

УДК 573.6:579.66:632.954

О. С. Игнатовец, В. Н. Леонтьев, Е. В. Марцунь, Т. И. Ахрамович
Белорусский государственный технологический университет

**СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕГРАДАЦИИ
ПЕСТИЦИДОВ ГРУППЫ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ
МИКРООРГАНИЗМАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ**

Наиболее важной составляющей разложения гербицидов в почве является деградация почвенной микробиотой, которая осуществляется благодаря способности микроорганизмов адаптировать свои ферментные системы к определенным субстратам и трансформировать их. Биоаугментация является одним из самых экологических и экономичных методов ремедиации природных объектов. Однако использование этого способа предусматривает необходимость получения всесторонней информации о миграции, кумуляции и превращениях пестицидов в природных средах (динамике), а также факторах, повышающих эффективность целенаправленного применения бактерий-деструкторов (иммобилизация, внесение дополнительных субстратов).

В настоящей работе рассмотрены вопросы влияния различных факторов на эффективность деградации пестицидов группы сульфониломочевины в почве. Исследования показали, что интенсификация процессов деструкции остаточных количеств трибенурон-метила и метсульфурон-метила в почве и жидкой среде может быть достигнута за счет создания оптимальных условий культивирования бактерий-деструкторов, а также при использовании иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Ключевые слова: пестициды, иммобилизация, бактерии-деструкторы, трибенурон-метил, метсульфурон-метил, экстракция, хроматомасс-спектрометрия.

O. S. Ignatovets, V. N. Leontiev, A. V. Martsul, T. I. Akhramovich
Belarusian State Technological University

**THE WAYS TO INCREASE THE EFFICIENCY OF DEGRADATION
OF PESTICIDES OF SULPHONYLUREA GROUP
BY MICROORGANISMS-DESTRUCTORS**

The most important component of destruction of herbicides in soil is their degradation by soil microbiota, which occurs due to the capability of microorganisms to adapt their enzymatic systems to specific substrates and to transform them. Bioaugmentation is one of the most ecological and economical methods of remediation of natural objects. However, the use of this way provides the need to receive a comprehensive information about migration, cumulation and transformations of pesticides in the environment (about dynamics) and also about factors, which increase the efficiency of focused application of bacteria-destructors (immobilization, introduction of additional substrates).

This research is focused on the study of the influence of different factors on the efficiency of degradation of pesticides of sulphonylurea group in soil. The results show that intensification of process of degradation of remaining amounts of tribenuron-methyl and metsulfuron-methyl in soil and liquid medium can be achieved by the exposure of bacteria-destructors to optimal conditions during cultivation as well as by the use of immobilized cells of microorganisms.

Key words: pesticides, immobilization, bacteria-destructors, tribenuron-methyl, metsulfuron-methyl, chromato-mass-spectrometry.

Введение. Определяющую роль в получении стабильных и высоких урожаев играют, как правило, гербициды (30–40% сохраненного урожая). Среднегодовая пестицидная нагрузка на сельскохозяйственные земли Республики Беларусь, выраженная в количестве действующего вещества пестицидов, составляет 0,6–1,0 кг д. в./га [1]. В настоящее время для защиты сельскохозяйственных культур от сорных растений используются гербициды четвертого поколения, действующим веществом которых являются производные сульфониломочевины [2, 3]. Масшта-

бы применения указанных ксенобиотиков на сельскохозяйственных площадях нашей республики к настоящему времени достигли, например, на посевах кукурузы 80% от общего количества всех применяемых гербицидов. В сельском хозяйстве Республики Беларусь гербициды из этой группы представлены 15 д. в., на основе которых разрешено к применению 45 препаратов пестицидов группы сульфониломочевины (ПГС) [4]. Однако, несмотря на низкие нормы расхода (от 2 до 70 г/га), появились данные о том, что применение указанных

пестицидов оказывает негативное влияние на агрофитоценозы и их основные компоненты: сельскохозяйственную почву, растительный покров, наземную и почвенную биоту, водные объекты [5]. Длительное использование указанных пестицидов сопровождается такими нежелательными явлениями, как повреждение чувствительных культур, временная депрессия биологической активности почвы, появление устойчивых биотипов сорняков и др. Наряду с остатками пестицидов, в почве обнаруживаются и их достаточно персистентные метаболиты, что дополняет перечень эколого-токсикологических проблем, связанных с использованием ядохимикатов [6]. Одним из перспективных направлений экологической биотехнологии является интродукция активных микроорганизмов-деструкторов ксенобиотиков в почвы, загрязненные пестицидами. При этом необходимо получение всесторонней информации о миграции, кумуляции и превращениях пестицидов в природных средах (динамике), а также факторах, повышающих эффективность целенаправленного применения бактерий-деструкторов (иммобилизация, внесение дополнительных субстратов). Результатом применения микробных препаратов для решения обозначенных проблем является, в первую очередь, сокращение потерь урожая сельскохозяйственных культур вследствие фитотоксического последствия остатков гербицидов в севооборотах, а также предотвращение включения пестицидов в различные миграционные цепи. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы являлся подбор оптимальных условий культивирования бактерий-деструкторов, увеличивающих эффективность деградации ПГС, а также изучение возможности применения иммобилизованных микроорганизмов для ремедиации загрязненных почв.

Основная часть. В настоящее время на кафедре биотехнологии и биоэкологии БГТУ создана коллекция почвенных бактерий-деструкторов метсульфурон-метила (МСМ) и трибенурон-метила (ТУМ), которая включает 6 штаммов бактерий-деструкторов МСМ и 5 штаммов-деструкторов ТУМ [7]. На первом этапе исследовательской работы были определены оптимальные условия культивирования бактерий Т5, Т6 и М1, которые являются деструкторами ТУМ и МСМ соответственно. Критерием отбора являлась удельная скорость роста культуры, при использовании соответствующих пестицидов в качестве единственного источника углерода. В ходе эксперимента варьировались следующие факторы: температура, степень аэрации, концентрация пестицида. Влияние гербицида на рост чистых культур микроорганизмов

изучали путем их посева на плотную глюкозо-солевую среду ММ9 с различными концентрациями гербицидов: 0,10, 0,05 и 0,01%. Результаты, полученные после инкубирования посевов при 30°C в течение 48 ч, показали, что присутствие в среде гербицидов в концентрации 0,10 и 0,05% оказывает ингибирующее действие на бактерии. В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали питательные среды, содержащие 0,01% ТУМ и МСМ. Отношение микроорганизмов к температуре окружающей среды устанавливали путем культивирования бактерий-деструкторов в жидкой среде ММ9 с соответствующими пестицидами (0,01% об.). Опыты проведены при следующих температурах: 20, 25, 30°C. По результатам экспериментов построены кривые роста культур и определены кинетические параметры. Установлено, что самую высокую удельную скорость роста клетки всех исследуемых бактерий-деструкторов демонстрировали при 20°C. Данный факт объясняется тем, что данные культуры являются почвенными бактериями и были выделены из естественных источников (почв, загрязненных соответствующими пестицидами), годовая среднесуточная температура которых составляет 16–18°C.

Для определения оптимальной степени аэрации бактерии-деструкторы культивировали в жидкой солевой среде ММ9 с пестицидом в качестве единственного источника углерода при следующих параметрах: температура – 20°C, скорость оборотов качалки – 0, 50, 100 и 200 об/мин. Концентрацию пестицидов в среде контролировали с помощью метода ВЭЖХ-МС. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы гербицидов с концентрацией, мг/мл: 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости бактерий Т5 представлена на рис. 1. Наиболее высокую скорость роста клетки штамма Т5 (деструкторы ТУМ) демонстрировали при отсутствии аэрации, а удельная скорость культуры бактерий М1 (деструкторы МСМ) была максимальной при степени аэрации 50 об/мин. Культивирование бактерий-деструкторов ТУМ в оптимальных условиях позволяет повысить прирост биомассы, увеличивает скорость деградации указанного пестицида, снижает период адаптации клеток к ксенобиоту, при этом остаточное количество токсичного субстрата уменьшалось на $(14,0 \pm 1,5)\%$ по сравнению с контрольными показателями и составила 24% от исходного (рис. 2, а).

Концентрация МСМ в культуральной жидкости бактерий М1, культивируемых при оптимальных параметрах, уменьшилась не так значительно, и составила 37% от исходной (рис. 2, б).

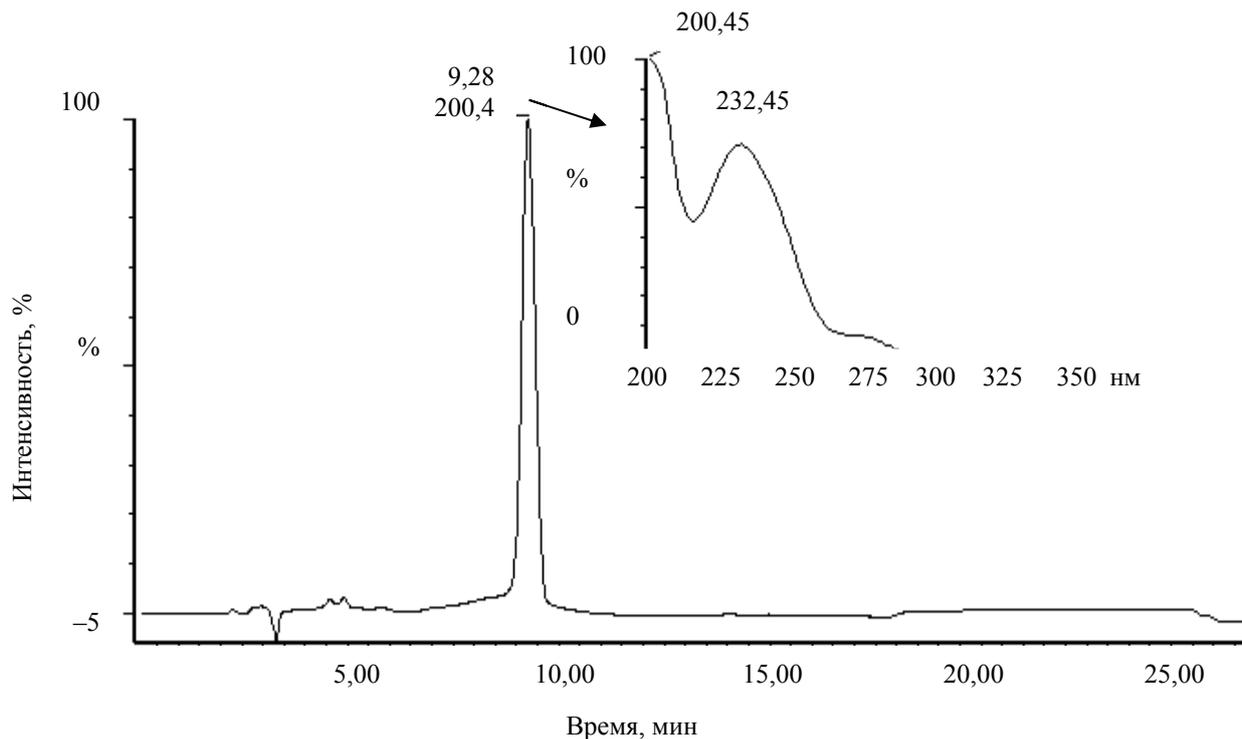


Рис. 1. Хроматограмма экстракта культуральной жидкости бактерий Т5, культивируемых с ТУМ в качестве единственного источника углерода

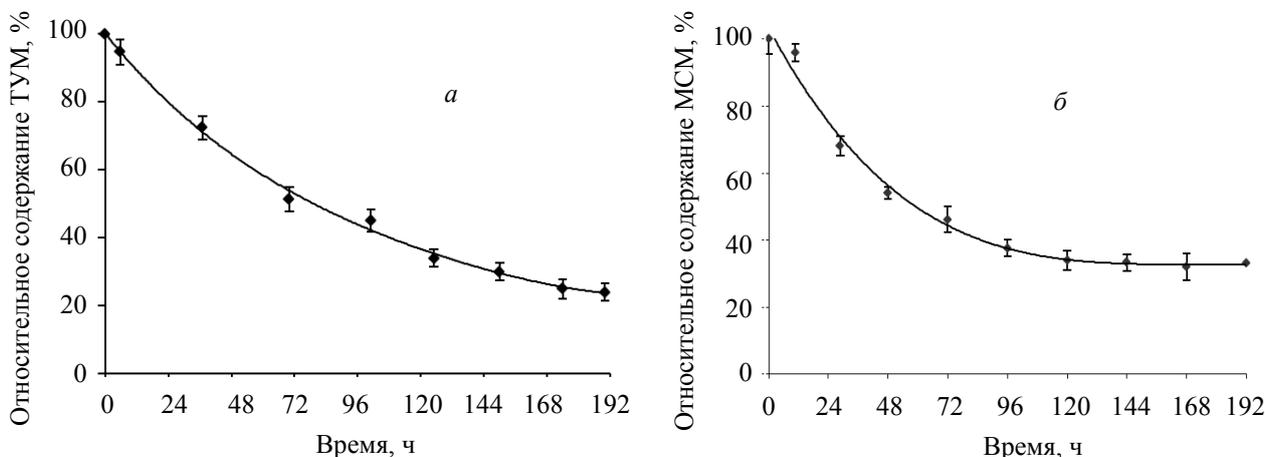


Рис. 2. Кинетические кривые деградации пестицидов группы сульфонилмочевины бактериями-деструкторами:
а – ТУМ; б – МСМ

Эффективность деградации пестицидов значительно повышает иммобилизация клеток микроорганизмов-деструкторов, а также добавление в среду дополнительных косубстратов [8].

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ как перед иммобилизованными ферментами, так и перед свободными клетками, так как обладают более высокой метаболической активностью, устойчивостью к действию высоких концентраций ксенобиотиков, а также возможностью создания условий для автосе-

лекции штаммов, обмена генетическим материалом [9]. Одним из наиболее часто практикуемых является метод иммобилизации клеток путем их адгезии на поверхности носителя [10].

Сорбционный метод иммобилизации отличается дешевизной, универсальностью, отсутствием стрессовых воздействий на клетки и простотой реализации. Количество иммобилизованных клеток увеличивается при повышении удельной поверхности носителя, и поэтому для закрепления микробных клеток применяют

дисперсные, волокнистые, перфорированные материалы. При использовании микробиологической деградации в процессах очистки почв от ПГСМ, наиболее часто применяют природные носители, такие как торф, активированный уголь и т. д. Данный подход исключает вторичные загрязнения почвы, при этом торф стимулирует развитие как аборигенных микроорганизмов-деструкторов, так и интродуцированных активных культур. В целом носители могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на физиологию микроорганизмов.

В связи с этим на следующем этапе было проведено исследование микробной деградации ТУМ и оценена эффективность данного процесса, осуществляемого бактериями-деструкторами Т5 в модельной почвенной системе как иммобилизованными клетками, так и свободными. В качестве носителя был выбран торф (м. р. «Туршовка», время отбора 03.09.2014 г., степень разложения 20%, Ø 0,5–1,0 мм). Лабораторные испытания способа биоремедиации почвы, загрязненной ТУМ в модельных условиях, проводили в стеклянных чашках Петри. Культуры микроорганизмов-деструкторов иммобилизованные на торфе, интродуцировали в почву, загрязненную ТУМ в количестве 0,01% в соответствии со следующей схемой:

- почва + торф + культура;
- почва + торф + пестицид;
- почва + культура + пестицид;
- почва + торф + культура + пестицид.

Загрязненную почву компостировали в течение 28 дней в условиях постоянной темпера-

туры, соответствующей оптимальной для данной культуры (20°C) и влажности 60% (от полной влагоемкости). Образцы почвы для микробиологических и физико-химических исследований отбирали в день закладки опыта и в течение эксперимента через 1, 7, 14, 21 и 28 сут. В ходе эксперимента контролировали содержание гербицида в почве, а также количество бактерий-деструкторов. Для экстракции ксенобиотика из почвы использовали хлороформ. Определение концентрации гербицидов в образцах почвы проводили методом ВЭЖХ-МС. Общую численность микроорганизмов в ходе эксперимента определяли чашечным методом Коха. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Изучение процесса деградации ТУМ (внесенное количество 1 мг/г сухой почвы) в модельном эксперименте со стерильной почвой показало, что концентрация ТУМ в течение 28 дней практически не изменялась, что указывает на отсутствие химического взаимодействия этого соединения с компонентами почвы. Деградация ТУМ в почве, содержащей иммобилизованные интродуцированные клетки бактерий-деструкторов, заметна уже на 7-е сутки.

ТУМ в почве разлагается достаточно быстро, через 14 дней его остаточное количество составляло 15%, а через месяц он присутствовал в следовых количествах (0,3%). В процессе биodeградации ТУМ в почве обнаруживались такие промежуточные продукты, как сахарин и 2-гидрокси-4-метил-6-диметиламино-1,3,5-триазин, но они довольно быстро подвергались дальнейшей трансформации.

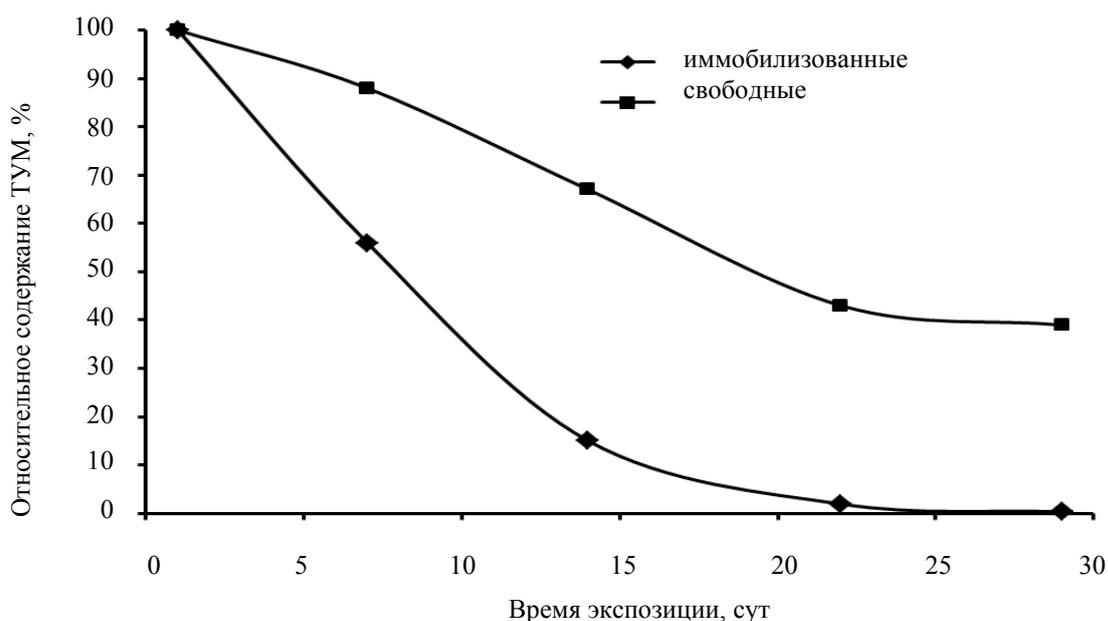


Рис. 3. Динамика деградации ТУМ свободными и иммобилизованными бактериями-деструкторами Т5 в модельно-загрязненной почве

Активность бактерий-деструкторов, интродуцированных в почву без предварительной иммобилизации, была намного ниже. Адаптационный период бактерий составил порядка 14 дней, разложение ТУМ шло достаточно медленно и через месяц составляло 39% от исходного, дальнейшего разложения ксенобиотика не происходило.

Помимо анализа изменения концентрации ТУМ в образцах почвы исследовали также развитие интродуцированной культуры. Величина КОЕ на 1 г сухой почвы в начале эксперимента с иммобилизованными клетками составила $6,1 \cdot 10^7$ кл/г. Анализ роста интродуцированной культуры показал, что после первых семи суток экспозиции численность КОЕ снизилась на порядок, а затем монотонно повышалась и была максимальной на 14-е сутки эксперимента. Затем наблюдали снижение этого показателя, вследствие истощения в среде основного источника питания.

Сравнительный анализ количества клеток в модельных почвенных системах с ТУМ и в мо-

дельной почвенной системе без ТУМ показал, что максимальная концентрация бактерий штамма деструктора в почве с ТУМ выше максимальной концентрации указанных микроорганизмов в почве в отсутствие гербицида. Это свидетельствует о том, что ТУМ не оказывает ингибирующего действия на рост клеток бактерий-деструкторов, а наоборот, является ростовым субстратом.

Заключение. Таким образом, установлено, что иммобилизованные на торфе клетки штамма Т5 способны осуществлять полную деградацию ТУМ в модельно-загрязненной почве с высокой эффективностью, что обеспечивает возможность использования указанных бактерий в технологиях биоремедиации почв, загрязненных данным гербицидом.

В работе также экспериментально определены оптимальные условия культивирования бактерий деструкторов ТУМ и МСМ (определены следующие параметры: степень аэрации, температура, начальная концентрация гербицида, состав питательной среды).

Литература

1. Национальная система мониторинга окружающей среды Республики Беларусь: результаты наблюдений, 2011 [Электронный ресурс]. Электронные, текстовые, графические данные. Минск: Бел НИЦ «Экология», 2012.
2. Макеева-Гурьянова Л. Т., Спиридонов Ю. Я., Шестаков В. Г. Сульфонилмочевины – новые перспективные гербициды // *Агрохимия*. 1989. № 2. С. 115–128.
3. Грапов А. Ф. Химические средства защиты растений XXI века. М.: ВНИИХСЗР, 2006. 402 с.
4. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь [Электронный ресурс] // Главная государственная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений. Минск, 2014. URL: http://www.ggiskzr.by/doc/protection/reestr_2014_1_Perechen.pdf. (Дата обращения: 02.02.2015).
5. Спиридонова Ю. Я., Шестаков В. Г. Гербициды и окружающая среда // *Агрохимия*. 2000. № 1. С. 37–41.
6. Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management / Rijeka, Croatia: In Tech, 2011. P. 520.
7. Игнатовец О. С., Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И. Выделение и характеристика почвенных бактерий – деструкторов метсульфурон-метила. // *Актуальные проблемы экологии – 2012: материалы VIII Международной науч.-практ. конференции*, Гродно, 24–26 окт. 2012 г. / Гродн. гос. ун-т им. Янки Купалы. Гродно: ГрГУ, 2012. С. 144–145.
8. Bengtsson G., Carlsson C. Degradation of dissolved and sorbed 2,4-dichlorophenol in soil columns by suspended and sorbed bacteria // *Biodegradation*. 2001. Vol. 12, no. 6. P. 419–432.
9. Макаревич А. В. Иммобилизация микроорганизмов-деструкторов на носителе // *Биотехнология*. 2005. № 3. С. 56–63.
10. Физико-химические основы иммобилизации микроорганизмов методом сорбции / Е. И. Козляк [и др.] // *Приклад. биохимия и микробиология*. 1991. Т. 27, № 6. С. 788–803.

References

1. *Natsional'naya sistema monitoringa okruzhayushchey sredy Respubliki Belarus': rezul'taty nablyudeniya, 2011* [National Environmental Monitoring System of the Republic of Belarus: Observation Results, 2011]. Electronic resource. Minsk, Bel NITs "Ekologiya", 2012.
2. Makeeva-Gur'yanova L. T., Spiridonov Yu. Ya., Shestakov V. G. Sulphonylureas – are new promising herbicides. *Agrokhimiya* [Agrochemistry], 1989, no. 2, pp. 115–128 (in Russian).
3. Grapov A. F. *Khimicheskie sredstva zashchity rasteniy XXI veka* [Plant protection of chemicals of XXI century]. Moscow, VNShKhSZR Publ., 2006. 402 p.

4. Pleshko L. V., Khvaley O. A., Gololob T. I., Apanovich A. Yu., Boyarchuk V. E., Pesterev S. A. *Gosudarstvennyy reestr sredstv zashchity rasteniy (pestitsidov) i udobreniy, razreshennykh k primeneniyu na territorii Respubliki Belarus'* [State Register of plant protection products (pesticides) and fertilizers permitted for use on the territory of the Republic of Belarus]. Available at: http://www.ggiskzr.by/doc/protection/reestr_2014_1_Perechen.pdf. (accessed 02.02.2015).

5. Spiridonova Yu. Ya., Shestakov V. G. Herbicides and the environment. *Agrokimiya* [Agrochemistry], 2000, no. 1, pp. 37–41 (in Russian).

6. Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management. Rijeka, Croatia, InTech Publ., 2011, 520 p.

7. Ignatovets O. S., Leontiev V. N., Akhramovich T. I. [Isolation and characteristic of soil bacteria-destroyers of metsulfuron-methyl]. *Materialy VIII Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii (Aktualnye problemy ekologii – 2012)* [Materials of the VIII International Scientific and Practical Conference (Actual problems of ecology – 2012)]. Grodno, 2012, pp. 144–145 (in Russian).

8. Bengtsson G., Carlsson C. Degradation of dissolved and sorbed 2,4-dichlorophenol in soil columns by suspended and sorbed bacteria. *Biodegradation*, 2001, vol. 12, no 6, pp. 419–432.

9. Makarevich A. V. Immobilization of microorganisms-destroyers on the carrier. *Biotekhnologiya* [Biotechnology], 2005, no. 3, pp. 56–63 (in Russian).

10. Kozlyak E. I. Physico-chemical basics of immobilization of microorganisms by sorption. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 1991, vol. 27, no. 6, pp. 788–803 (in Russian).

Информация об авторах

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatovets@belstu.by

Марцуль Елена Владимировна – магистр биологических наук, инженер кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lana.martsul@gmail.com

Ахромович Татьяна Игоревна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ahramovich@belstu.by

Леонтьев Виктор Николаевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Information about the authors

Ignatovets Olga Stepanovna – Ph. D. Biology, senior lecturer, Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

Leontiev Viktor Nikolaevich – Ph. D. Chemistry, associate professor, Head of the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Martsul Alena Vladimirovna – M. Sc. Biology, engineer, Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lana.martsul@gmail.com

Akhramovich Tatiana Igorevna – Ph. D. Biology, associate professor, Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ahramovich@belstu.by

Поступила 20.02.2015