

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.695

М. Ю. Коротаев^a, Е. В. Вихарева^a, В. Д. Белоногова^a, И. Б. Ившина^{b,c}

^a Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия

^b Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^c Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ФИТОРЕГУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОДУКТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ПАРАЦЕТАМОЛА

Показано, что продукты биодеструкции парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 имеют гуминоподобную природу. В составе их молекул присутствуют “симметричные” и “асимметричные” участки, включающие аминифенольные, феноксазиновые, индольные и бензофурановые фрагменты. В основе химической структуры данных фрагментов лежат замещенные ароматические или хиноидные циклы с *para*- (“симметричным”) и *meta*- (“асимметричным”) положениями эквивалентных заместителей – фенольных гидроксильных или азотсодержащих функциональных групп. Выявлено фиторегулирующее действие продуктов бактериальной деструкции парацетамола на прорастание семян пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., обусловленное влиянием “симметричных” и “асимметричных” молекулярных участков на функциональную активность пероксидазы. Экспериментально обосновано, что эффект фитостимуляции зависит от стадии роста растения и концентрации веществ, содержащихся в водном извлечении из продуктов бактериальной деструкции парацетамола.

Ключевые слова: парацетамол; биодеструкция; *Rhodococcus ruber*; *Triticum aestivum* L.; пероксидазная активность.

М. Yu. Korotaev^a, E. V. Vikhareva^a, V. D. Belonogova^a, I. B. Ivshina^{b,c}

^a Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russian Federation

^b Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^c Perm State University, Perm, Russian Federation

PHYTOREGULATING ACTION OF BACTERIAL PARACETAMOL DEGRADATION PRODUCTS

Products of bacterial paracetamol degradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 77 cells were shown to be humic-like substances. According to our data, the molecules of the products of bacterial paracetamol degradation comprise “symmetric” and “asymmetric” sites, including aminophenol, phenoxazine, indole and benzofuran fragments. The chemical structures of these fragments are based on aromatic and quinoid rings with equivalent substituents, i.e. phenol hydroxyl and nitrogen-containing functional groups, in *para*- (“symmetric”) and *meta*- (“asymmetric”) positions. The products of bacterial paracetamol degradation were found to produce a phyto regulating action on seed germination of soft wheat *Triticum aestivum* L. due to the influence of “symmetric” and “asymmetric” molecular sites on the functional peroxidase activity. It was experimentally proved that the phytostimulating effect depends on the plant growth phase and concentrations of substances contained in water extracts from products of bacterial paracetamol degradation.

Key words: paracetamol; biodegradation; *Rhodococcus ruber*; *Triticum aestivum* L.; peroxidase activity.

Введение

Важной фармакохимической проблемой является поиск эффективных способов переработки лекарственных средств, не пригодных к медицинскому использованию, для получения на их основе новых биологически активных соединений, в том числе фитостимулирующего действия. Одним из широко ис-

пользуемых в медицинской практике лекарственных препаратов является парацетамол (CAS: 103-90-2; *N*-(4-гидроксифенил)ацетамид).

В качестве деструкторов парацетамола и продукта его гидролиза *n*-аминофенола применяют различные микроорганизмы, в том числе актинобактерии рода *Rhodococcus*, выделенные из почвенных и водных экосистем [Warhurst, Fewson,

1994; Takenaka et al., 2003; Ившина и др., 2006; de Gussemе et al., 2011; Wu, Zhang, Chen, 2012; Zhang et al., 2013; Arora, 2015]. Согласно данным В. de Gussemе et al. [2011], бактериальная деструкция парацетамола может сопровождаться поликонденсацией фенольных интермедиатов. При этом окислительные поликонденсационные процессы, протекающие с участием ферментов почвенных бактерий, лежат в основе образования гумусовых кислот (гуминовой и фульвовой) и гуминоподобных соединений [Stevenson, 1994; Орлов, 1997]. Особый интерес при рассмотрении вопросов, связанных с возможностью превращения фенолов в гуминоподобные соединения, представляет биоконверсия аминифенолов, которые, как и гуминовые кислоты, являются азотсодержащими соединениями [Орлов, 1990].

Гуминовые кислоты представляют собой смесь высокомолекулярных органических азотсодержащих соединений с бензольным ядром и алифатической углеводородной цепочкой, содержащих в качестве заместителей различные функциональные группы (рис. 1). Наибольшее значение среди последних имеют фенольный гидроксил и карбоксил, присутствие которых обуславливает растворимость гуминовых кислот в щелочах, а также хиноидная группа, определяющая их темную окраску. Фенольные и хиноидные группы определяют способность гуминовых кислот к окислительно-восстановительным реакциям.

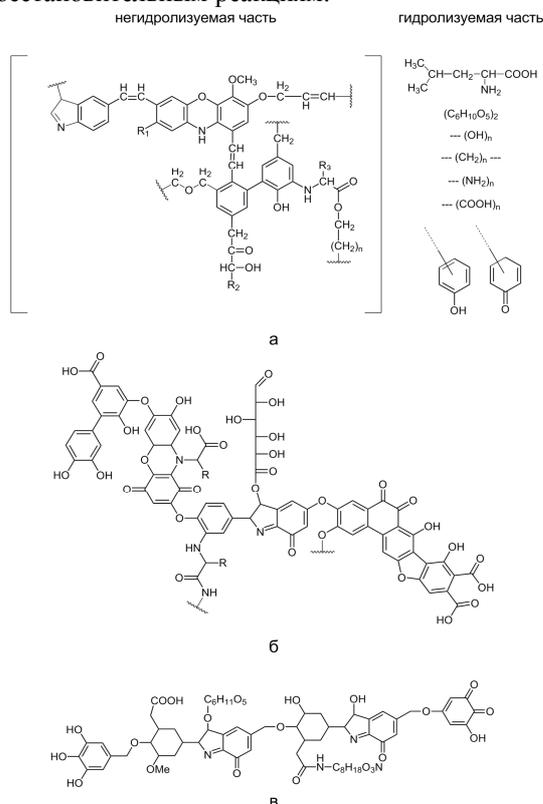


Рис. 1. Строение структурных ячеек (а, б) и молекулы (в) гуминовой кислоты.
Цит. по: а) Д.С. Орлову [1990]; б) F.J. Stevenson [1994]; в) С.С. Драгунову [Орлов, 1990]

В ранее проведенных нами исследованиях установлено, что актинобактерии рода *Rhodococcus* способны к биодеструкции парацетамола с образованием водорастворимых веществ, окрашивающих культуральную среду в коричневый цвет, и черного аморфного осадка (АО) полимерной природы [Ившина и др., 2006; Коротаяев и др., 2015]. Сравнение элементных составов АО и поли-м-аминофенола показало их сходство. Высокая молекулярная масса (≈ 6 кДа), растворимость в щелочах и осаждение кислотонерастворимой фракции при подкислении щелочного раствора АО, а также наличие фитостимулирующего действия обуславливают сходство АО с гуминоподобными веществами [Орлов, 1990; Гладков и др., 2006]. Наличие бензофурановых и индольных фрагментов в составе «симметричных» (“Sym”) и «асимметричных» (“Asym”) участков молекул АО (рис. 2) подтверждает меланизацию полиаминофенолов, первоначально образующихся при биотрансформации парацетамола родококками [Коротаяев, Вихарева, Ившина, 2016; Коротаяев и др., 2016]. При этом под «симметричными» следует понимать участки молекул, включающие ароматические и хиноидные кольца с одинаковыми заместителями в *para*-положении, под «асимметричными» – молекулы с одинаковыми заместителями в *meta*-положении [Коротаяев, Вихарева, Ившина, 2016].

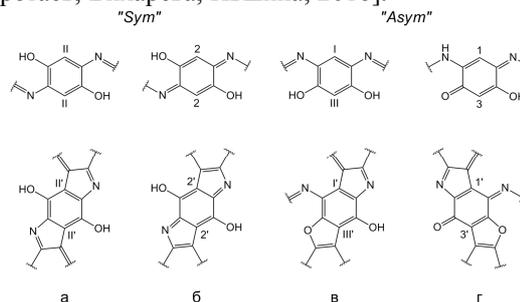


Рис. 2. Структурные фрагменты молекул АО, представленные остатками:

а – 2,5-диамино-1,4-фенилендиола; б – 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинондиимина; в – 4,6-диамино-1,3-фенилендиола; г – 2-амино-5-гидрокси-1,4-бензохинонимина

Как видно на рис. 2, в составе молекул АО могут присутствовать как аминифенольные, так и индольные фрагменты. В молекулах гуминовых кислот также имеются данные структурные фрагменты (рис. 1), что предопределяет их фитостимулирующую активность.

Известно, что фитостимулирующее действие гумусовых кислот и родственных им соединений обусловлено несколькими факторами, в том числе участием фульвовой кислоты как водорастворимой и наиболее подвижной фракции гумусовых кислот в переносе микроэлементов питания из почвы в корни растений [Nardi et al., 2002]. При этом фульвовая кислота за счет фенольных гидроксильных,

карбонильных и карбоксильных групп (рис. 3) способна образовывать хелатные комплексы с ионами различных металлов.

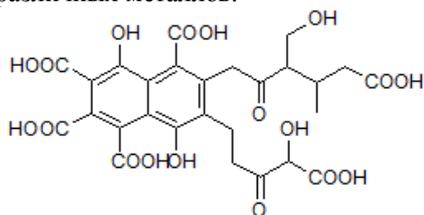


Рис. 3. Химическая формула фульвовой кислоты.

Цит. по J.A.E. Buffle [1977]

Именно в форме фульватов большинство микроэлементов являются биодоступными для корневой системы растений. Кроме того, гумусовые кислоты оказывают влияние на ферментные системы подземных органов растительного организма вследствие фенольно-хиноидной составляющей их химической структуры. Не случайно содержание пероксидазы в корнях значительно больше, чем в надземной части растения [Рогожин, 2004]. В связи с этим исследование фитостимулирующего действия необходимо проводить параллельно с изучением активности ферментов растений, в частности, пероксидазы [Рогожин, 2004].

Пероксидаза – растительный гемсодержащий фермент класса оксидоредуктаз, обладающий двумя «опциями»: собственно пероксидазной, обусловленной способностью фермента переносить кислород пероксида водорода на окисляемый субстрат (аскорбиновую кислоту, в частности), и оксидазной, связанной с переходом кислорода из молекулярной формы на 3-индолилуксусную кислоту (ИУК), что сопровождается продукцией перекисных соединений [Газарян и др., 2006]. Последние способны диспропорционировать с образованием атомарного кислорода и его радикальных форм [Kawano, 2003]. Частицы радикалов необходимы при выходе семян из покоя и активизации их прорастания за счет потребления энергии, полученной в результате перекисного (радикального) окисления липидов. Регуляторами пероксидазной и оксидазной функций пероксидазы могут выступать фенольные соединения, которые являются его быстро окисляемыми субстратами и, соответственно, ускоряют или замедляют (в зависимости от концентрации) окисление медленно окисляемых субстратов, аскорбиновой кислоты, в частности [Рогожин, 2004]. Так, установлено регуляторное действие гидрохинона на пероксидазную активность данного фермента и *o*-дианизидина – на его оксидазную функцию. Отмечено, что обе представленные «опции» пероксидазы находятся в антагонистическом отношении и не могут включаться одновременно, а лишь последовательно [Рогожин, 2004; Давидянц, 2013].

Цель настоящей работы – установление зависимости между химическим составом водного извлечения из осадка, образующегося в процессе

чтения из осадка, образующегося в процессе биодеструкции парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77, и его росторегулирующим действием на процесс прорастания семян пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., широко используемой в качестве тест-культуры при фитохимических исследованиях.

Материалы и методы исследований

Для биодеструкции парацетамола (Аньцю Лунань Фармасьютикал Ко., Лтд., Китай) использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 77 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур WDCM 768, www.iegmc.ru) [Catalogue of Strains, 2016]. Выделение осадка из постферментационной среды культивирования родококков осуществляли в соответствии с условиями, описанными в работе [Ившина и др., 2006].

Изучение спектральных характеристик продуктов биодеструкции парацетамола

Электронные спектры АО и продуктов его фракционирования регистрировали на спектрофотометре Lambda EZ 201 (Perkon Elmer, USA) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см в диапазоне длин волн от 190 до 1000 нм. Анализируемый раствор готовили из 0.1%-ного раствора АО в 0.1 М растворе NaOH путём стократного разведения его аликвотной части дистиллированной водой или 0.1 М раствором NaOH. Растворами сравнения являлись 0.001 М раствор NaOH и 0.1 М раствор NaOH.

Фракционирование АО осуществляли методами дробного осаждения и растворения. В химическом стакане вместимостью 100 см³ смешивали 1.00 см³ 0.1%-ного раствора АО с 1.00 см³ 0.1 М раствора HCl. Полученную взвесь разбавляли дистиллированной водой и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100.00 см³, доводя объем растворителем до метки. Собранный в мерную колбу фильтрат представлял собой водорастворимую фракцию АО в H⁺-форме (ВФ-H⁺). Для получения спирто-водорастворимой фракции АО в H⁺-форме (СВФ-H⁺) вышеуказанную взвесь обрабатывали последовательно 50.00 см³ дистиллированной воды и 96%-ного этилового спирта и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100.00 см³, доводя объем фильтратом до метки.

Для изучения влияния pH на изменение спектральных характеристик фракций АО готовили растворы последних в 0.1 М NaOH. Предварительно в мерную колбу вместимостью 100.00 см³ вносили 50.00 см³ 0.2 М раствора NaOH. Далее взвесь, полученную по вышеприведенной методике, разбавляли дистиллированной водой и филь-

рвали через бумажный фильтр в мерную колбу, доводя объем фильтратом до метки. Полученный раствор представлял собой водорастворимую фракцию АО в Na^+ -форме (ВФ-Na^+). Для получения спирторастворимой фракции АО в Na^+ -форме (СФ-Na^+) в мерную колбу вместимостью 100.00 см^3 вносили 50.00 см^3 0.2 М раствора NaOH . Данную взвесь обрабатывали в химическом стакане 96%-ным этиловым спиртом и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу, доводя ее объем фильтратом до метки.

Растворы для заполнения кювет сравнения при регистрации спектров ВФ-NH^+ , СВФ-NH^+ , ВФ-Na^+ и СФ-Na^+ готовили аналогично исследуемым, но с использованием вместо 2.00 см^3 взвеси, полученной по вышеприведенной методике, 2.00 см^3 0.05 М раствора NaCl .

Получение водорастворимых продуктов биодеструкции парацетамола

Извлечение водорастворимых продуктов (ВП) из АО (0.2500 г) проводили экстракцией дистиллированной водой (100.00 см^3) при нагревании на водяной бане с обратным холодильником в течение 3 ч. [Корогаев и др., 2015]. Водное извлечение охлаждали и фильтровали через обеззоленный бумажный фильтр “синяя лента” (Химреактивкомплект, Россия). В фильтрате гравиметрическим методом устанавливали концентрацию ВП, которую рассчитывали по массе остатка, полученного после испарения воды из 10.00 см^3 фильтрата. Серию растворов ВП готовили посредством разбавления фильтрата дистиллированной водой. Соотношение объемов фильтрата и полученного разведения находилось в пределах от 1:6.2 до 1:1.2.

Проращивание семян и анализ проростков пшеницы

Предварительно взвешенные семена пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. помещали по 30 штук во флаконы из темного стекла вместимостью 25 см^3 , заливали растворами ВП (2.50 см^3) и выдерживали в темноте в течение 1 сут. при комнатной температуре. Объем вносимого во флаконы раствора подбирался таким образом, чтобы он покрывал слой семян [Христин, Ковальченко, Алкацева, 2008]. Флаконы на период замачивания семян прикрывали крышкой во избежание значительного испарения растворителя. В контрольном опыте вместо растворов ВП использовали дистиллированную воду.

Через 1 сут. от начала замачивания семена извлекали из флаконов, промывали дистиллированной водой (1 дм^3 на 30 семян), подсушивали и переносили по 30 шт. в чашки Петри. Проращивание семян осуществляли между 3 нижними слоями и 1 верхним слоем смоченной фильтровальной бумаги. Первоначальный объем дистиллированной воды, введенный в каждую чашку Петри, составлял

4.00 см^3 . По мере высыхания слоев фильтровальной бумаги вносили дополнительное количество дистиллированной воды. Общий объем внесенной в одну чашку Петри дистиллированной воды на 6 сут. составлял 6.50 см^3 . Отбор проростков для определения их морфометрических показателей и пероксидазной активности осуществляли на 1-, 2-, 4-, 6-е сут., а также на 1-, 3-, 6-е сут., соответственно, с момента помещения семян в чашки Петри. Для каждого проростка определяли суммарную длину всех корней и длину ростка. С целью определения сухой биомассы 3- и 6-суточных проростков пшеницы закладывали дополнительно 14 чашек Петри.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием F-критерия Фишера и t-критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha=0.05$. Различия между выборками считали статистически значимыми при $t_{\text{эмп}} > t_{\text{кр}}$. При статистической обработке морфометрических показателей проростков пшеницы предварительно проводили отсев грубых погрешностей наблюдений (критерий Рошера) и проверку выборок на нормальность (метод моментов) [Бондарчук, 2010].

Пероксидазную активность корней проростков определяли модифицированным методом Бояркина [Воскресенская и др., 2006]. Выбор корней проростков в качестве объекта анализа связан с большим, в сравнении с ростками, содержанием в них пероксидазы [Рогожин, 2004; Рогожин, Рогожина, 2011; Давидянц, 2013]. Для проростков, отобранных на 1-е сут. эксперимента, для анализа использовали всю сырую биомассу ростков и корней, так как прирост за данный интервал времени был незначительным. Для получения ферментной вытяжки навеску корней проростков пшеницы 0.05–0.10 г гомогенизировали в ступке с дистиллированной водой и переносили в мерную колбу вместимостью 25.00 см^3 . После доведения объема водой до метки растительную вытяжку настаивали в течение 10 мин., фильтровали через бумажный фильтр и использовали для определения пероксидазной активности. В одну из кювет с толщиной слоя 1.00 см помещали 1.00 см^3 раствора бензидина, 1.00 см^3 фильтрата и 1.00 см^3 дистиллированной воды (раствор сравнения), в другую – 1.00 см^3 раствора бензидина, 1.00 см^3 фильтрата и 1.00 см^3 0.3%-ного раствора пероксида водорода (анализируемый раствор). С момента падения последней капли 0.3%-ного раствора пероксида водорода включали секундомер и регистрировали оптическую плотность анализируемого раствора на концентрационном фотоэлектрическом фотометре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия) при длине волны 670 нм. Пероксидазную активность выражали в единицах оптической плотности на грамм сырой массы в секунду (отн. ед. $\times \text{г}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). Раствор бензидина готовили в среде ацетатного буфера согласно методике, представленной в работе [Воскресенская и др., 2006].

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение электронных спектров АО и его фракций, представленных на рис. 4, подтверждает наличие в молекулах АО системы сопряжения двойных связей, карбонильной и азометиновой функциональных групп. Электронные спектры фракций АО свидетельствуют о гипсохромных и bathохромных сдвигах в кислой среде максимумов поглощения при $\lambda=248$ нм и $\lambda=329$ нм, соответственно (рис. 4).

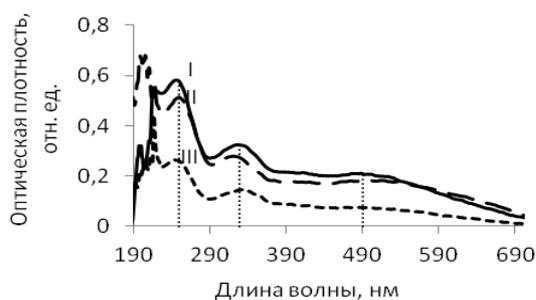
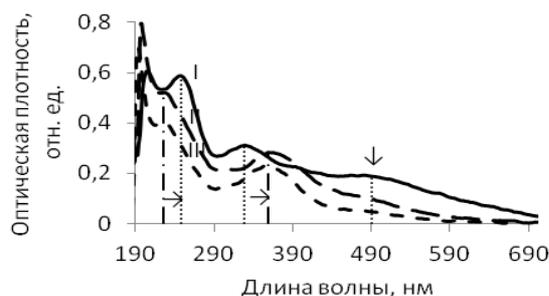


Рис. 4. Электронные спектры поглощения АО и его фракций:

а) I – 0.001%-ный раствор АО в 0.001 М NaOH, II – СВФ-Н⁺, III – ВФ-Н⁺; б) I – 0.001%-ный раствор АО в 0.1 М растворе NaOH, II – СВ-Na⁺, III – ВФ-Na⁺

Так, поглощение в области длин волн 230–260 нм обусловлено переходом $\pi-\pi^*$ в трансoidной форме еноловой системы (рис. 4 а, II, III), а образование енолят-иона в щелочном растворе сдвигает данную полосу поглощения в сторону длинных волн (рис. 4 б, II, III) [Сильверстейн, Басслер, Моррил, 1977]. Bathохромный сдвиг максимума при $\lambda=329$ нм (рис. 4 б, II, III) соответствует $\pi-\pi^*$ переходу находящейся в сопряжении азометиновой группы. При подкислении на атоме азота данной группы создается положительный заряд, обуславливающий смещение максимума в сторону длинных волн (рис. 4 а, II, III) [Сильверстейн, Басслер, Моррил, 1977]. Исчезновение полосы поглощения при $\lambda = 490$ нм при подкислении (рис. 4 а, II, III) связано с протонированием несвязывающей электронной пары гетероатома азота, участвующей в $\pi-\pi^*$ переходе между НОМО орбиталью ароматического цикла и LUMO орбиталью хиноидного коль-

ца [Gopalasamy, 2014].

В эксперименте на проростках пшеницы при прорастании семян выявлена обратная зависимость между длиной ростков (1 сут.) и сухой биомассой корней (3 сут.) от их пероксидазной активности (рис. 5, рис. 6). На этапе восхождения семян (6 сут.), напротив, отмечается прямо пропорциональная зависимость между сухой биомассой корней проростков пшеницы и пероксидазной активностью (рис. 7).

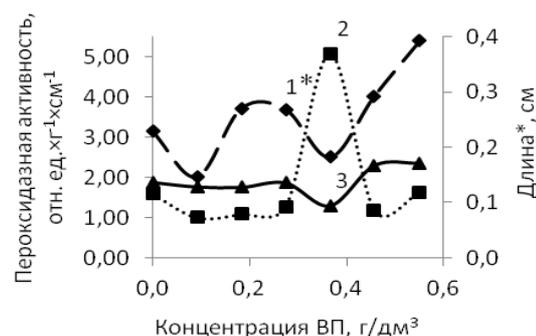


Рис. 5. Зависимость средней длины корней (1*), средней длины ростков (3*) и пероксидазной активности (2) от концентрации ВП для проростков пшеницы (1 сут.)

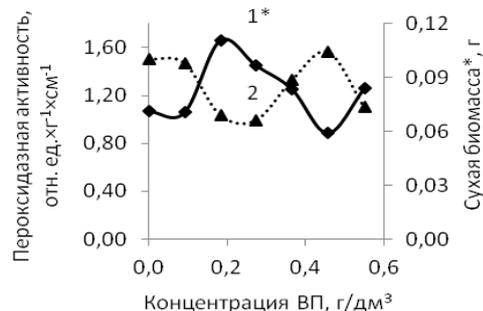


Рис. 6. Зависимость сухой биомассы корней (1*) и пероксидазной активности (2) от концентрации ВП для проростков пшеницы (3 сут.)

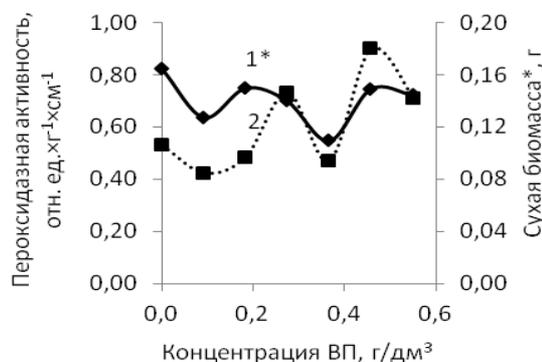


Рис. 7. Зависимость сухой биомассы корней (1*) и пероксидазной активности (2) от концентрации ВП для проростков пшеницы (6 сут.)

Зависимость между длиной корней и пероксидазной активностью в 1-суточных проростках имеет некоторое расхождение с выявленной тенденцией, что объясняется использованием в качестве объекта анализа всей сырой биомассы ростков и корней, где граммное содержание первых, по всей видимости, в значительной степени превышает в навеске содержание последних (рис. 5).

Средние значения длины побегов (ростков) и корней проростков пшеницы, а также сухой биомассы корней 6-суточных проростков пшеницы, представлены в таблице.

Динамика изменения морфометрических показателей (сухой биомассы) проростков пшеницы

Концентрация ВП, г/дм ³	1 сут.	2 сут.
Длина ростков, см		
Контроль	0.09±0.03	0.24±0.05
0.0913	0.08±0.02	0.2±0.06
0.1826	0.08±0.02	0.31±0.09
0.2739	0.09±0.02	0.27±0.09
0.3652	0.04±0.02	0.18±0.06
0.4565	0.12±0.03	0.23±0.05
0.5500	0.12±0.03	0.21±0.06
Длина корней, см		
Контроль	0.18±0.07	0.9±0.2
0.0913	0.10±0.04	1.2±0.3
0.1826	0.22±0.06	2.3±0.4
0.2739	0.22±0.12	1.5±0.2
0.3652	0.13±0.07	1.3±0.3
0.4565	0.24±0.09	0.8±0.2
0.5500	0.34±0.09	1.2±0.3
	4 сут.	6 сут.
Длина ростков, см		
Контроль	2.1±0.3	4.9±0.4
0.0913	2.4±0.4	5.6±0.5*
0.1826	1.8±0.4	5.1±0.7
0.2739	2.5±0.3	6.0±0.6
0.3652	1.4±0.3	4.8±0.7
0.4565	1.7±0.3	5.0±0.6
0.5500	2.1±0.3	5.2±0.5
	Длина корней, см	Сухая биомасса корней, г
Контроль	14.2±1.5	0.1644
0.0913	15.3±1.8	0.1274
0.1826	13.3±1.9	0.1499
0.2739	15.3±1.5	0.1399
0.3652	11.8±1.5	0.1096
0.4565	13.7±1.4	0.1492
0.5500	12.4±1.1	0.1444

* Статистическое отличие от контрольной выборки ($t_{\text{эсп}} > t_{\text{кр}}$).

Как следует из данных, представленных в таблице и на рис. 4–6, динамика изменения морфометрических показателей и сухой биомассы корней и побегов проростков пшеницы, связанная с активностью содержащейся в них пероксидазы, имеет «маятниковый» характер [Рогожин, 2004].

Спектральными характеристиками гуминовых кислот и родственных им веществ являются E -величина ($E_{465}^{0.001\%}$) и коэффициент цветности (E_{465} / E_{650}) [Орлов, 1990]. Наличие максимума поглощения вблизи $\lambda = 490$ нм для АО и его фракций в щелочной среде затрудняет определение данных характеристик. Батохромный сдвиг максимума поглощения азометиновой группы влияет на значения E -величины и, соответственно, цветного показателя СВФ и ВФ. Тем не менее, большее значение E_{465} / E_{650} для СВФ-Н⁺ (9.74) в сравнении с ВФ-Н⁺ (16.63) является характерной особенностью гуминовых веществ. Так, возрастание цветного показателя наблюдается при выделении фракций гумусовых кислот, имеющих большую растворимость в воде и меньшую среднюю молекулярную массу. Среднее значение E_{465} / E_{650} для фракций гумусовых кислот со средней молекулярной массой от 5 до 10 кДа равно 6.0 и менее 5 кДа – 9.0. Следовательно, ожидаемое значение цветного показателя АО будет меньше 9.74 и может быть сопоставимо со значением его средней молекулярной массы, приблизительно равной 6 кДа [Орлов, 1990]. Таким образом, водорастворимые вещества, присутствующие в ВФ-Н⁺ после фракционирования путем изменения pH и содержащиеся в растворе ВП после термической обработки АО на водяной бане, могут быть представлены низкомолекулярными фрагментами АО, при этом также включающими «Sym» и «Asym» участки (см. рис. 2). Повидимому, химическая двойственность участков молекул АО и, соответственно, ВП связана с биохимической химерностью пероксидазы, функционирующей в режимах пероксидазного и оксидазного окисления медленно окисляемых субстратов. Так, «симметричность» или «асимметричность» взаимодействующих с пероксидазой молекул циклического строения (аскорбиновая кислота, ИУК), обусловленная числом и положением заместителей в кольцевой системе, вероятно, является причиной их связывания в различных участках активного центра фермента и определяет различный механизм переноса электронов при их окислении [Рогожин, 2004; Газарян и др., 2006].

В самом деле, «симметричная» молекула гидрохинона в небольших концентрациях активирует, а в больших – ингибирует пероксидазное окисление таких медленно окисляемых субстратов, как аскорбиновая кислота [Рогожин, 2004]. Наличие в химической структуре аскорбиновой кислоты четного числа енольных гидроксильных групп предполагает в реакциях ее пероксидазного окисления «симметричный» перенос электронов на молекулу окислителя (пероксида водорода). Напротив, окси-

дазное окисление ИУК в силу ее химического строения сопровождается «асимметричным» переносом электронов, в результате которого образуются свободные радикалы [Savitsky et al., 1999]. Аналогично гидрохинону в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты *o*-дианизидин оказывает регуляторное действие на оксидазное окисление ИУК [Рогожин и Рогожина, 2004]. Таким образом, участвующие в биохимическом взаимодействии фенольные регуляторы (в малых концентрациях активаторы) и окисляемые субстраты можно разделить на две группы: те, что имеют отношение к пероксидазной функции, и те, что связаны с оксидазной функцией пероксидазы (рис. 8).

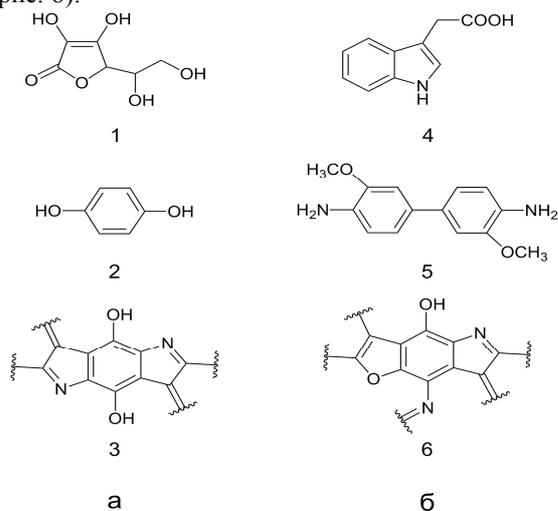
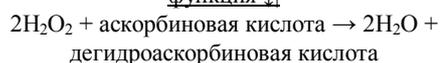
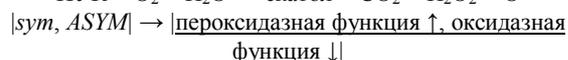
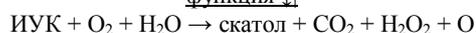
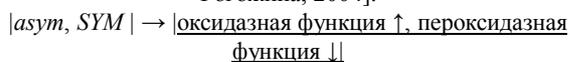


Рис. 8. Субстраты пероксидазного (а) и оксидазного (б) окисления:

1 – аскорбиновая кислота; 2 – гидрохинон; 3 – “симметричные” участки молекул АО и ВП; 4 – ИУК; 5 – *o*-дианизидин; 6 – “асимметричные” участки молекул АО и ВП

Биохимическое взаимодействие участников окисления упрощенно может быть отражено следующей схемой [Savitsky et al., 1999; Рогожин, Рогожина, 2004]:



Прописные (SYM, ASYM) и строчные буквы (sym, asym) обозначений фенольных регуляторов на данной схеме соответствуют их большим и малым концентрациям в растительных клетках.

Таким образом, концентрация и природа окисляемых субстратов оказывают определяющее влияние на направление протекания реакций в сторону образования или разрушения пероксида водорода – источника свободных радикалов, необхо-

димых для активизации процессов прорастания семян.

Так, обратная зависимость между сухой биомассой и пероксидазной активностью на этапе «проклевывания» и прорастания семян связана с образованием радикалов, которые оказывают повреждающее действие на мембраны клеток при перекисном окислении содержащихся в них липидов и угнетают рост растения. Вероятно, избыточное накопление радикалов, образованных при оксидажном окислении ИУК, по принципу отрицательной обратной связи выключает оксидажную и включает пероксидажную опцию фермента. По нашим данным, при большем значении пероксидазной активности наблюдается меньший прирост сухой биомассы корней проростков пшеницы (см. рис. 5, 6).

Прямая зависимость между пероксидажной активностью и сухой биомассой корней 6-суточных проростков пшеницы объясняется расходом энергии, образованной на этапе прорастания при перекисном окислении липидов (рис. 7). Так, при более сильном окислительном стрессе, испытанном растительными клетками на 1–3 сут. с момента помещения семян в чашки Петри, выделяется большее количество энергии, потребляемой растением на более поздних этапах его роста. Более интенсивное образование свободных радикалов в начале роста растения по принципу отрицательной обратной связи может стимулировать биосинтез эндогенных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, витамин Е), что, в свою очередь, далее вызывает возрастание пероксидазной активности фермента. Постепенное нивелирование различий между значениями сухой биомассы к 6 сут., вероятно, связано с полным израсходованием на рост запасных питательных веществ, изначально содержащихся в семенах.

Таким образом, росторегулирующее действие продуктов биодеструкции парацетамола на пшеницу мягкую связано с их влиянием на пероксидажную систему растения. Эффект фитостимуляции зависит от стадии роста растения и концентрации веществ, содержащихся в водном извлечении из продуктов биодеструкции парацетамола.

Заключение

Продукты бактериальной деструкции парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 проявляют выраженное фиторегулирующее действие, обусловленное их влиянием на функциональную активность пероксидазы.

Работа выполнена при частичной поддержке Комплексной программы Уральского отделения РАН (проект 15-12-4-10).

Библиографический список

- Бондарчук С.С. Основы практической биостатистики. Томск: Изд-во ТГПУ, 2010. 72 с.
- Воскресенская О.Л. и др. Большой практикум по биоэкологии. Ч. 1: учеб. пособие. Йошкар-Ола, 2006. 107 с.
- Газарян И.Г. и др. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303–322.
- Гладков О.А. и др. Способ получения солей гуминовых кислот: Евраз. пат. № 006824. Бюл. № 2. 2006. 6 с.
- Давидянц Э.С. Влияние обработки семян тритерпеновыми гликозидами на активность пероксидазы, ИУК-оксидазы и полифенолоксидазы в проростках пшеницы // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 225–231.
- Ивишина И.Б. и др. Алканотрофные родококки как катализаторы процесса биодеструкции не пригодных к использованию лекарственных средств // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, № 4. С. 443–447.
- Коротяев М.Ю., Вихарева Е.В., Ивишина И.Б. Меланизация полиаминофенолов в процессе биотрансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 // Вестник Пермского университета. Сер. Биология, 2016. Вып. 2. С. 166–170.
- Коротяев М.Ю. и др. Определение средней молекулярной массы нерастворимых продуктов биодеструкции парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 // Фундаментальные исследования. 2015. № 2, Ч. 26. С. 5850–5854.
- Коротяев М.Ю. и др. Химическая структура осадка, образующегося в процессе биотрансформации парацетамола клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77 // Биофармацевтический журнал. 2016. Т. 8, № 1. С. 13–19.
- Коротяев М.Ю., Солодянкина Е.С., Шибанова Е.Н. Определение удельного показателя поглощения водорастворимых продуктов бактериальной деструкции парацетамола // Научный альманах. 2015. № 12-2(14). С. 372–375.
- Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 325 с.
- Орлов Д.С. Гуминовые вещества в биосфере // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 56–63.
- Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
- Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов пероксидаз // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 2004. Т. 45. № 6. С. 423–428.
- Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2011. № 8 (82). С. 17–21.
- Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений / под ред. А.А. Мальцева. М.: Мир, 1977. 592 с.
- Хрустин М.С., Ковальченко Ю.М., Алкацева Н.И. Препарат для стимуляции прорастивания семян и повышения устойчивости проростков к дефициту влаги и способ его получения: Пат. РФ 2337543. Бюл. № 31. 2008. 13 с.
- Arora P.K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6, № 820. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00820>
- Buffle J.A.E. The humic substances in water and their interactions with mineral ions ("Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux"). Conference proceedings de la commission d'hydrologie appliquee de A.G.H.T.M. L'Universite d'Orsay, 1977. P. 3–10.
- Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. 2016. URL: <http://www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html> (дата обращения: 26.12.2016).
- de Gussem B. et al. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor // *Water Research*. 2011. Vol. 45. P. 1829–1837.
- Gopalasamy T. et al. Poly Meta-Aminophenol: chemical synthesis, characterization and AC impedance study // *Journal of Polymers*. 2014. Vol. 2014. The mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827043>
- Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // *Plant Cell Reports*. 2003. Vol. 21, № 9. P. 829–837.
- Nardi S. et al. Physiological effects of humic substances on higher plants // *Soil Biology and Biochemistry*. 2002. Vol. 34. P. 1527–1536.
- Savitsky P.A. et al. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure // *Biochemical Journal*. 1999. Vol. 340, № 3. P. 579–583.
- Stevenson F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. N. Y.: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.
- Takenaka S. et al. The metabolic pathway of 4-aminophenol in *Burkholderia* sp. strain AK-5 differs from that of aniline and aniline with C-4 substituents // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 69, № 9. P. 5410–5413.
- Warhurst A.M., Fewson C.A. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus* // *Critical*

- Reviews in Biotechnology. 1994. Vol. 14, № 1. P. 29–73.
- Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms // Applied Microbiology Biotechnology. 2012. Vol. 96. P. 875–884.
- Zhang L. et al. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium // Applied Microbiology and Biotechnology. 2013. Vol. 97, № 8. P. 3687–3698.
- ### References
- Bondarchuk S.S. *Osnovy prakticheskoy biostatistiki* [Fundamentals of practical biostatistics]. Tomsk: TGPU Publ., 2010. 72 p. (In Russ.).
- Voskresenskaya O.L., Alyabysheva E.A., Polovnikova M.G. (2006) *Bol'shoi praktikum po bioekologii* [Large Manual on bioecology]. Ch. 1. Ioshkar-Ola: Mariisk. Gos. Univ. Publ. 107 p. (In Russ.).
- Gazaryan I. G., Khushpul'yan D. M., Tishkov V. I. [Features of the structure and mode of action of peroxidases in plants]. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. V. 46 (2006): pp. 303–322. (In Russ.).
- Gkadkov O.A., Poloskin R.B., Polyakov Yu.Yu., Sokolova I.V., Sorokin N.I., Glebov A.V. *Sposob polucheniya soley guminovykh kislot* [Method for producing humic acid salts]. Eurasian patent N. 006824. Bull., 2006, N. 2. 6 p. (In Russ.).
- Davidyants E.S. [Effect of the treatment of seeds of triterpenoid glycosides on peroxidase, IAA-oxidase, polyphenoloxidase activities in wheat seedlings]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* (Barnaul). N. 4 (2013): pp. 225–231. (In Russ.).
- Korotaev M.Yu., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. [Polyaminophenol melanization in the process of paracetamol biotransformation by *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 77]. *Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologiya* (Perm). V. 2 (2016): pp. 166–170. (In Russ.).
- Korotaev M.Yu., Polyakova E.B., Vikhareva E.V., Rychkova M.I. [Chemical structure and biological activity of precipitate formed in the process of paracetamol biotransformation with *Rhodococcus ruber* IEGM 77]. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal* (Moscow). V. 8, N. 1 (2016): pp. 13–19. (In Russ.).
- Korotaev M.Yu., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Ivshina I.B. [Determination of the mean molecular weights of insoluble products formed during paracetamol biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 77]. *Fundamental'nye issledovaniya* (Moscow). N. 2 (2015): pp. 5850–5854. (In Russ.).
- Korotaev M.Yu., Solodyankina E.S., Shibanova E.N. [Determination of paracetamol bacterial degradation water-soluble products mass extinction coefficient]. *Nauchnyy al'manakh* (Tambov). V. 12-2, N. 14 (2015): pp. 372–375. (In Russ.).
- Orlov D.S. *Humusovye kisloty pochv i obshchaya teoriya gumifikatsii* [Humic substances of soils and general theory of humification]. Moscow, MSU Publ., 1990. 325 p. (In Russ.).
- Orlov D.S. [Humic substances in the biosphere] *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal* (Moscow). N. 2 (1997): pp. 56–63. (In Russ.).
- Khristin M.S., Koval'chenko Yu.M., Alkatseva N.I. *Preparat dlya stimulyatsii prorashchivaniya semyan i povysheniya ustoychivosti prorostkov k defitsitu vlagi I sposob ego polucheniya* [Agent for seed greensprouting stimulation and increasing sprout resistance to moisture deficiency, and method for its obtaining]. Russian patent N. 2337543. Bull., 2008, N. 31. 13 p. (In Russ.).
- Rogozhin V.V. *Peroksidaza kak komponent antioksidantnoy sistemy zhivykh organizmov* [Peroxidase as a component of the antioxidant system of living organisms]. St. Petersburg: GIOR, 2004. 240 p. (In Russ.).
- Rogozhin V.V., Rogozhina T.V. [Effect of indolyl-3-acetic acid in oxidation reaction of slowly and rapidly oxidizable peroxidase substrates]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser. 2. Khimiya* (Moscow). V. 45, N. 6 (2004): pp. 423–428. (In Russ.).
- Rogozhin V.V., Rogozhina T.V. [Physiological and biochemical mechanisms of germination of wheat grains]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* (Barnaul). V. 8, N. 82 (2011): pp. 17–21. (In Russ.).
- Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. *Spektricheskaya identifikatsiya organicheskikh soedineniy* [Spectrometric identification of organic compounds]. Edited by A.A. Mal'tsev. Moscow, Mir Publ., 1977. 592 p. (In Russ.).
- Arora P.K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. *Frontiers in Microbiology*. V. 6, N. 820 (2015). The mode of access: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00820>
- Buffle J.A.E. The humic substances in water and their interactions with mineral ions ("Les substances humiques et leurs interactions avec les ions mineraux"). Conference proceedings de la commission d'hydrologie appliquee de A.G.H.T.M.L' Universite d'Orsay, 1977. p. 3–10.
- de Gussem B., Vanhaecke L., Verstraete W., Boon N. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Research*. V. 45. (2011): pp. 1829–1837.
- Gopalasamy T., Gopalswamy M., Gopichand M., Raj J. Poly Meta-Aminophenol: chemical synthesis, characterization and AC impedance study. *Journal of Polymers*. V. 2014 (2014). The mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/827043>
- Ivshina I.B., Rychkova M.I., Vikhareva E.V., Chekryshkina L.A., Mishenina I.I. Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkanotrophic rhodococci. *Applied Biochemistry and Microbiology*. V. 42, N. 4 (2006): pp. 392–395.
- Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*. V. 21, N. 9 (2003): pp. 829–837.
- Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*. V. 34 (2002): pp. 1527–1536.

- Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. 2010. The mode of access: <http://www.iegm.ru/iegmcol/strains/index.html>
- Savitsky P.A., Gazaryan I.G., Tishkov V.I., Lagrimini L.M. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochemical Journal*. V. 340, N. 3 (1999): pp. 579–583.
- Stevenson F.J. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. New York: John Wiley & Sons, 1994. 512 p.
- Takenaka S., Okugawa S., Kadowaki M., Murakami S., Aoki K. The metabolic pathway of 4-aminophenol in *Burkholderia* sp. strain AK-5 differs from that of aniline and aniline with C-4 substituents. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 69, N. 9 (2003): pp. 5410–5413.
- Warhurst A.M., Fewson C.A. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology*. V. 14, N. 1 (1994): pp. 29–73.
- Wu S., Zhang L., Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms *Applied Microbiology Biotechnology*. V. 96 (2012): pp. 875–884.
- Zhang L., Hu J., Zhu R., Zhou Q., Chen J. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 97, N. 8 (2013): pp. 3687–3698.

Поступила в редакцию 09.01.2017

Об авторах

Коротаев Михаил Юрьевич, аспирант кафедры аналитической химии
Пермская государственная фармацевтическая академия
ORCID: 0000-0002-6376-1435
614990, Пермь, ул. Полевая, 2;
mikhail5555@mail.ru; (342)2825856

Вихарева Елена Владимировна, доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии
Пермская государственная фармацевтическая академия
ORCID: 0000-0002-0219-5214
614990, Пермь, ул. Полевая, 2;
vikhareva@pfa.ru; (342)2825856

Белогова Валентина Дмитриевна, доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники
Пермская государственная фармацевтическая академия
ORCID: 0000-0001-8414-4367
614990, Пермь, ул. Полевая, 2;
belonogova@pfa.ru; (342)2384338

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
ORCID: 0000-0003-2558-4789
614081, Пермь, ул. Голева, 13; ivshina@iegm.ru;
(342)2808114
профессор кафедры микробиологии и иммунологии
ФГБОУВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

About the authors

Korotaev Mikhail Yur'evich, postgraduate, Analytical Chemistry department
Perm State Pharmaceutical Academy
ORCID: 0000-0002-6376-1435
2, Polevaya str., Perm, Russia, 614990;
mikhail5555@mail.ru; +7(342)2825856

Vikhareva Elena Vladimirovna, Doctor of pharmacy, Professor, Head of Analytical Chemistry department
Perm State Pharmaceutical Academy
ORCID: 0000-0002-0219-5214
2, Polevaya str., Perm, Russia, 614990;
vikhareva@pfa.ru; +7(342)2825856

Belonogova Valentina Dmitrievna, Doctor of pharmacy, Professor, Head of Pharmacognosy with botany course department
Perm State Pharmaceutical Academy
ORCID: 0000-0001-8414-4367
2, Polevaya str., Perm, Russia, 614990;
belonogova@pfa.ru; +7(342)2384338

Ivshina Irina Borisovna, Doctor of Microbiology, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of Alkanotrophic Microorganism Laboratory
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS
ORCID: 0000-0003-2558-4789
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
ivshina@iegm.ru; (342)2808114
Professor of the department Microbiology and Immunology
Perm State University. 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

