенде из-за их редкой встречаемости и обладающие высокими стимулирующими свойствами.

Гриб встречается на березе. Наиболее полное описание есть у известного знатока сибирской лекарственной флоры В.В.Телятьева. «Из-под коры добывают особый продукт, называемый шультой или шульпой. Он образуется на месте морозобоин и, вероятнее всего, представляет собой гриб, но не трутовик косотрубчатый, поселяющийся на скопившемся в образовавшейся полости соке, а представляет черно-бурые листовидные, тонкие, длинные, сморщенные пластинки, как бы собранные при