

УДК 573.6:579.66:632.954

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

### **ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ 2,4-Д И ПЕСТИЦИДОВ ГРУППЫ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ**

Для увеличения урожайности сельскохозяйственных культур путем уничтожения сорных растений используются гербициды, которые по объемам применения являются серьезными источниками загрязнения окружающей среды. Производство и применение пестицидов влияет на состояние среды и представляет потенциальную опасность для здоровья населения. Огромная роль в деградации циркулирующих в окружающей среде ксенобиотиков принадлежит почвенным бактериям. Целенаправленное их использование позволяет осуществить ремедиацию природных объектов без образования продуктов вторичного загрязнения. Поэтому современный этап исследований микробиологической деструкции ксенобиотиков характеризуется выраженным интересом к изучению физиологических, биохимических и генетических особенностей штаммов-деструкторов, анализу путей биотрансформации указанных соединений. В настоящее время одними из наиболее широко применяемых гербицидов являются химические соединения на основе сульфонилмочевины, а также 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4-Д). В настоящей работе показана возможность использования бактерий-деструкторов для деградации остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды. Особое внимание уделено механизмам биотрансформации указанных ксенобиотиков, а также изучению кинетических параметров процесса деградации пестицидов в модельных системах. Разработана методика определения химических соединений на основе сульфонилмочевины и 2,4-Д при их совместном применении.

**Ключевые слова:** пестициды, 2,4-Д, трибенурон-метил, метсульфурон-метил, бактерии-деструкторы, биодegradация, ферменты, интермедиаты, ВЭЖХ-МС.

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

### **STUDY OF MICROBIAL DEGRADATION OF 2,4-D AND PESTICIDES OF SULFONYLUREA GROUP IN MODEL SYSTEMS**

To increase the yield of crops by destroying weeds, herbicides are used, which are the serious sources of environmental pollution. Production and use of pesticides affect the state of the environment and poses a potential hazard to public health. A huge role belongs to the soil bacteria in the xenobiotics degradation than are circulating in the environment. Purposeful use of this bacteria makes it possible to carry out the remediation of natural objects without the formation of secondary pollution products. Therefore, the modern stage of studies of microbiological xenobiotics destruction is characterized by a pronounced interest in studying of the physiological, biochemical and genetic characteristics of the destructor strains, analyzing the pathways of biotransformation of these compounds. Currently, one of the most widely used herbicides are chemical compounds based on sulfonylurea, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). In this paper, the possibility of using of the bacterium-destructors for the degradation of residual amounts of pesticides in environmental objects is demonstrated. The particular attention is paid to the mechanisms of biotransformation of these xenobiotics, as well as to the study of the kinetic parameters of the process of the pesticides degradation in model systems. The method for the determination of chemical compounds based on sulfonylurea and 2,4-D when they are used together has been developed.

**Key words:** pesticides, 2,4-D, tribenuron-methyl, methsulfuron-methyl, bacteria-destructors, biodegradation, enzymes, intermediates, HPLC-MS.

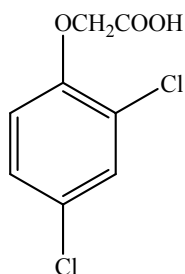
**Введение.** Базовым этапом разработки технологий ремедиации почв от ксенобиотиков является поиск и выделение микроорганизмов, способных использовать их в качестве источника углерода. Галогенароматические соединения широко применяются в сельском хозяйстве в качестве пестицидов различного действия и являются серьезным источником загрязнения

окружающей среды. В настоящее время существует несколько приемов получения бактерий-деструкторов галогенароматических соединений, среди которых наиболее распространены способ накопительной культуры и генетические *in vitro* и *in vivo*.

Почти все известные бактерии-деструкторы хлорированных фенолов выделены способом

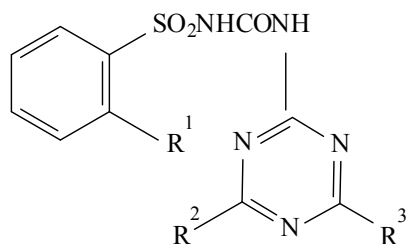
накопительных культур из окультуренных почв, сточных вод и активного ила. В реальных природных условиях объекты окружающей среды подвергаются загрязнению смесью ксенобиотиков. Деградация отдельных компонентов этих смесей может ингибироваться присутствием других компонентов. Это приводит к накоплению токсикантов в среде. Поэтому с практической точки зрения для очистки природных объектов наиболее рационально использование штаммов микроорганизмов, способных усваивать смесь токсикантов [1–3].

Гербициды на основе хлорфеноксиалканкарбоновых кислот (ФКК) интенсивно применяются при уничтожении сорняков. Среди гербицидов этой группы широко применяются препараты натриевой и аммонийной солей, а так же 2,4-Д [4]:



2,4-Д – хлорорганическое соединение, используется как гербицид и регулятор роста растений, входит в состав более 1500 гербицидов. 2,4-Д рекомендуется для контроля широколиственных сорняков при выращивании злаковых культур, обработке газонов и пастбищ [5]. Отметим, что норма внесения гербицида составляет обычно в среднем 1 кг/га в расчете на активное начало, а на сорную растительность попадает не более 5% от этого количества. Остаточное количество гербицида подвергается воздействию абиотических и биотических факторов, основным из которых является деятельность почвенной микробиоты.

В последнее время широкое распространение приобрели гербициды ряда сульфонилмочевины. Общая формула этих соединений:



где  $R^1$  – ароматический и иные радикалы;  $R^2$ ,  $R^3$  – различные заместители. Зачастую, после многократного применения разных гербицидов,

в объектах окружающей среды создается ситуация, когда приходится говорить об остаточных количествах не одного ксенобиотика, а нескольких. В связи с тем что вышеуказанные гербициды по масштабам потребления превосходят остальные химические средства защиты растений, нами была поставлена цель изучить возможность применения почвенных бактерий-деструкторов для создания биопрепаратов, способных осуществлять ремедиацию почв при комплексном загрязнении 2,4-Д и пестицидами группы сульфонилмочевины.

**Основная часть.** Объектами исследования в данной экспериментальной работе являлись почвенные микроорганизмы-деструкторы пестицидов на основе 2,4-Д кислот и производных сульфонилмочевины (трибенурон-метил и метсульфурон-метил). Ранее нами были выделены 8 штаммов бактерий, способных осуществлять деградацию указанных ксенобиотиков при их совместном применении в почвах [6]. Из литературных данных известно, что бактерии родов *Achromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas* sp., *Streptomyces* sp. способны использовать 2,4-Д в качестве единственного источника углерода, а бактерии родов *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. – пестициды на основе сульфонилмочевины.

Используя данные для идентификации, выделенные микроорганизмы охарактеризовали до рода по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам: форма клеток, подвижность, окраска по методу Грама, оксидазная и каталазная активности, способность формировать гранулы поли-β-оксимасляной кислоты и наличие эндоспор. Культурально-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика выделенных бактерий позволила установить, что они являются представителями родов *Pseudomonas* sp. Д2, Д3, Д5 Д6, Д8, *Bacillus* sp. Д1, Д4, Д7. Наиболее активный рост на среде указанными пестицидами демонстрировал штамм Д8, который обладал следующими характеристиками: прямые подвижные короткие палочки, грамотрицательные, обладают каталазной и оксидазной активностью, способны формировать гранулы поли-β-оксимасляной кислоты. Для дальнейших исследований был отобран штамм Д8.

На следующем этапе исследований был осуществлен подбор оптимальных условий культивирования (аэрация, температура, pH). Критерием отбора являлась удельная скорость роста клеток культур при использовании ксенобиотиков в качестве источника углерода. В ходе эксперимента варьировались следующие факторы: температура, степень аэрации, концентрация пестицидов.

Влияние гербицидов на рост чистой культуры бактерий изучали путем их посева штрихом на плотную глюкозосолевою среду ММ9 с различными концентрациями гербицидов: 100, 200 и 300 мг/л. Результаты, полученные после инкубирования посевов при 30°C в течение 48 ч, показали, что присутствие в среде гербицидов в концентрации 200 и 300 мг/л оказывает ингибирующее действие на бактерии, выделенные из почвенных образцов. В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали питательные среды, содержащие 100 мг/л 2,4-Д и 100 мг/л пестицидов группы сульфонилмочевины.

Отношение микроорганизмов к температуре окружающей среды устанавливали путем культивирования бактерий в жидкой среде ММ9 с пестицидом 2,4-Д и трибенурон-метилом (100 мг/л). Опыты проведены при следующих температурах: 20, 25, 30°C. По результатам экспериментов был сделан вывод, что самую высокую удельную скорость роста клетки культур демонстрировали при 20°C. Данный факт объясняется тем, что культуры бактерий-деструкторов выделены из сельскохозяйственных почв, среднесуточная температура которых составляет 16–18°C.

Для определения оптимальной степени аэрации бактерии-деструкторы культивировали в жидкой солевой среде ММ9 с пестицидами при следующих параметрах: температура – 20°C, скорость оборотов качалки – 0, 100 и 200 об/мин. Наиболее высокую скорость роста клетки бактерий-деструкторов штамма Д8 демонстрировали при скорости 100 об/мин. Таким образом, оптимальные условия культивирования бактерий-деструкторов следующие:

температура – 20°C, концентрация пестицидов в среде – 100 мг/л, аэрация – 100 об/мин.

Следующим этапом НИР явилось изучение кинетики и механизма деградации 2,4-Д и трибенурон-метила бактериями-деструкторами. К настоящему времени описаны несколько подходов, позволяющих анализировать дихлорфенольные ксенобиотики и пестициды группы сульфонилмочевины в различных объектах окружающей среды [7–11]. Среди них – метод тонкослойной хроматографии, который используется для анализа смесей пестицидов, требует наличия стандартных веществ, однако точность определений очень невысока. Данный метод не позволяет идентифицировать интермедиаты и исследовать механизмы биodeградации. Метод газожидкостной хроматографии требует специальной пробоподготовки и перевода анализируемых соединений в легколетучие производные. С этих позиций наиболее приемлемым с точки зрения исполнения и информативности является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС), поскольку из анализа масс-спектров образующихся ионов можно получать достоверную информацию о структурах как субстрата, так и интермедиатов.

Динамику превращения 2,4-Д в модельной системе изучали с помощью метода ВЭЖХ-МС, используя пестициды в качестве ростового субстрата бактерий-деструкторов. Содержание пестицидов в среде контролировали по калибровочному графику, построенному на основе стандартных веществ. На рис. 1 представлены хроматограмма культуральной жидкости штамма Д8 на первые (а) и третьи (б) сутки культивирования.

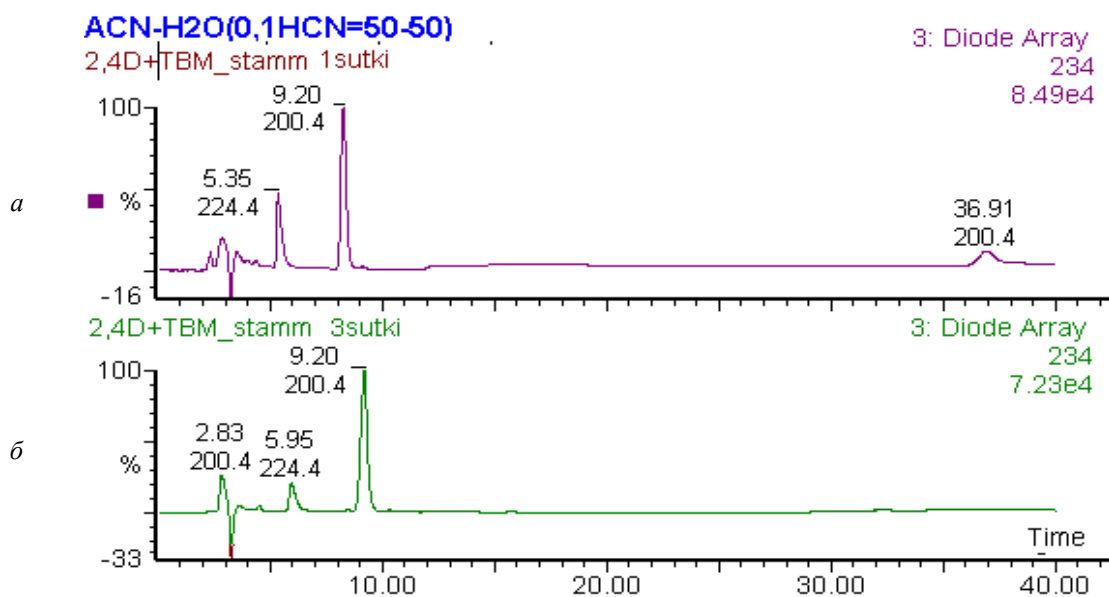


Рис. 1. Хроматограмма культуральной жидкости на первые (а) и третьи (б) сутки культивирования

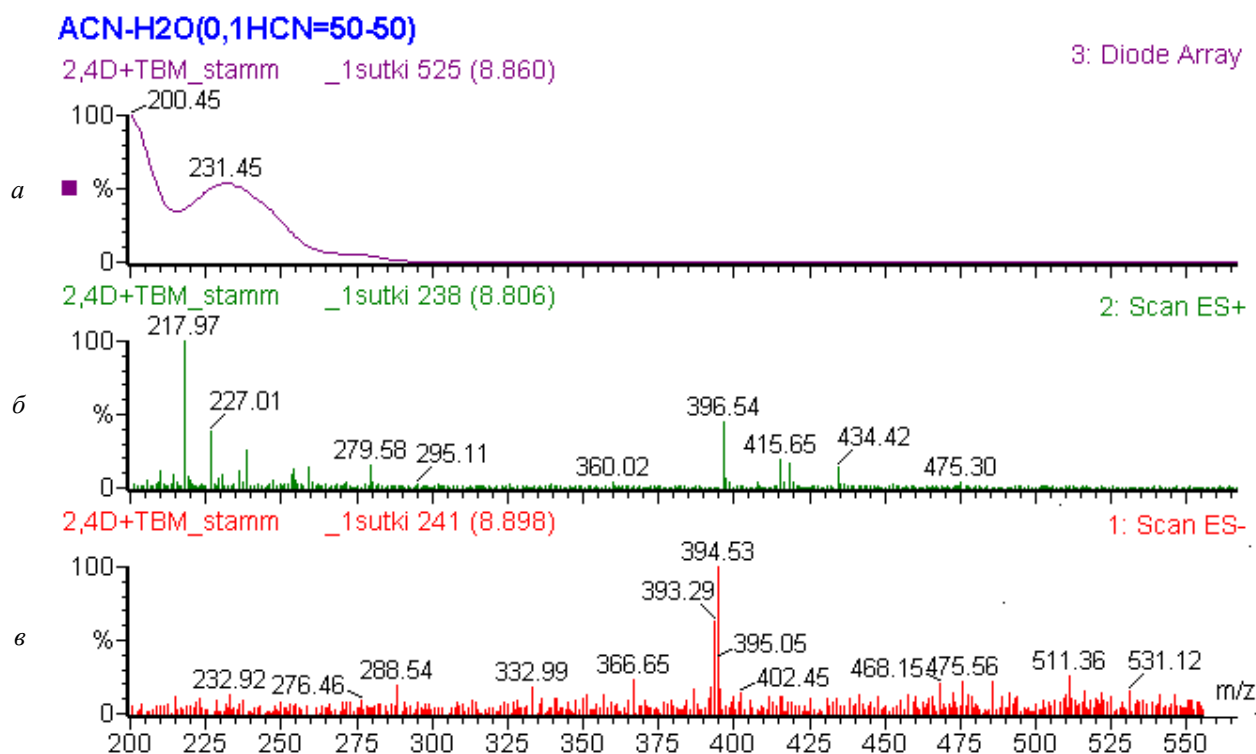


Рис. 2. Электронный (а) и масс-спектры в области положительных (б) и отрицательных (в) ионов трибенурон-метила

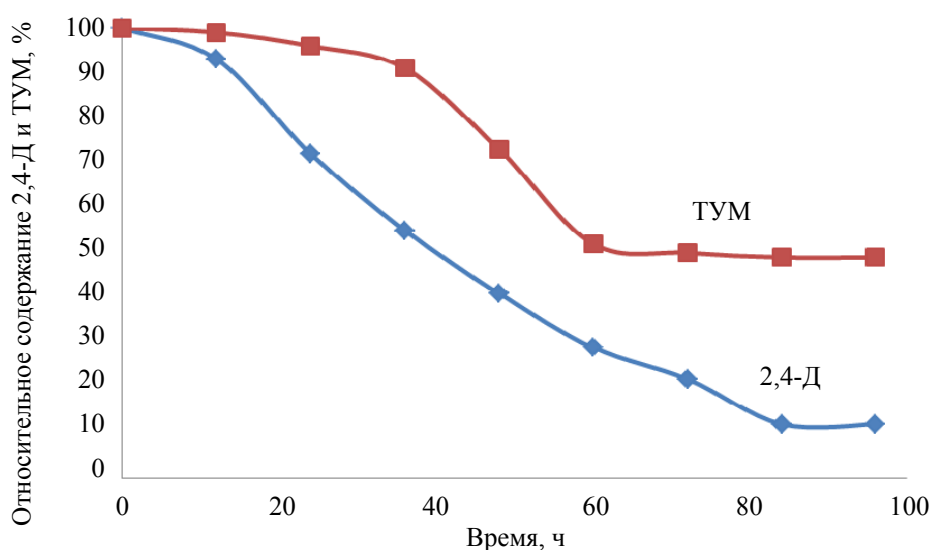


Рис. 3. Кинетическая кривая деградации 2,4-Д и трибенурон-метила (ТУМ) бактериями-деструкторами в модельной системе

Трибенурон-метил обнаруживается на хроматограмме в виде четкого пика со временем удерживания 9,20 мин, пик со временем удерживания 5,35 мин соответствует 2,4-Д. На рис. 2 представлены электронный (а) и масс-спектры (б, в) трибенурон-метила.

В масс-спектре в области положительных ионов (рис. 2, б) обнаруживается пик с  $m/z = 396,5$ , а в области отрицательных ионов –

(рис. 2, в) с  $m/z = 394,5$ , соответствующие молекулярным ионам трибенурон-метила  $[M + H]^+$  и  $[M - H]^-$  соответственно.

Динамика биодеградации пестицидов бактериями штамма Д8 представлена на рис. 3.

В ходе культивирования в течение первых шестидесяти часов деградация 2,4-Д бактериями-деструкторами шла активно и составила около 73%. Остаточное количество 2,4-Д в

среде составляло порядка 12%, дальнейшее разложение ксенобиотика шло довольно медленно и полного исчезновения из среды не наблюдалось. Содержание трибенурон-метила в среде к окончанию культивирования составило порядка 50%.

**Заключение.** Таким образом, можно сделать вывод, что штамм бактерий Д8, выделенный из почв, можно использовать для разработки биопрепарата, предназначенного для

ремедиации объектов окружающей среды, загрязненных 2,4-Д и трибенурон-метилом. Метод ВЭЖХ-МС можно использовать для контроля остаточного количества указанных пестицидов в почве, а также в водных системах. На следующем этапе НИР планируется изучение ключевых ферментов биodeградации ксенобиотиков, а также анализ механизмов деградации 2,4-Д и трибенурон-метила и идентификация всех промежуточных интермедиатов.

### Литература

1. Bae H. S., Lee J. M., Lee S. T. Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter ureafaciens* CPR706 // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. Vol. 145. No. 1. P. 125–129.
2. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria / C. C. Wang [et al.] // *Chemosphere*. 2000. Vol. 41. No. 12. P. 1873–1879.
3. Arora P. K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // *Microb Cell Fact.* 2014. Vol. 13. No. 1. P. 31–47.
4. Халаф В. А., Турчин В. О., Зайцев В. Н. Определение 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в водных объектах окружающей среды // *Методы и объекты химического анализа*. 2009. Т. 4. № 1. С. 67–72.
5. 2,4-D. Chemical Watch Factsheet [Электронный ресурс] // *A Beyond Pesticides Factsheet*: сайт. URL: <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pesticides/factsheets/2-4-D.pdf> (дата обращения: 17.02.2016).
6. Применение микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации почв, загрязненных 2,4-Д и пестицидами группы сульфонилмочевины / О. С. Игнатовец, Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович // *Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века = Sakharov readings 2017: environmental problems of the XXI century: материалы 17-й Междунар. науч. конф., 18–19 мая 2017 г., г. Минск: в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол.: С. Е. Головатый [и др.]; под ред. д-ра ф.-м. н., проф. С. А. Маскевича, д-ра с.-х. н., проф. С. С. Позняка. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. Ч. 2. С. 27–28.*
7. Patnaik P., Khoury J. N. Determination of acid herbicides in water by GC-MS: a modified method using single extraction and methanol esterification // *American Laboratory*. 2005. Vol. 37. No. 7. P. 12–14.
8. Multiresidue determination of chlorophenoxy acid herbicides in human urine samples by use of solid-phase extraction and capillary LC-UV detection / N. Rosales-Conrado [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 390. No. 2. P. 759–768.
9. Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient / N. Rosales-Cornado [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. 2002. Vol. 470. P. 147–154.
10. Морозова В. С., Левашова А. И., Еремин С. А. Определение пестицидов методом иммуноферментного анализа // *Журн. аналит. химии*. 2005. Т. 60. № 3. С. 230–246.
11. Методы определения остаточных количеств пестицидов в растениях, почве и воде: метод рекомендации / П. М. Кислушко [и др.]; под ред. П. М. Кислушко; РУП «Ин-т защиты растений». Несвиж: Несвиж. тип. им. С. Будного, 2013. 256 с.

### References

1. Bae H. S., Lee J. M., Lee S. T. Biodegradation of 4-chlorophenol via a hydroquinone pathway by *Arthrobacter ureafaciens* CPR706. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, vol. 145, no. 1, pp. 125–129.
2. Chun Chin Wang, Chi Mei Lee, Chih Jen Lu, Ming Shang Chuang, Chiou Zong Huang. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria. *Chemosphere*, 2000, vol. 41, no. 12, pp. 1873–1879.
3. Arora P. K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb Cell Fact.*, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 31–47.
4. Halaf V. A., Turchin V. O., Zaitsev V. N. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous environmental samples. *Metody i ob'ekty khimicheskogo analiza* [Chemical analysis methods and objects], 2009, vol. 4, no. 1, pp. 67–72 (In Russian).
5. 2,4-D. Chemical Watch Factsheet. Available at: <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pesticides/factsheets/2-4-D.pdf> (accessed 17.02.2016).
6. Ignatovets O. S., Feskova A., Leont'ev V. N., Akhramovich T. I. The use of microorganisms- destructors for bioremediation of soils contaminated with 2,4-D and pesticides of the sulfonylurea group.

*Sakharovskie chteniya 2017 goda: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 17-y Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, 18–19 maya 2017 g.* [Sakharov readings 2017: environmental problems of the 21 century: materials of the 17th International Scientific Conference, May 18–19, 2017], Minsk, Part 2, pp. 27–28 (In Russian).

7. Patnaik P., Khoury J. N. Determination of acid herbicides in water by GC-MS: a modified method using single extraction and methanol esterification. *American Laboratory*, 2005, vol. 37, no. 7, pp. 12–14.

8. Rosales-Conrado N., León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Multiresidue determination of chlorophenoxy acid herbicides in human urine samples by use of solid-phase extraction and capillary LC-UV detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, vol. 390, no. 2, pp. 759–768.

9. Rosales-Conrado N., León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M. Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient. *Anal. Chim. Acta*, 2002, vol. 470, no. 2, pp. 147–154.

10. Morozova V. S., Levashova A. I., Eremin S. A. Determination of pesticides by enzyme immunoassay. *Zhurn. analit. khimii* [Journal of analytical chemistry], 2005, vol. 60, no. 3, pp. 230–246 (In Russian).

11. Kislushko P. M., Petrashkevich N. V., Kivachitskaya M. M., Zayats M. F., Grushenko M. M., Bykovskii A. V. *Metody opredeleniya ostatochnykh kolichestv pestitsidov v rasteniyakh, pochve i vode: metodicheskie rekomendatsii* [Methods for determination of residual amounts of pesticides in plants, soil and water: methodical recommendations]. Nesvizh, Nesvizh. tip. im. S. Budnogo Publ., 2013. 256 p.

### Информация об авторах

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

**Феськова Елена Владимировна** – кандидат технических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии и биоэкологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

**Ахрамович 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** – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatovets@belstu.by

**Feskova Alena** – PhD (Engineering), Senior Researcher, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

**Akhramovich Tatiana Igorevna** – PhD (Biology), Assistant Professor, the Department of Biotechnology and Bioecology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ahramovich@belstu.by

**Leontiev Viktor Nikolaevich** – PhD (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

Поступила 18.04.2018