

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что повышенная продукция феназинов у штаммов–продуцентов *P. aurantiaca* коррелирует с возрастанием активности отдельных компонентов антиоксидантного комплекса. Наибольший вклад в этот процесс вносит каталаза, индукция синтеза которой возрастает в 10,8 раза и находится в прямой зависимости от уровня синтеза феназиновых антибиотиков. Аналогичная ситуация характерна и для суммарной концентрации глутатиона. Вместе с тем, установлено, что NADH–оксидаза не участвует в ответе клеток на окислительный стресс, вызываемый феназинами, так как ее удельная активность не меняется при увеличении продуктивности штаммов. Интересно отметить, что для СОД и глутатион–редуктазы зарегистрирован взаимный компенсаторный эффект. Например, для штамма В–162/55 при увеличении уровня активности СОД синтез глутатион–редуктазы снижается, а для штамма В–162/255, наоборот, уровень активности СОД снижается, а глутатион–редуктазы повышается. Подобная картина ранее была зарегистрирована для бактерий *Lactococcus lactis* при изучении окислительного стресса, вызванного перекисью водорода [4].

1. Соколов М.С., Литвишко Е.В. Биологическая защита растений в США // Защита растений. 1993. №10. С. 11–15
2. Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Thomashow L.S. Phz O, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 // J. Bacteriol. 2001. V. 183. №1. P. 318–327.
3. Ермолаева Н.И., Иванова Н.И., Скворцова Н.П., Мордехова Е.А., Вертохина Н.А., Кочетков В.В., Боронин А.М. Биопрепараты на основе ризосферных псевдомонад // Защита растений. 1992. №8. с. 24–25.
4. Yin Li, Jeroen Hugenholtz, Tjakko Abee, Douwe Molenaar. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress // Appl. Envir. Microbiol. 2003. V. 69. №10 P. 5739–5745
5. Levitch M.E., Stadtman E.R. A study of the biosynthesis of Phenazine–1–carboxylic acid // Arch. Biochem. Biophys. 1964. V. 106. P. 194–199.
6. Hassett D. J. Schweizer H. P., Ohman D. E. *Pseudomonas aeruginosa* sod A and sod B mutants defective in manganese and iron–cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron–cofactored form in aerobic metabolism. // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – №12. p. – 6330–6337.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ БИОДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА ПЛАЗМИДОСОДЕРЖАЩЕГО ШТАММА *PSEUDOMONAS* SP.142NF (pNF142) ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Е.П. Власова¹, И.Ф. Пунтус², К.В. Петриков¹, А.Е. Филонов^{1,2}, О.Н. Пономарева¹

¹ - Тульский государственный университет, Тула, Россия

² - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццино, Россия
simcem@list.ru

Для успешного использования микроорганизмов с целью очистки окружающей среды требуется детальное изучение их катаболических путей, а также ключевых ферментов, катализирующих деструкцию поллютантов. К настоящему времени накопилось достаточно много фактов, свидетельствующих в пользу того, что в деградации многих полициклических ароматических углеводородов участвуют ферменты с широкой субстратной специфичностью, известные и хорошо изученные как ферменты биodeградации нафталина [1].

Пути деградации нафталина у бактерий рода *Pseudomonas* детально изучены рядом авторов. Расщепление нафталина происходит через образование салициловой кислоты, которая окисляется далее через катехол. Катехол расщепляется по двум альтернативным путям: 1) *мета*-пути с образованием ацетальдегида и пирувата или 2) *орто*-пути с образованием сукцината и ацетата. Гораздо реже окисление салициловой кислоты осуществляется через образование гентизиновой кислоты [2]. В ряде нафталин-деградирующих штаммов окисление катехола происходит по *орто*-пути или параллельно,

как по *орто*- так и по *мета*- пути [3]. При окислении ароматических соединений *мета*-путь расщепления катехола контролируется, как правило, плазмидными генами, тогда как *орто*-путь - хромосомными.

Ранее было показано, что нафталиндиоксигеназа и ряд других ферментов метаболизма нафталина индуцируется в клетках псевдомонад салицилатом, а также его структурными аналогами [4].

Плазмидосодержащий штамм *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142), выделенный как деструктор нафталина из почв, загрязненных нефтепродуктами, эффективно деградирует нефть, мазут и дизельное топливо и входит в состав биопрепарата для очистки почв от нефтепродуктов в условиях низких температур. Этот штамм использовался в настоящей работе.

Для того чтобы оценить удельные активности ключевых ферментов деградации нафталина в зависимости от состава питательной среды и условий культивирования штамм *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) выращивали в колбах на минимальной минеральной среде Эванса с нафталином или салицилатом в качестве единственного источника углерода, а также на богатой среде КГК (кислотный гидролизат казеина) ДА (дрожжевой автолизат) в ферментере с добавлением салицилата в качестве индуктора ферментов биodeградации нафталина (ферментация №1) или дизельного топлива (ферментация №2) для индукции синтеза биоэмульгаторов. Количество биомассы и белка было намного выше при выращивании на богатых средах, что является закономерным, поскольку выращивание микроорганизмов в ферментерах происходит в оптимальных условиях (контролируются pH, температура, аэрация).

Оценка удельных активностей ключевых ферментов биodeградации нафталина штамма *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) показала, что их величины зависят от состава питательной среды, условий культивирования, фазы роста клеток, наличия в среде индуктора оперонов биodeградации нафталина. Так, при культивировании штамма *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) на минеральной среде с нафталином или салицилатом в качестве единственного источника углерода активности ключевых ферментов – нафталин-1,2-диоксигеназы (НО), салицилат-гидроксилазы (СГ), катехол-1,2-диоксигеназы (К1,2О), катехол-2,3-диоксигеназ (К2,3О) – были высокими, при культивировании в ферментере с богатой средой – на порядок ниже.

Культивирование на богатой среде в ферментере с добавлением салицилата (0,1- 0,2 г/л) в качестве индуктора оперонов деградации нафталина позволило получить клетки с удельной активностью ферментов сравнимой с таковой при выращивании клеток в минеральной среде с нафталином или салицилатом в качестве единственного источника углерода. Кроме того, культивирование в ферментере позволило получить биомассу клеток (23 г/л и 26,6 г/л) на порядок выше, чем при культивировании в колбах с минеральной средой и нафталином или салицилатом (1,5 г/л или 5,5 г/л). Соответственно, при таком культивировании увеличилось количество белка клеток до 141 мг/г клеток. Таким образом, культивирование штамма *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) на богатой среде с индукцией салицилатом позволило получить 210 ед/л культуральной среды удельной активности салицилатгидроксилазы.

Добавление дизельного топлива в конце логарифмической фазы роста в условиях периодического культивирования связано с тем, что микроорганизмы-деструкторы ПАУ (полициклические ароматические углеводороды) (в том числе нафталина) и нефтепродуктов способны продуцировать поверхностно-активные вещества (биоэмульгаторы), которые способствуют повышению биодоступности за счет увеличения водной растворимости гидрофобных органических соединений [5, 6]

Исследование удельных активностей ключевых ферментов биodeградации нафталина в условиях культивирования штамма *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) в ферментере, содержащем богатую среду с добавлением дизельного топлива в конце логарифмической

фазы роста, показало, что добавление дизельного топлива не влияет на удельные активности исследуемых ферментов (активности невысоки) (рис. 1). Кроме того, активность катехол-1,2-диоксигеназы снижалась на порядок. Низкая активность ферментов биодegradации нафталина объясняется тем, что дизельное топливо не является индуктором оперонов биодegradации нафталина.

В штамме *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) обнаружена активность обоих ферментов расщепления катехола (K1,2O и K2,3O). Ферменты функционировали параллельно, однако соотношение их активностей зависело от условий культивирования и состава питательной среды. Добавление в среду салицилата приводило к увеличению активности K2,3O, что свидетельствует об индуцибельном характере синтеза данного фермента (рис. 2).

Введение культуры в стационарную фазу роста иногда обусловлено необходимостью длительного хранения биомассы, поскольку штамм *Pseudomonas* sp. 142NF (pNF142) входит в состав биопрепарата «Микробак» для очистки окружающей среды от загрязнений нефтепродуктами [5, 6].

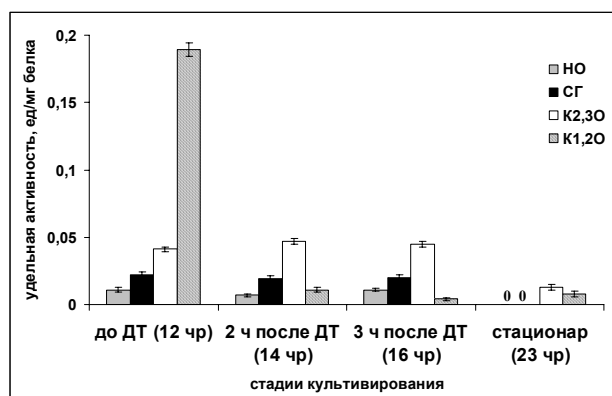


Рис. 1. Удельные активности ферментов в зависимости от фазы роста периодической культуры, выращенной в ферментере на богатой среде с добавлением дизельного топлива. ДТ - дизельное топливо, НО - нафталиндиоксигеназа, СГ - салицилатгидроксилаза, К2,3О - катехол-2,3-диоксигеназа, К1,2О - катехол-1,2-диоксигеназа.

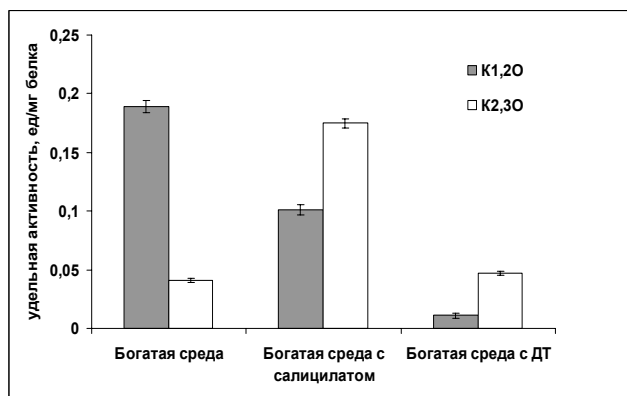


Рис. 2. Соотношение активностей катехол-1,2-диоксигеназы и катехол-2,3-диоксигеназы в зависимости от условий культивирования. ДТ - дизельное топливо, К2,3О - катехол-2,3-диоксигеназа, К1,2О - катехол-1,2-диоксигеназа.

Поскольку плазмида стабильно поддерживается в клетке, биомасса, полученная в стационарной фазе роста, может использоваться в качестве биопрепарата, однако наличие активностей ферментов дегradации нафталина в клетках позволит быстрее адаптироваться микроорганизму к новым условиям загрязнения, что является несомненным достоинством биопрепарата.

Работа была выполнена при поддержке гос. контрактов Тема РНП 2.1.1.7789; РНП 2.1.1.9290 и РФФИ 08-04-99019-р_офи; РФФИ 08-04-90028-Бел_а.

1. Кошелева И.А., Измалкова Т.Ю., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Боронин А.М. // Генетика. - 2003. - Т.39. - № 9. - С. 997-1004.
2. Скрябин Г.К., Старовойтов И.И. // Докл. АН СССР. - 1975. - Т. 221. - С. 493-495.
3. Боронин А.М., Кулакова А.Н., Цой Т.В., Кошелева И.А., Кочетков В.В. // Биохимия. - 1988. - Т. 229. - №1. - С. 237-240.
4. Barnsley E.A. // Biocem. Biophys. Res. Commun. - 1976. - V.72. - P.1116-1121.
5. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Шкидченко А.Н., Пырченкова И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Боронин А.М. // Патент РФ на изобретение №2312891. - 10.03.2006.
6. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Яшкина Т.В., Боронин А.М. // Заявка на изобретение РФ №2007125403. - 05.07.2007.