

## **Тема 3б:**

# ***ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ***

### **План лекции**

**Подготовительный метаболизм**

**Основные реакции, участвующие в подготовительном метаболизме.**

***Реакции окисления.***

***Оксигеназы: монооксигеназы и диоксигеназы.***

***Метанмонооксигеназа.***

**Разрыв ароматического кольца.**

**Орто- и мета-пути подготовительного метаболизма.**

**Реакции восстановления.**

**Реакции деградации.**

**Реакции конъюгации.**

**Особенности микроорганизмов – деструкторов органических ксенобиотиков.**

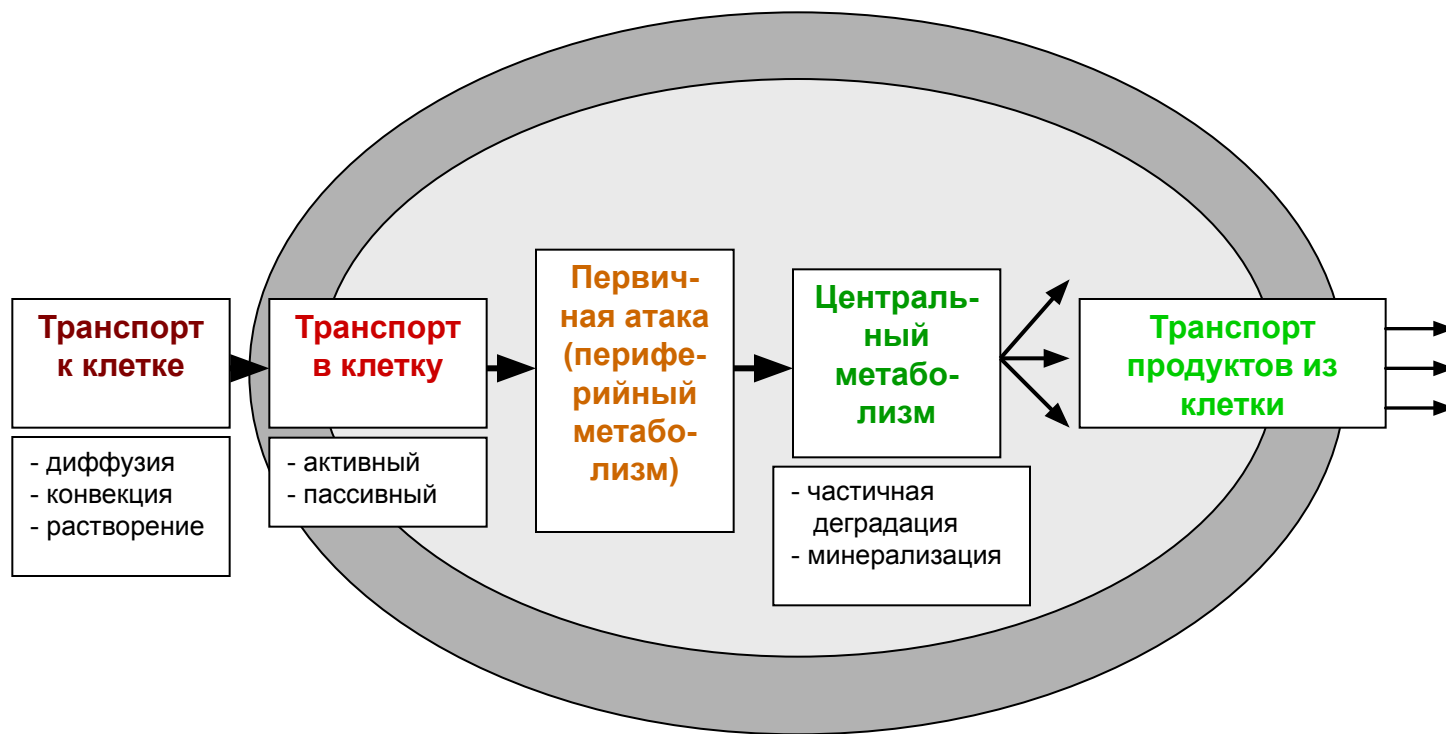
**Особенности подбора и селекции микроорганизмов-деструкторов.**

# Вопросы в экзаменационных билетах

1. Биохимические механизмы деградации ксенобиотиков. Пути подготовительного метаболизма.
2. Биохимические механизмы деградации ксенобиотиков. Первичное гидрокселирование как первый этап подготовительного метаболизма ксенобиотиков.
3. Биохимические особенности разложения фенолов. Орто- и мета- пути расщепления фенолов.
4. Биохимические механизмы деградации ксенобиотиков. Биodeградация галогенсодержащих ксенобиотиков.
5. Особенности микроорганизмов – деструкторов органических ксенобиотиков. Принципы подбора и конструирования микроорганизмов-деструкторов и особенности их роста в присутствии ксенобиотиков.

**Кн. 1, с. 309-344, 376-385**

# ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ



Основные стадии взаимодействия органического ксенобиотика и клетки

*Последовательная трансформация органического ксенобиотика в одно из соединений, вступающего затем в основные (центральные) пути катаболического или анаболического обмена, происходит в ходе **подготовительного (периферийного) метаболизма.***

Микроорганизмы под воздействием ферментов переводят природные и синтетические вещества в **ключевые соединения метаболизма** – вещества, из которых синтезируются все необходимые компоненты клетки и извлекается необходимая энергия.

Ферменты, катализирующие подготовительный метаболизм, обычно индуцибельные.

*Основные реакции, участвующие в путях подготовительного метаболизма:*

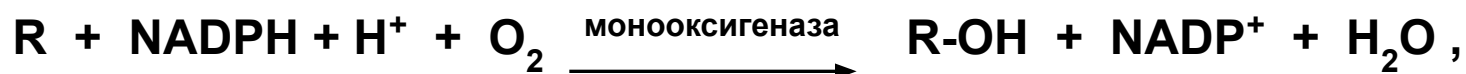
- 1) реакции окисления,
- 2) восстановления,
- 3) дегградации, включая гидролиз,
- 4) конъюгации.

## **Реакции окисления.**

В аэробных условиях подготовительный метаболизм начинается с реакцией включения кислорода (гидроксилирования) в молекулу субстрата.

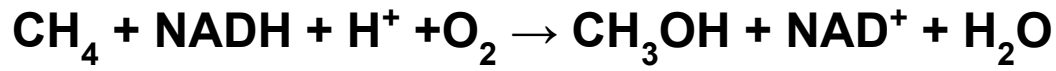
Участвуют ферменты – **монооксигеназы** и **диоксигеназы**.

Особая роль принадлежит **монооксигеназам со смешанной функцией** - комплексу мембрано-связанных ферментов, включающих цитохромы P-450 и NADPH-цитохром-P-450-редуктазы.

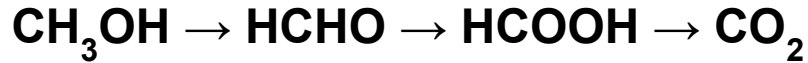


где NADPH – донор электронов, R – субстрат, R-OH – окисленный субстрат.

**Метанмонооксигеназа** – у метаноокисляющих бактерий



Далее:



Две формы метанмонооксигеназы: растворимая цитоплазматическая и нерастворимая, связанная с мембраной.

*Растворимая метанмонооксигеназа* не обладает субстратной специфичностью и одновременно с метаном способна соокислять его гомологи (этан, пропан, бутан и др.), алкены, трихлорэтилен, ароматические соединения и их хлорированные гомологи, а также  $\text{NH}_3$  до  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Этим обусловлено значение реакций, катализируемых метанмонооксигеназой, для удаления различных органических загрязнений из природных сред.

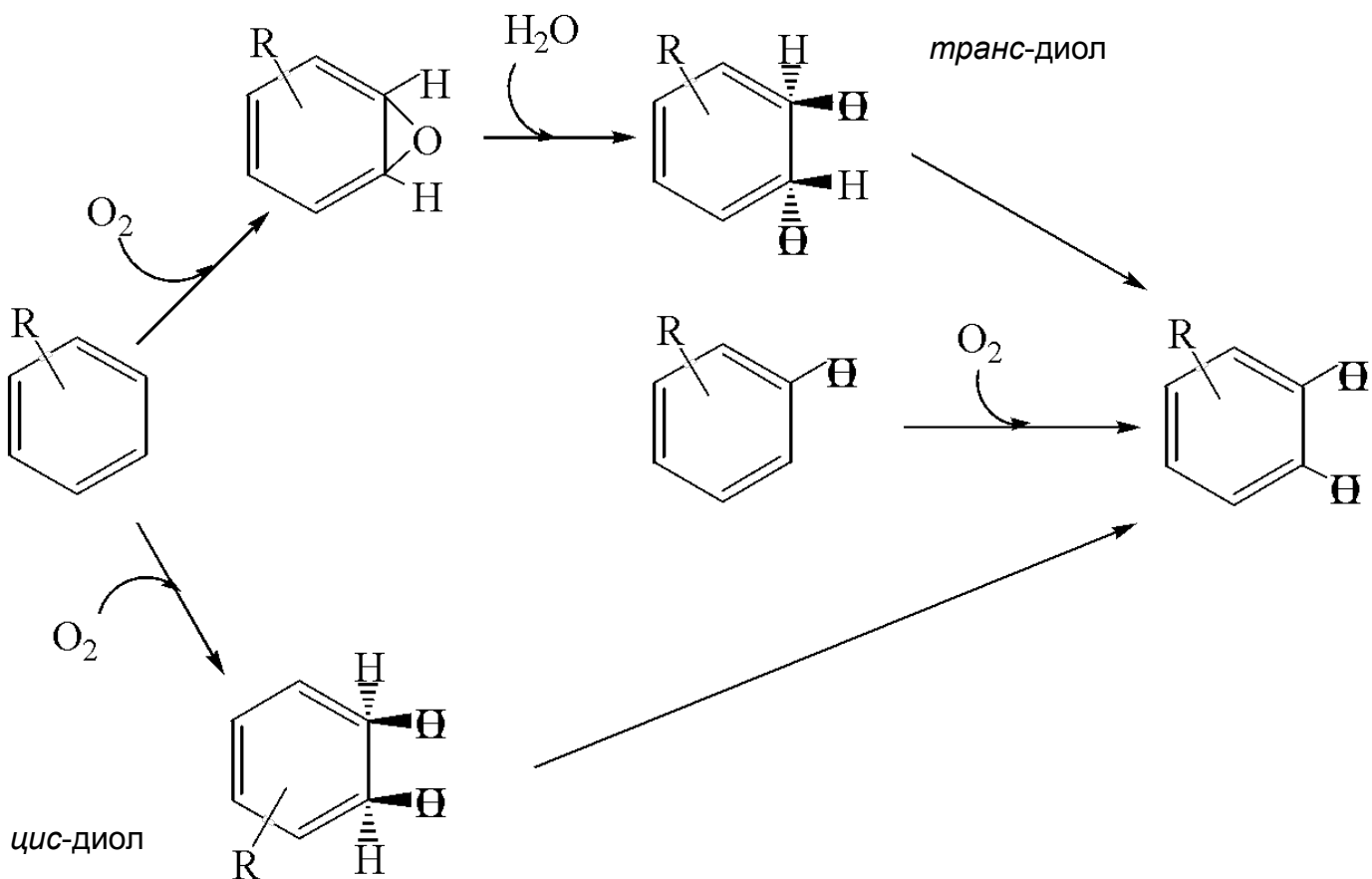
**Диоксигеназы** катализируют внедрение в молекулу субстрата обоих атомов молекулы кислорода.

Играют важную роль в деградации таких природных соединений, как фенолы и их производные, лигнины, алкалоиды, терпены и др.

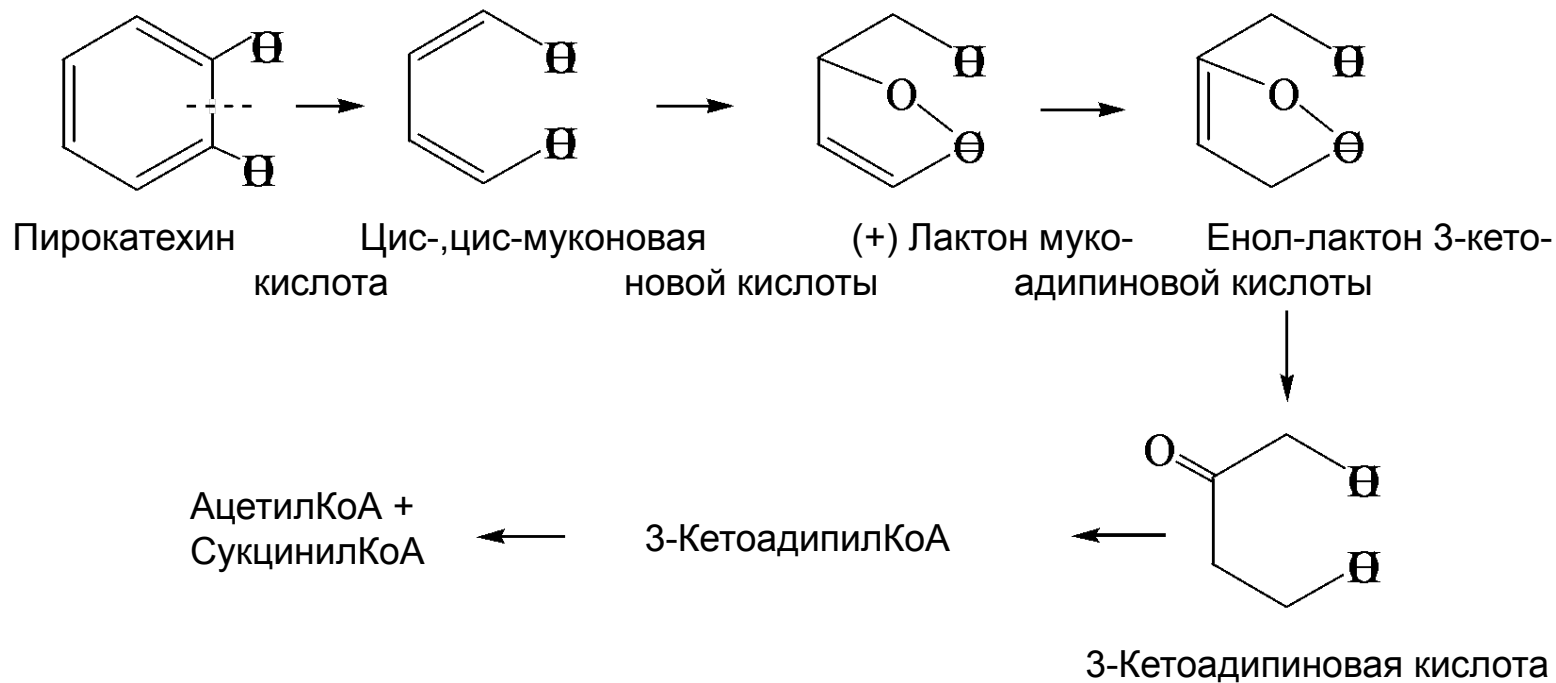
Наиболее важные реакции подготовительного метаболизма, осуществляемые диоксигеназами, – **реакции, ответственные за разрыв ароматического кольца.**

В большинстве случаев субстратами ферментов, катализирующих разрыв бензольного кольца, являются соединения, имеющие как минимум две свободные гидроксильные группы в *орто*- или *пара*-положениях (*орто*- или *пара*-дифенолы). Простейший *орто*-дифенол – катехол (пирокатехин). *Орто*-дифенолы образуются в подготовительном метаболизме многих соединений.

Дигидроксилированное ароматическое кольцо разрывается в диоксигеназной реакции в результате ***орто***- или ***мета***-расщепления.

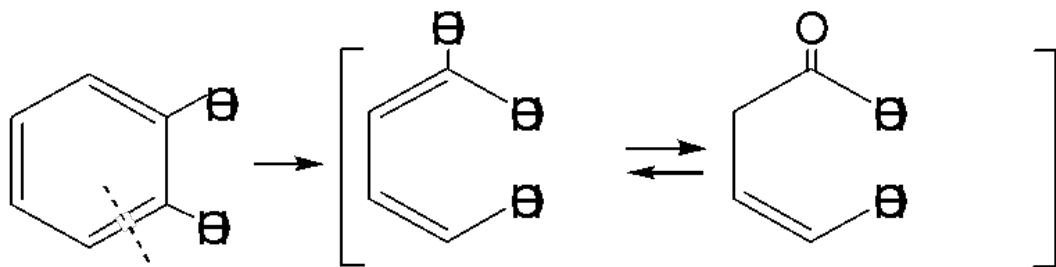


# Орто- или β-кетoadипатный путь расщепления (*Pseudomonas putida* и др.)

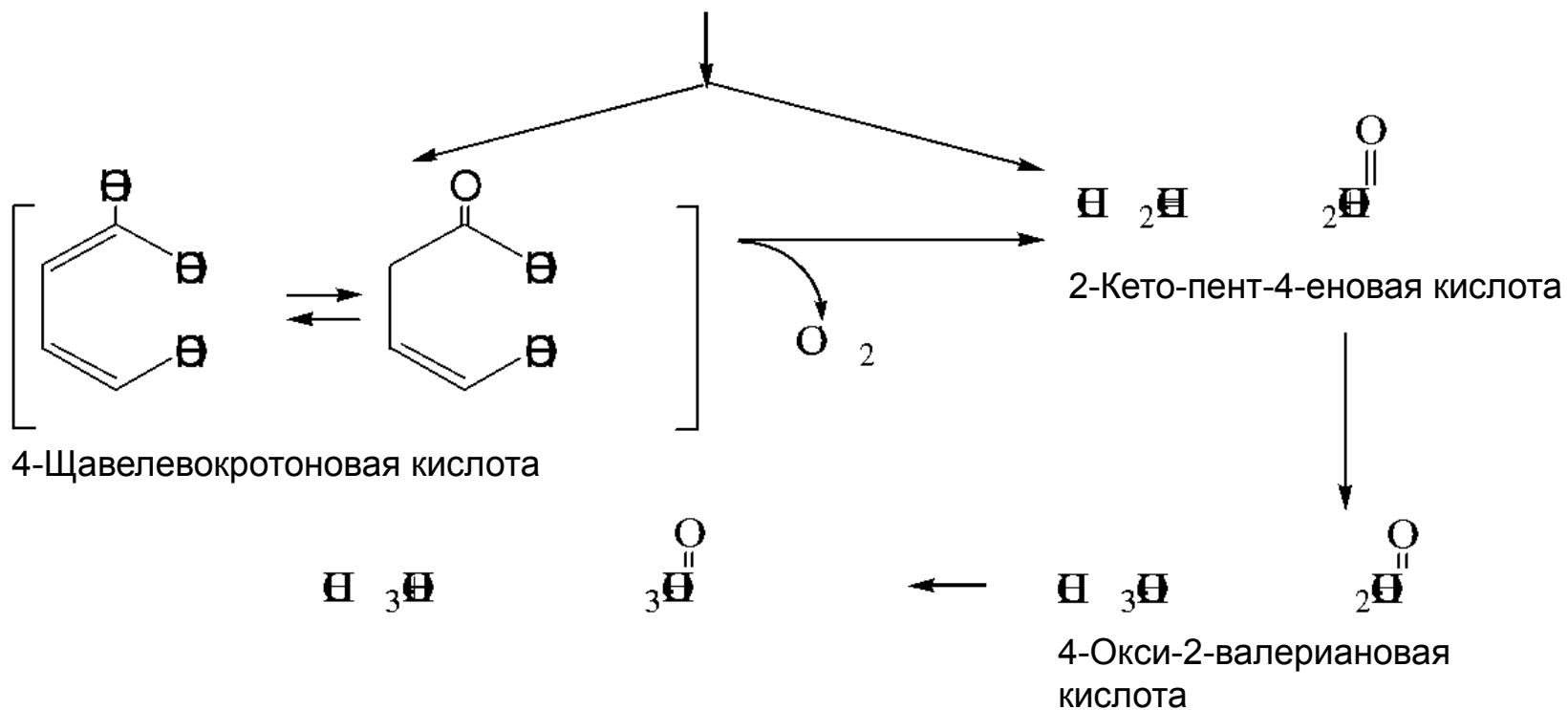




# Мета-путь расщепления



Полуальдегид 2-оксимуконовой кислоты

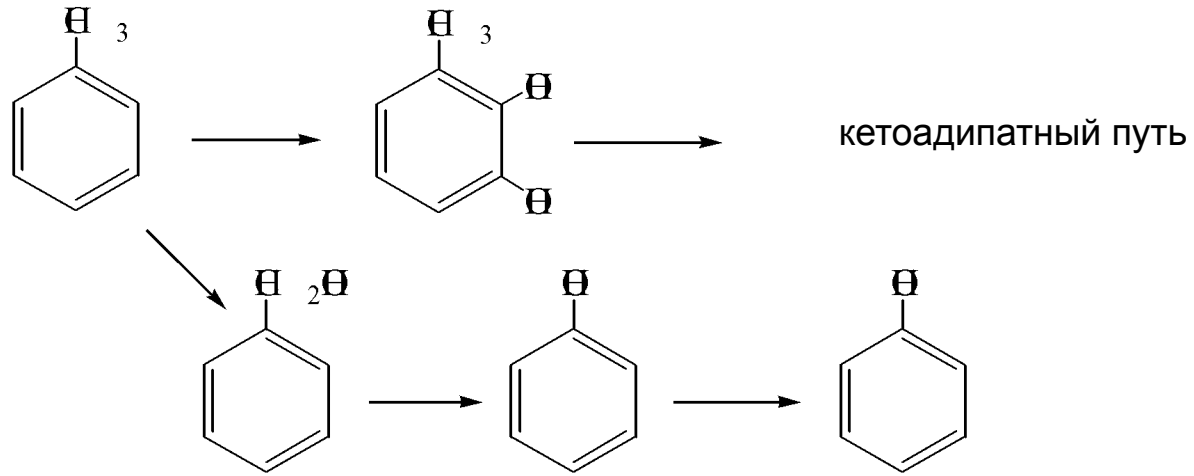


При *мета*-расщеплении ароматических колец микроорганизмы, как правило, растут быстрее, чем при *орто*-расщеплении. Однако *мета*-расщепление менее эффективно при разложении различных производных ароматических соединений, например галогензамещенных, поскольку приводит к накоплению промежуточных токсичных продуктов метаболизма и гибели популяции микроорганизмов-деструкторов.

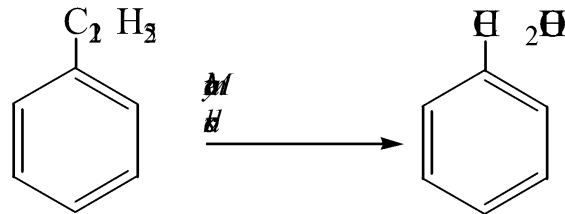
Гены, определяющие возможность *орто*-расщепления ароматического кольца незамещенных фенолов, как правило, содержатся в хромосоме, гены *мета*-расщепления присутствуют в плазмидах биodeградации и определяют разрыв кольца в метилированных фенольных соединениях. Ферменты, катализирующие расщепление ароматического кольца, – индуцибельные.

*Орто*- и *мета*-расщепление ароматического кольца способны осуществлять бактерии, дрожжи и грибы.

# Окисление ароматических соединений с небольшими боковыми группами



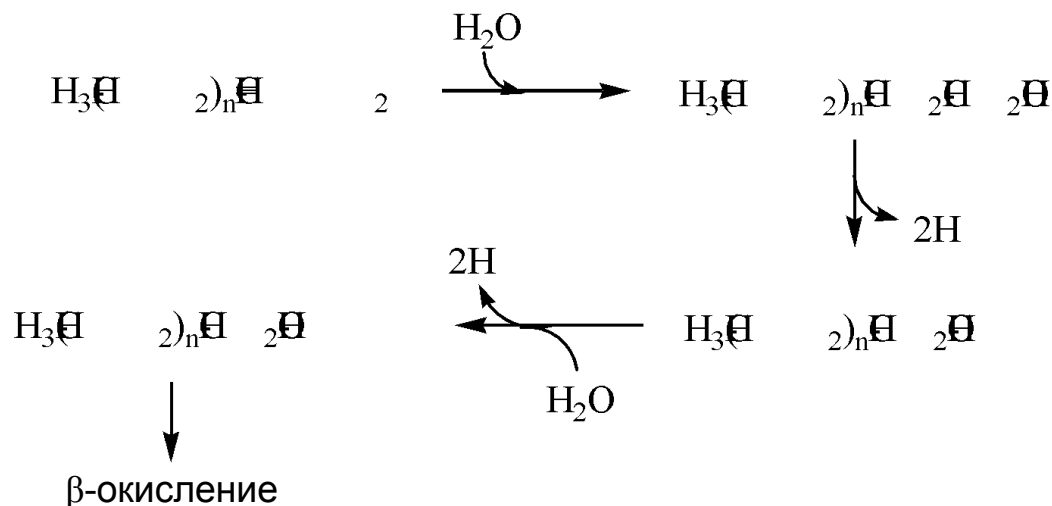
# Окисление соединений, содержащих длинные алкильные боковые цепи



В анаэробных или аноксигенных условиях окисление восстановленных соединений-ксенобиотиков возможно нитратом, оксидами металлов, сульфатами, диоксидом углерода или галогенированными органическими соединениями.

Некоторые сульфатредуцирующие бактерии и денитрификаторы способны окислять насыщенные алканы, алкены, алкины и нафтенy до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  и ацетата или  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  (в ассоциации с метаногенами).

При аноксигенном окислении связанный кислород нитратов и сульфатов не включается в молекулы ароматических соединений, и в этих условиях оксигеназы не функционируют. У насыщенных алифатических углеводородов отщепляется водород с образованием двойной связи; нитратный или сульфатный ион является конечным акцептором водорода.

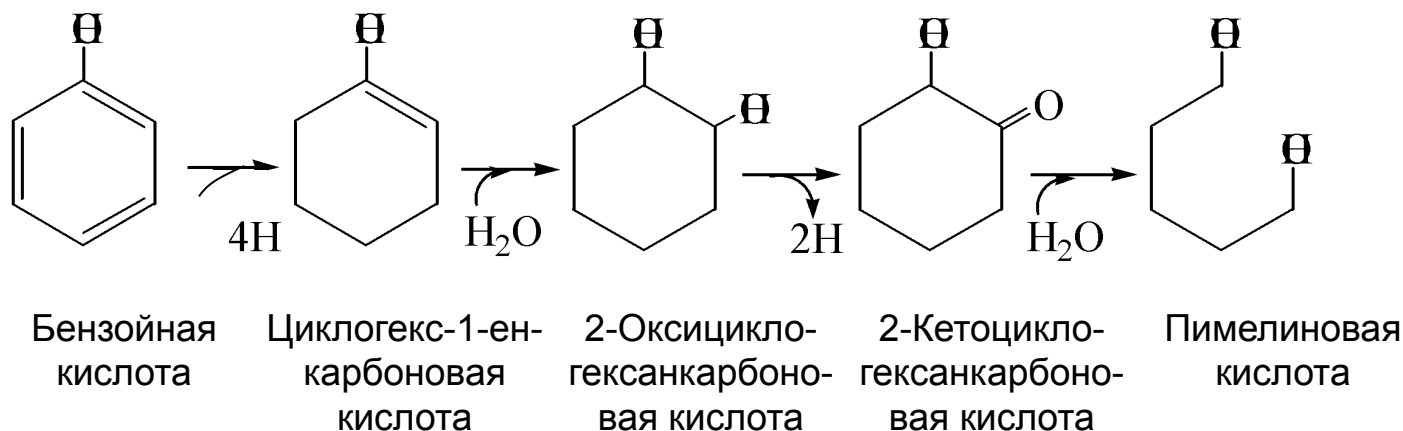


## Реакции восстановления.

Протекают, как правило, в анаэробных условиях. При этом микроорганизмы могут использовать многие ксенобиотики в качестве конечных акцепторов электронов на начальных стадиях деградации.

Примеры:

- восстановление альдегидов и кетонов в спирты;
- восстановление ароматических нитро-, нитрозо- и азогрупп в амино-, гидросиламино- или нитрозогруппы;
- восстановление двойных связей ароматических циклов с последующим расщеплением кольца



## ***Реакции деградации.***

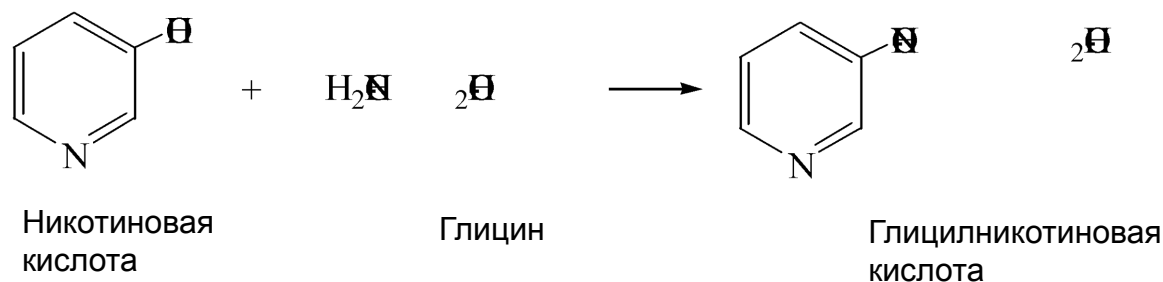
### **Примеры:**

- гидролиз эфиров, амидов, гидразидов и нитрилов, фосфатных и полифосфатных групп;
- деалкилирование, при котором удаляются алкильные группы, связанные с O, N, S и образуются фенолы, амины и тиолы;
- расщепление кольцевых структур (алициклические и гетероциклические соединения), что важно для биodeградации грибами лигнина и других природных полимеров.

## Реакции конъюгации

Примеры:

- конъюгация ацетата при посредстве ацетил-КоА с некоторыми ароматическими и алифатическими аминами и сульфонидами с помощью ацетилтрансфераз;
- конъюгация глицина с бензойной и никотиновой кислотами:



- конъюгация с цистеином, глутатионом и другими серусодержащими соединениями;
- метилирование спиртов, фенолов, аминов, тиолов и др.;
- конъюгация с сульфатом фенолов, спиртов, ароматических аминов, гидроксиламинов, стероидов;
- образование связанных остатков продуктов частичной деградации ксенобиотиков с природными полимерами, например, связывание некоторых пестицидов с лигнином (в растениях), с гуминовыми кислотами (в почве);
- связывание ионов тяжелых металлов металлотioneинами – белками с низкой молекулярной массой и высоким содержанием цистеина.

## *Дегалогенирование*

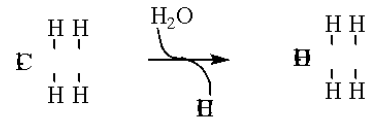
**Расщепление связи C-Hal:**

- дегалогеназы;
- спонтанное дегалогенирование нестабильных интермедиатов;
- ферменты с ослабленной субстратной специфичностью.

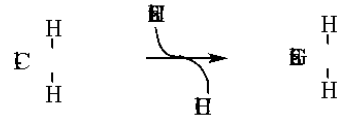
**На способность галогенированного соединения вступать в тот или иной тип реакции дегалогенирования влияет число атомов галогена в молекуле соединения.**



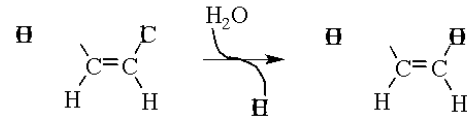
1. Гидролитическое дегалогенирование



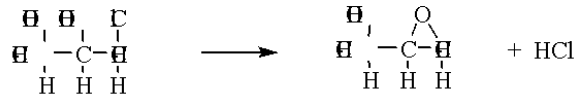
2. Замещение глутатионом



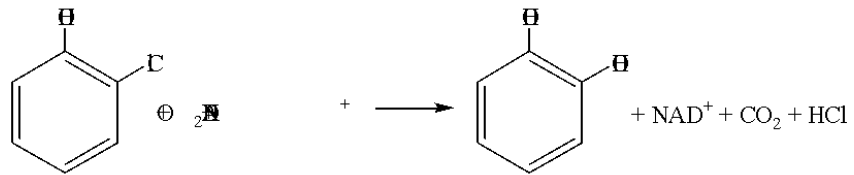
3. Гидратация



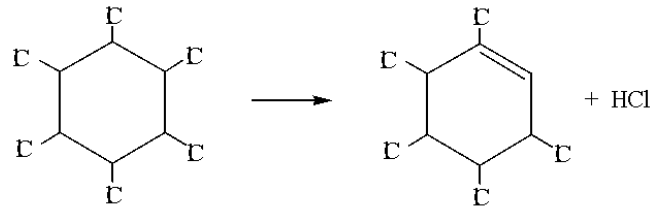
4. Внутримолекулярное замещение



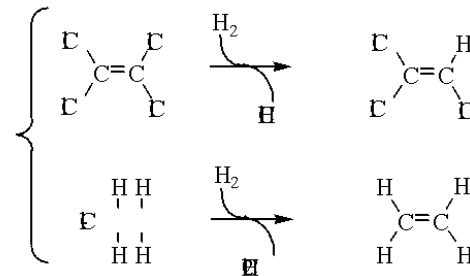
5. Окислительное дегалогенирование



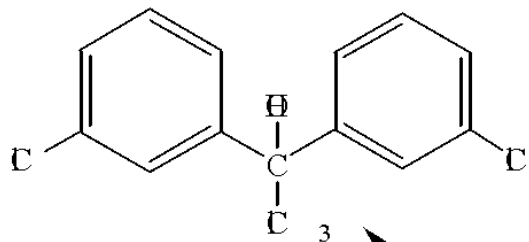
6. Дегидрогалогенирование



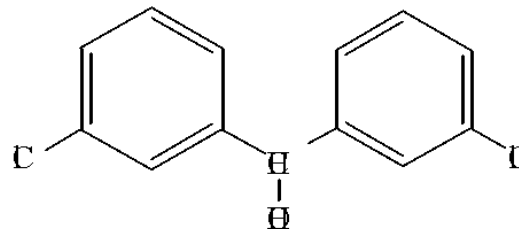
7. Восстановительное дегалогенирование



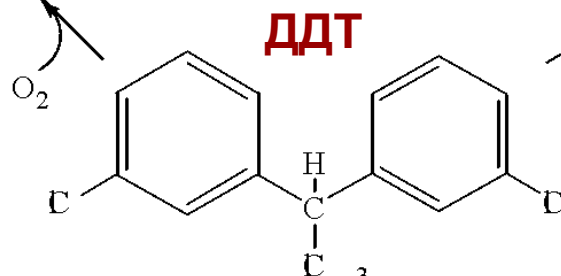
**Кельтан**



**ДДА**

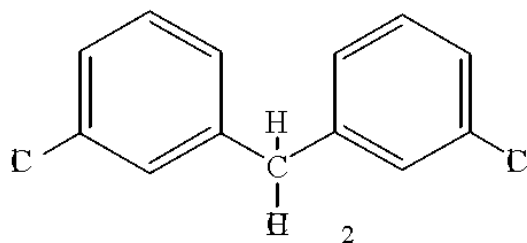


дегалогенирование-  
гидроксилирование



окислительное  
дегалогенирование

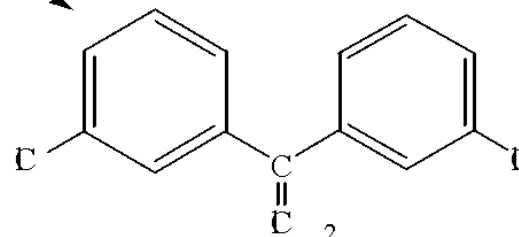
восстановительное  
дегалогенирование



**ДДД**

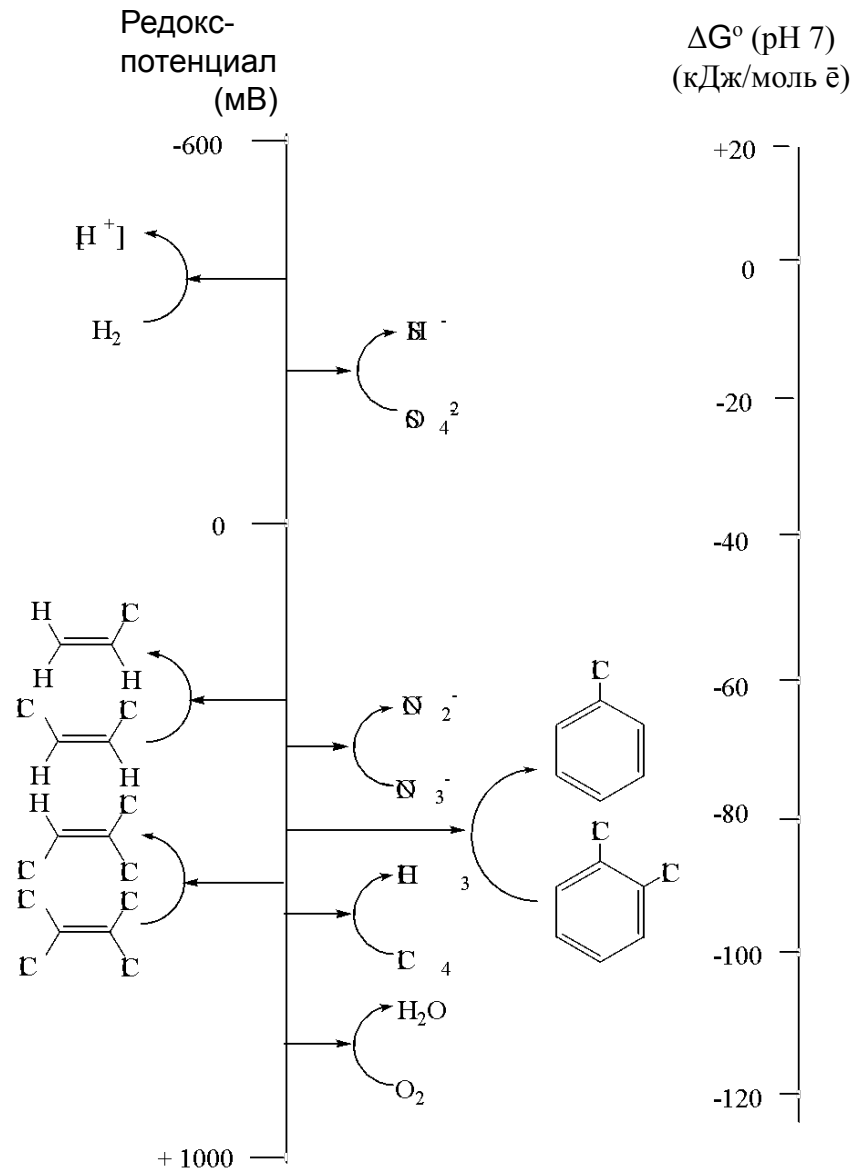
2

дегалогенирование с  
образованием  
двойной связи



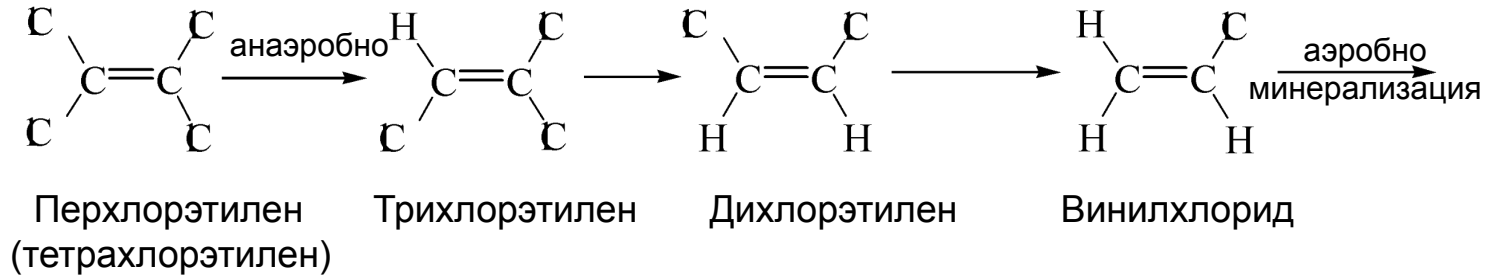
**ДДЭ**

2



Чем выше редокс-потенциал, тем труднее вещество поддается окислению и легче восстановлению.

## Пример – трансформация перхлорэтилена.



ВОССТАНОВЛЕНИЕ

ОКИСЛЕНИЕ

# **ОСОБЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ**

**Ведущая роль – гетеротрофные микроорганизмы, особенно бактерии (р. *Pseudomonas* и др.).**

**Смешанные популяции, как правило, быстрее и полнее разрушают многие синтетические соединения.**

## **Подбор и селекция микроорганизмов-деструкторов:**

**1. Выделение монокультуры или сообщества микроорганизмов (изолятов) из различных природных или техногенных сред, загрязненных теми или иными ксенобиотиками; лучше всего выделять микроорганизмы из мест с застарелыми загрязнениями или с неоднократным поступлением ксенобиотиков.**

**Для выделения таких изолятов эффективен метод накопительных культур, при этом накапливают биологический материал для деградации вещества-загрязнителя, как правило, на этом же субстрате либо на его легко утилизируемых аналогах.**

**2. Использование уже известных штаммов-деструкторов (музейных культур) или конструирование рекомбинантных штаммов на базе существующих.**

**Более легко адаптируются к потреблению субстрата-ксенобиотика:**

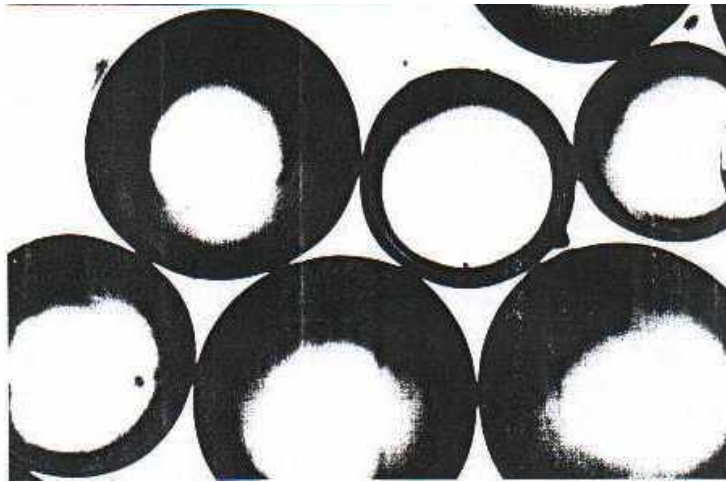
- микроорганизмы, у которых отсутствует только один из ферментов подготовительного метаболизма;**
- микроорганизмы, которые трансформируют синтетическое соединение в одно из промежуточных соединений подготовительного метаболизма его природного аналога уже на первых этапах метаболизма.**

**Целесообразно сначала получить накопительную культуру с использованием в качестве субстрата природного аналога данного синтетического соединения или их смесь, а уж затем пытаться адаптировать биодеструктор к потреблению ксенобиотика в качестве единственного субстрата.**

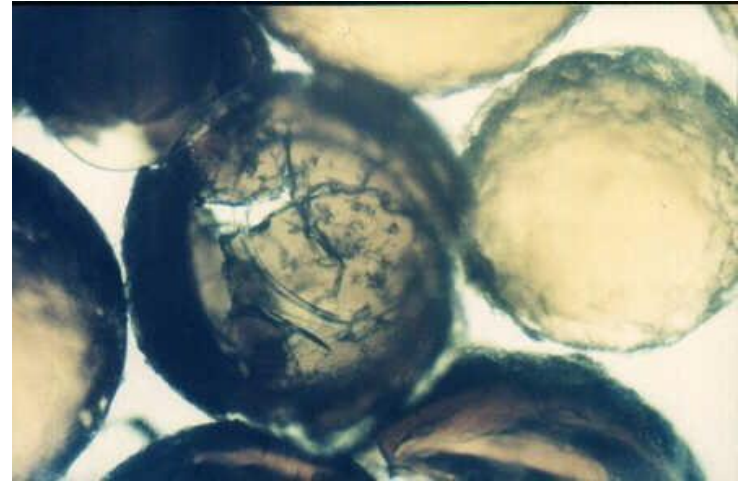
**В зависимости от условий получения необходимой массы микроорганизмов-деструкторов возможны два варианта биоочистки и биоремедиации.**

***Первый вариант*** – обеспечение роста естественной микрофлоры, включающей биодеструкторов, – для участков с застарелыми загрязнениями, где почти всегда обитает дикая, аборигенная микрофлора, способная их трансформировать. Такие загрязнения можно удалять *in situ* (по месту) без внесения биопрепаратов.

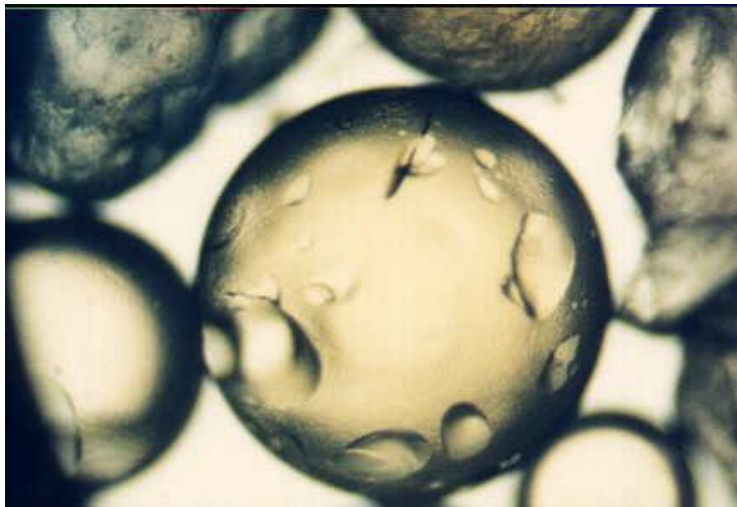
***Второй вариант*** – предварительное получение биологически активного штамма, накопление жизнеспособных клеток и внесение в виде биопрепарата в загрязненную среду. Этот вариант целесообразно применять в северных регионах и при обработке мест с незастарелыми загрязнениями.



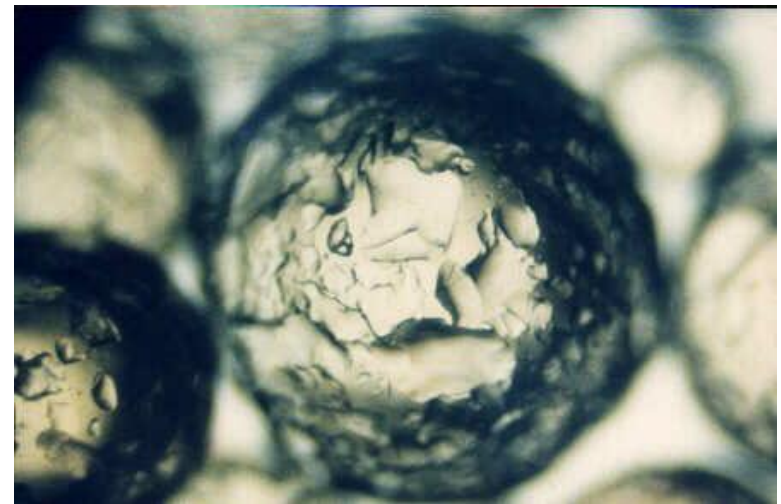
**Зерна катионита КУ-2-8, исходные.  
Увеличение 50<sup>x</sup>.**



**Зерна катионита КУ-2-8. Железоокисляющие  
микроорганизмы, через 3 мес. биодеструкции.  
Увеличение 50х.**

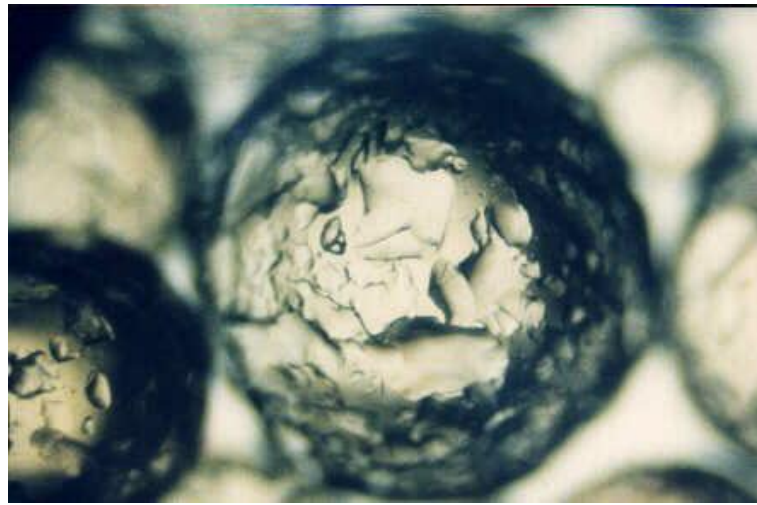


**Зерна катионита КУ-2-8. Марганцеокисляющие  
микроорганизмы, через 1 мес. биодеструкции.  
Увеличение 50х.**



**Зерна катионита КУ-2-8. Марганцеокисляющие  
микроорганизмы, через 3 мес. биодеструкции.  
Увеличение 50х.**





**Зерна катионита КУ-2-8. Фенолоксиляющие микроорганизмы, через 3 мес. биодеструкции. Увеличение 50х.**



**Зерна катионита КУ-2-8. Фенолоксиляющие микроорганизмы, через 3 мес. биодеструкции. Увеличение 50х.**



**Зерна катионита КУ-2-8 в присутствии грибов *Acrimonium kiliense* после 3-х месяцев. Увеличение 50х.**