

УДК 573.6:579.66:632.954

В. Н. Леонтьев, кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой (БГТУ);
Т. И. Ахрамович, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ);
О. С. Игнатовец, кандидат биологических наук, ассистент (БГТУ);
О. И. Лазовская, инженер (БГТУ)

ЕСТЕСТВЕННЫЕ ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ ГЕРБИЦИДОВ РЯДА СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ

В настоящее время в сельском хозяйстве большое внимание уделяется разработке и использованию малозатратных и в то же время эффективных методов борьбы с сорной растительностью. В связи с этим широкое распространение приобрели гербициды ряда сульфонилмочевины. В работе представлены общая характеристика, механизм действия, пути деградации (гидролиз, фотохимическая трансформация и микробная деградация) метсульфурон-метила и трибенурон-метила. Показана ключевая роль хромато-масс-спектрометрии в установлении механизмов разложения данных гербицидов почвенными микроорганизмами.

Currently in agriculture much attention is paid to development and use of low-cost and at the same time effective methods of fight against weeds. In this regard, widely purchased sulfonylurea herbicides. The paper presents the general characteristics, mechanism of action, degradation pathways (hydrolysis, photochemical transformation and microbial degradation) of metsulfuron-methyl and tribenuron-methyl. The key role of chromato-mass-spectrometry to establish the mechanisms of destruction these herbicides by soil microorganisms is shown.

Введение. Производные сульфонилмочевины – класс химических соединений, к которому принадлежат гербициды нового поколения, проявляющие высокую биологическую активность при нормах расхода на 1–2 порядка ниже по сравнению с традиционно применяемыми препаратами.

Типичными представителями соединений ряда сульфонилмочевины являются метсульфурон-метил и трибенурон-метил (рис. 1).

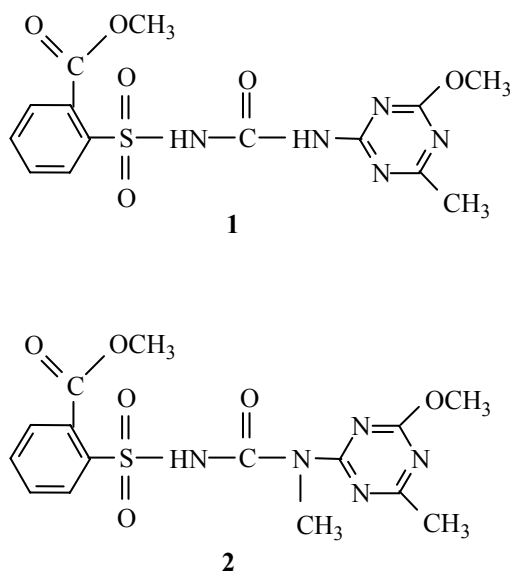


Рис. 1. Структурные формулы соединений ряда сульфонилмочевины:
 1 – метсульфурон-метил; 2 – трибенурон-метил

Гербициды на их основе применяются на посевах злаковых, льна, кукурузы, хлопка, арахиса,

риса, сои и других культур для борьбы с двудольными сорняками, в том числе устойчивыми к 2,4-Д [1].

Метсульфурон-метил является действующим веществом таких препаратов, как «Аккурат», «Ларен Про», «Магнум», «Метурон», «Раджметсол» (норма расхода 8–10 г/га), трибенурон-метил – «Гармонд», «Гранд», «Гранстар», «Гюрза», «Тамерон», «Трибун» (норма расхода 15–25 г/га) [2].

Основная часть. Механизм действия гербицидов ряда сульфонилмочевины состоит в ингибировании ацетолактатсинтазы – ключевого фермента биосинтеза аминокислот с алкильными боковыми цепями (рис. 2).

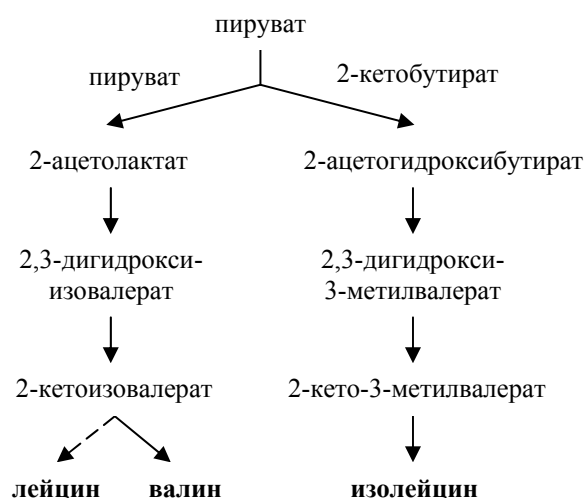


Рис. 2. Схема биосинтеза аминокислот с алкильными боковыми цепями

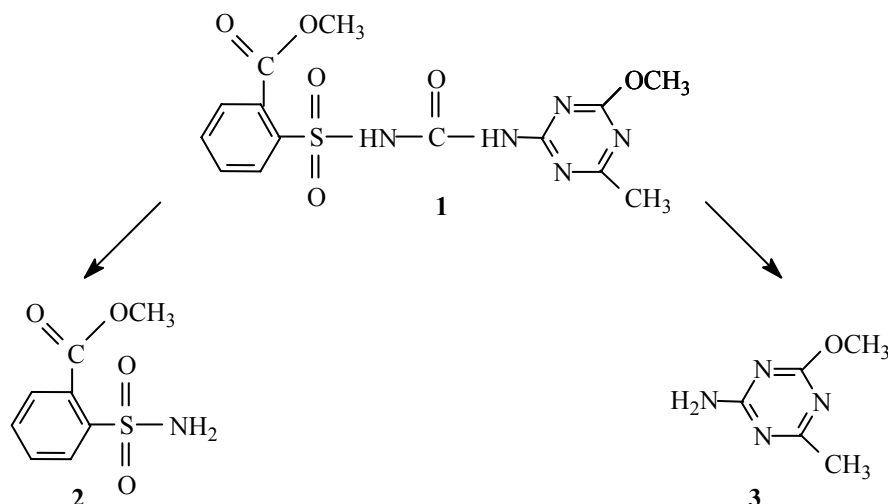


Рис. 3. Основные продукты гидролиза метсульфурон-метила:
 1 – метсульфурон-метил; 2 – метил-2-(аминосulфонил)-бензоат;
 3 – 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин

Под воздействием этих гербицидов клетки прекращают делиться и растение погибает. У культурных растений, устойчивых к сульфонилмочевинам, происходит их метаболизация. Ацетолактатсинтаза контролирует синтез алифатических аминокислот с разветвленным углеродным скелетом, из-за дефицита которых нарушается синтез белка и замедляется деление клеток. В результате растение останавливается в росте и постепенно погибает. Существенным фактом является отсутствие фермента ацетолактатсинтазы у теплокровных, в частности у человека, что объясняет безопасность этих препаратов для нерастительных объектов [3].

Разложение гербицидов в почве может происходить под действием химических (гидролиз), физических (фотолиз) и биологических (микробная деградация) факторов.

Гидролиз соединений ряда сульфонилмочевины протекает за счет влаги, адсорбированной частицами почвы. Скорость гидролиза зависит от химической структуры гербицидов, а также от внешних условий – температуры, влажности, уровня кислотности и типа почв [1].

Основные продукты гидролиза метсульфурон-метила и трибенурон-метила, по данным литературы [4, 5], представлены на рис. 3 и 4 соответственно.

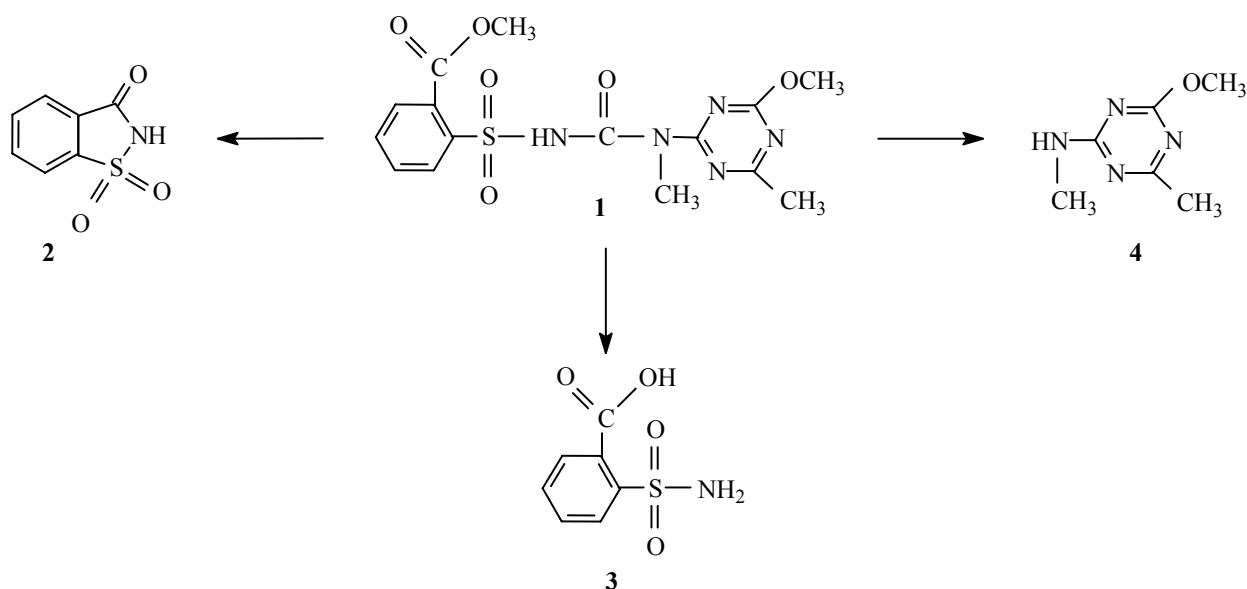


Рис. 4. Основные продукты гидролиза трибенурон-метила:
 1 – трибенурон-метил; 2 – 1,2-бензизотиазол-3(2H)-он-1,1-диоксид (сахарин);
 3 – 2-(аминосulфонил)-бензойная кислота; 4 – 4-метокси-6-метил-2-аминометил-1,3,5-триазин

Фотолиз представляет собой ионно-радикальный процесс превращения вещества под действием квантов поглощенного электромагнитного излучения в ультрафиолетовой или видимой областях спектра.

Поскольку производные сульфонилмочевины имеют ароматические углеводородные и гетероциклические хромофорные группы, поглощающие излучение в УФ области спектра, то под его воздействием гербициды претерпевают трансформации, приводящие, в конечном итоге, к деградации этих соединений.

Фотолиз метсульфурон-метила сильно зависит от pH. Фотодеструкция более интенсивно протекает с неионизированной формой метсульфурон-метила, причем продукты отличаются в случае использования различных растворителей, а также при воздействии излучения с разными значениями длин волн (рис. 5). Механизм фотохимической трансформации метсульфурон-метила может протекать по четырем основным конкурентным путям: разрыв связей C-N, N-CO, N-S и S-C в сульфонилмочевинном фрагменте молекулы [6].

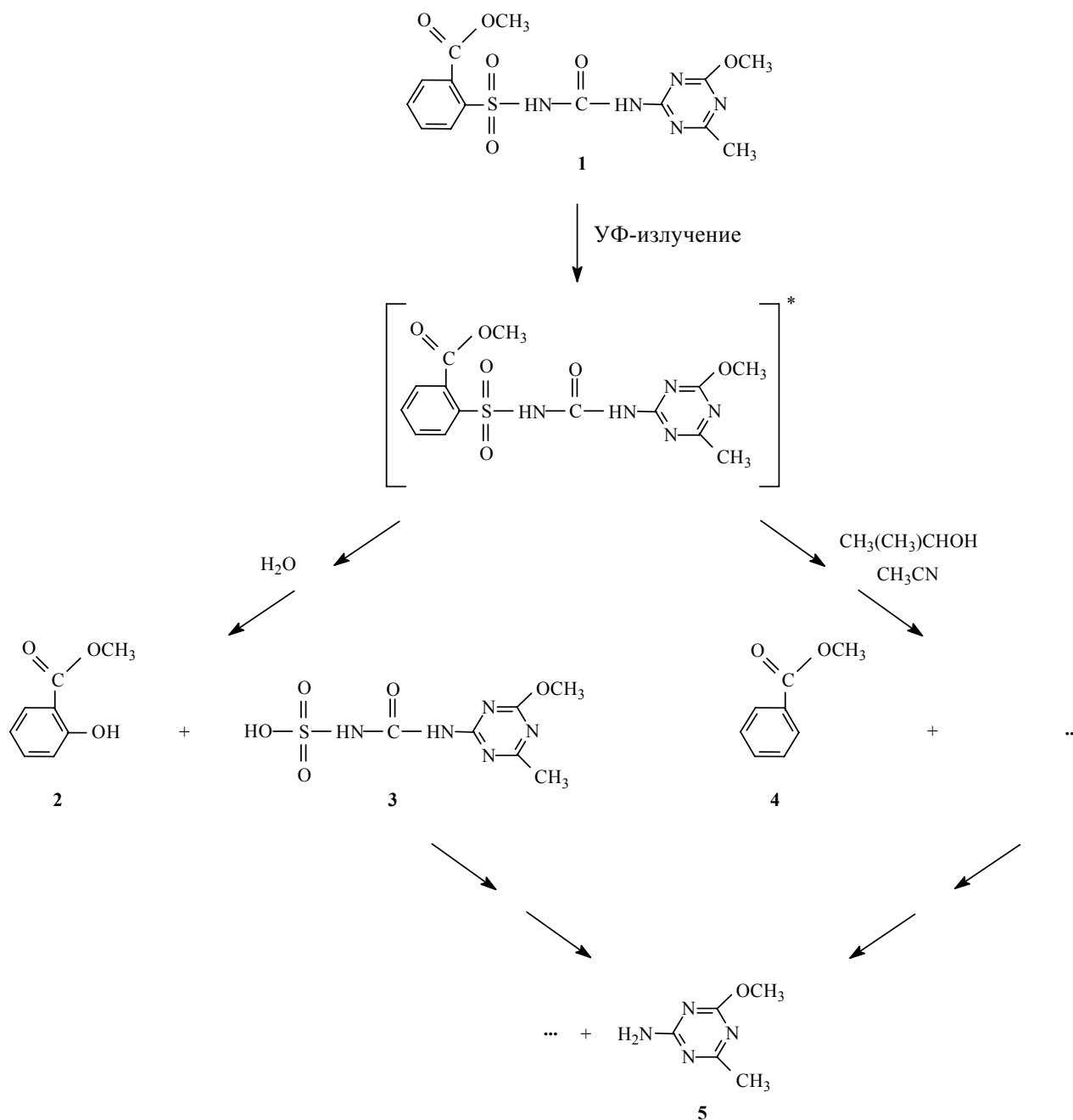


Рис. 5. Схема фотолиза метсульфурон-метила:

1 – метсульфурон-метил; 2 – 2-гидроксиметилбензоат; 3 – [[4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)амино]карбонил]-сульфамиловая кислота; 4 – метилбензоат; 5 – 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин

В связи с тем что в структуре трибенурон-метила у одного из атомов азота мочевинового фрагмента находится CH_3 -группа, нарушено сопряжение бензольного и триазинового колец, что делает затруднительным фотохимическое возбуждение и деструкцию этого соединения под действием электромагнитного излучения видимой и ближней ультрафиолетовой областей спектра.

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. Причем некоторые метаболиты оказываются более токсичными, чем исходные соединения. С целью определения таких метаболитов необходимо знать механизмы биodeградации конкретных пестицидов.

Изучение механизмов биodeградации гербицидов основано на идентификации их метаболитов с помощью современных физико-химических методов структурно-функционального анализа.

В частности, на рис. 6 представлена хроматограмма метсульфурон-метила и промежуточных продуктов его микробной деградации.

Анализ показал, что хроматографический пик со временем удерживания 6,98 мин соответствует метсульфурон-метилу в виде $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 382,66; пик со временем удерживания 2,87 мин – метил-2-[[[(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)карбамоил]сульфамоил]-4-гидрокси-бензоату в виде $[\text{M}+\text{Na}]^+$ с m/z 420,36; пик со временем удерживания 3,80 мин – метил-2-

(аминосульфонил)-бензоату в виде $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 216,24; пик со временем удерживания 5,62 мин – 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксиду (сахарину) в виде $[\text{M}+\text{Na}]^+$ с m/z 206,43; пик со временем удерживания 10,79 мин – продукт с раскрытым триазиновым циклом в виде $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 398,24.

На основании полученных данных и анализа литературы [7] предложен механизм деградации метсульфурон-метила почвенными микроорганизмами (рис. 7).

В аэробных условиях метсульфурон-метил (метил-2-[[[(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)амино]карбонил]амино]сульфонил]-бензоат) (1) претерпевает изменения в структуре по следующим направлениям:

– гидроксильное бензольного кольца приводит к образованию метил-2-[[[(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)карбамоил]сульфамоил]-4-гидроксибензоата (6);

– расщепление сульфонилмочевинового фрагмента приводит к образованию метил-2-(аминосульфонил)-бензоата (2) и 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазина (5), а соединение (2) после деметилирования в 2-(аминосульфонил)-бензойную кислоту (3) превращается в 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксид (сахарин) (4). В анаэробных условиях происходит деметилирование метоксигруппы триазинового кольца с образованием метил-2-[[[(4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)карбамоил]сульфамоил]-бензоата (9), который затем превращается в 4-гидрокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин (10) и продукты с раскрытым триазиновым циклом (11, 12).

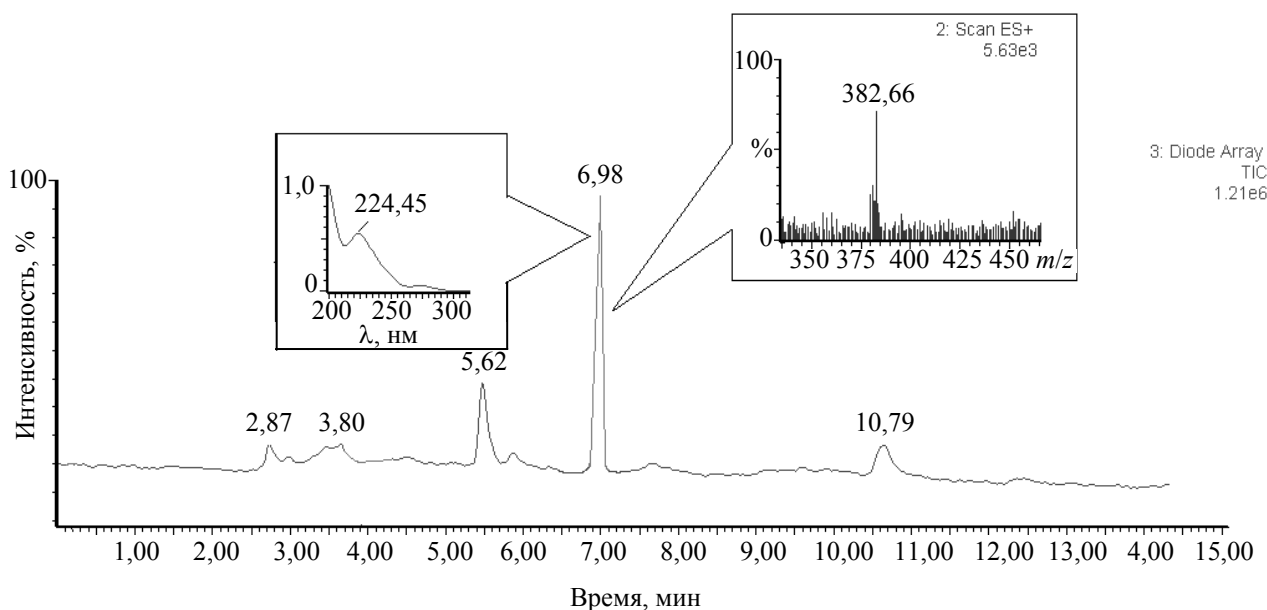


Рис. 6. Хроматограмма метсульфурон-метила и промежуточных продуктов его микробной деградации. На врезках – электронный и масс-спектры метсульфурон-метила

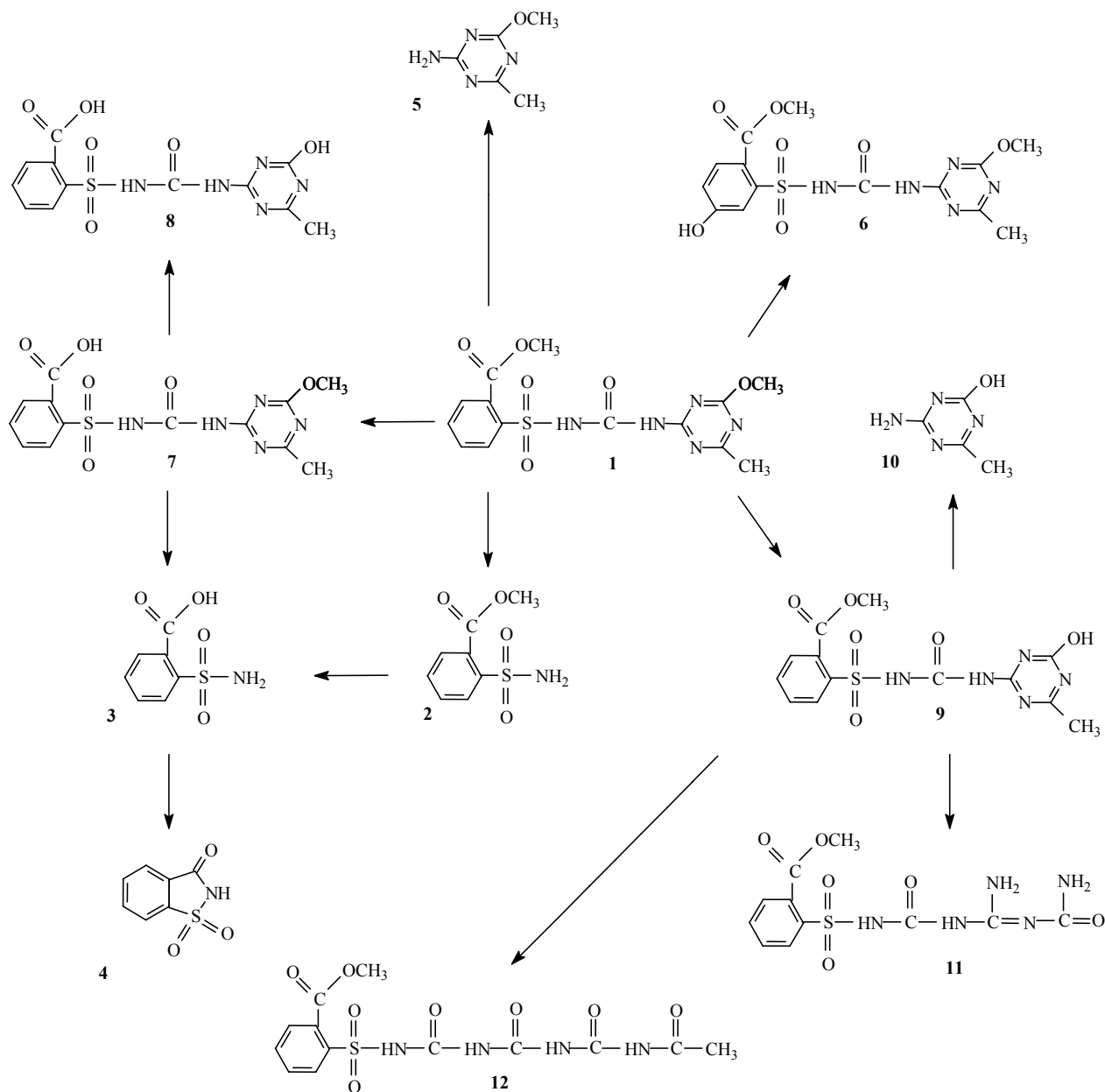


Рис. 7. Механизм деградации метсульфурон-метила почвенными микроорганизмами:

- 1 – метсульфурон-метил; 2 – метил-2-(аминсульфонил)-бензоат; 3 – 2-(аминсульфонил)-бензойная кислота; 4 – 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксид (сахарин); 5 – 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин; 6 – метил-2-[[[4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-4-гидроксибензоат; 7 – 2-[[[4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-бензойная кислота; 8 – 2-[[[4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-бензойная кислота; 9 – метил-2-[[[4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-бензоат; 10 – 4-гидрокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин; 11, 12 – продукты с раскрытым триазиновым циклом

Деметилирование метилового эфира у бензольного кольца приводит к образованию 2-[[[4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-бензойной кислоты (7), которая далее превращается в 2-[[[4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил]карбамоил]сульфамоил]-бензойную кислоту (8) и соединение (3).

Таким образом, хромато-масс-спектрометрический анализ позволил идентифицировать

четыре основных метаболита деградации метсульфурон-метила.

На рис. 8 представлены хроматограммы трибенурон-метила и продуктов его микробной деградации, полученные в одном эксперименте с помощью двух разных детекторов.

Анализ показал, что хроматографический пик со временем удерживания 12,21 мин соответствует трибенурон-метилу в виде $[M+H]^+$ с m/z

396,83; пик со временем удерживания 3,89 мин – метил-2-(аминсульфонил)-бензоату в виде $[M+H]^+$ с m/z 216,12; пик со временем удерживания 5,81 мин – 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксиду (сахарину) в виде $[M+Na]^+$ с m/z 206,27; пик со временем удерживания 9,51 мин – 4-метокси-6-метил-2-аминометил-1,3,5-триази-ну в виде $[M+H]^+$ с m/z 155,63; пик со временем удерживания 9,95 мин – 2-гидрокси-4-метил-6-диметиламино-1,3,5-три-азину в виде $[M+H]^+$ с m/z 155,21.

На основании полученных данных и анализа литературы [8] предложен механизм деградации трибенурон-метила почвенными микроорганизмами (рис. 9).

В аэробных условиях трибенурон-метил (метил-2-[[[(6-метил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]амино]сульфонил]-бензоат) (1) претерпевает изменения в структуре по следующим направлениям:

– расщепление сульфонилмочевинного фрагмента с выделением CO_2 приводит к образованию метил-2-(аминсульфонил)-бензоата (2) и 4-метокси-6-метил-2-аминометил-1,3,5-триази-на (7);

– соединение (2) после деметилирования в 2-(аминсульфонил)-бензойную кислоту (3) превращается в 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксид (сахарин) (4);

– соединение (7) подвергается метилированию по аминному атому азота и O-деметилированию с образованием 2-гидрокси-4-метил-6-диметиламино-1,3,5-триази-на (8);

– соединение (7) подвергается N-деметилированию с образованием 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триази-на (9);

– соединение (1) подвергается гидроксилированию по CH_3 -группе триазинового кольца с образованием метил-2-[[[(6-оксиметил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]-амино]сульфонил]-бензоата (5);

– соединение (5) подвергается N-деметилированию с последующим расщеплением сульфониламинного фрагмента с образованием N-[4-метокси-6-(гидроксиметил)-1,3,5-триазин-2-ил]-мочевины (6).

В анаэробных условиях трибенурон-метил подвергается микробиологической трансформации с образованием метил-2-[[[(4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]амино]сульфонил]-бензоата (10).

Таким образом, в результате хромато-масс-спектрометрического анализа идентифицированы четыре основных метаболита деградации трибенурон-метила, два из которых – метил-2-(аминсульфонил)-бензоат и 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксид (сахарин) – являются общими для обоих представителей ряда сульфонилмочевины.

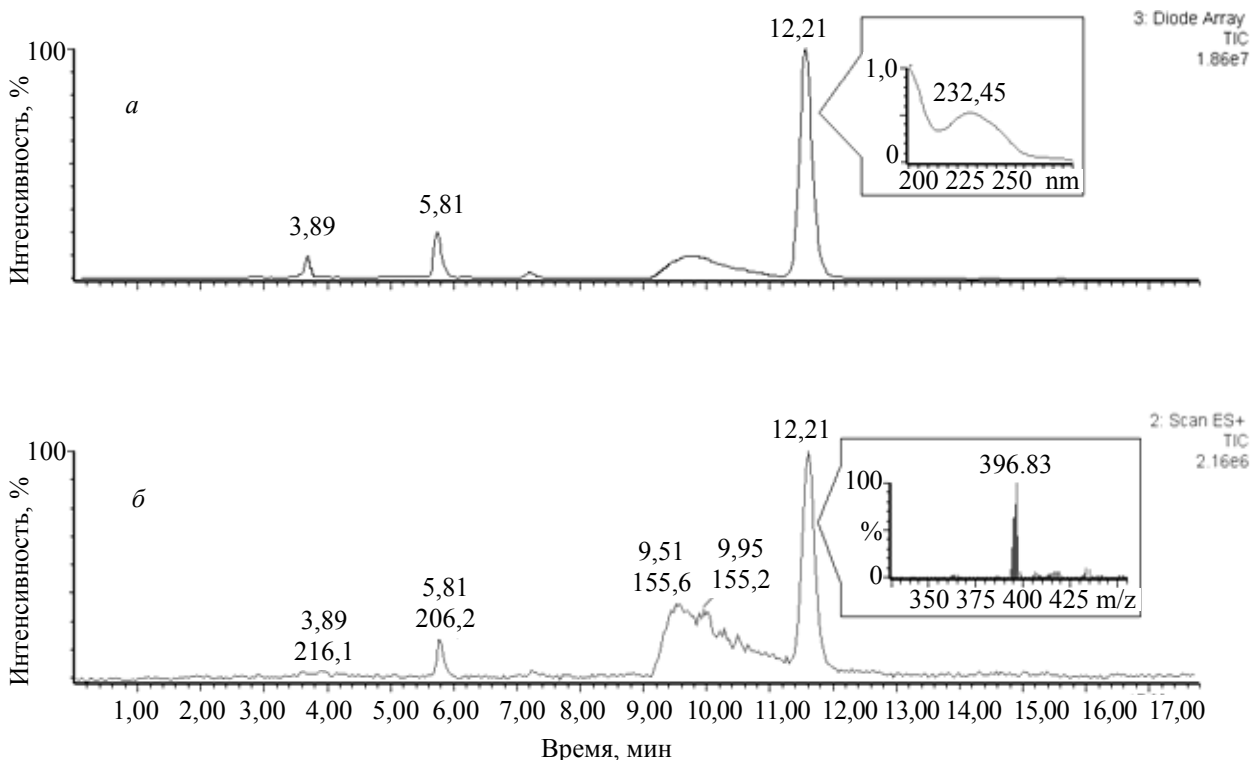


Рис. 8. Хроматограммы трибенурон-метила и продуктов его микробной деградации, полученные с помощью диодно-матричного детектора (а) и масс-детектора (б).
На врезках – электронный и масс-спектры трибенурон-метила

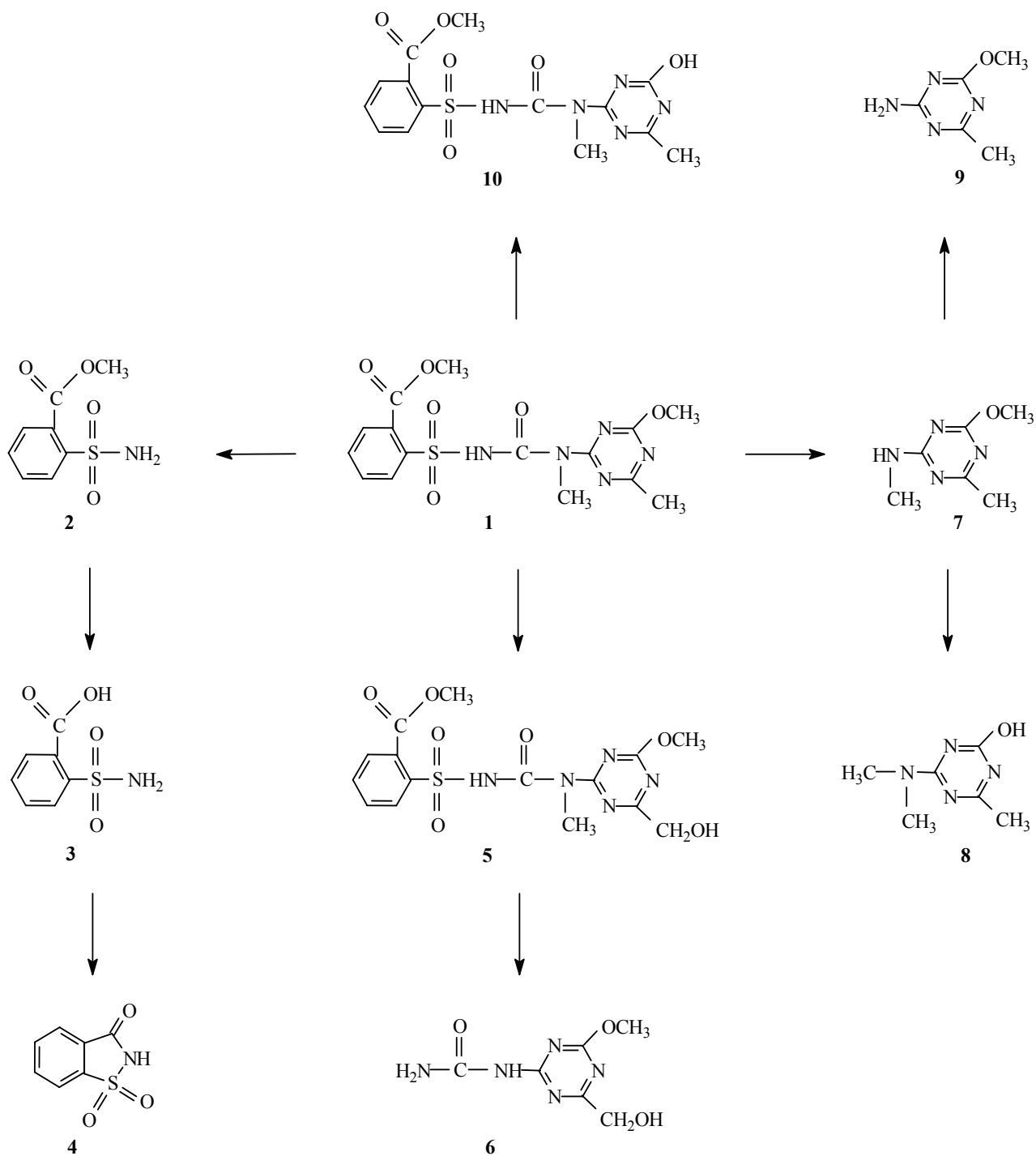


Рис. 9. Механизм деградации трибенурон-метила почвенными микроорганизмами:

1 – трибенурон-метил; **2** – метил-2-(аминсульфонил)-бензоат;

3 – 2-(аминсульфонил)-бензойная кислота; **4** – 1,2-бензизотиазол-3(2H)он-1,1-диоксид (сахарин);

5 – метил-2-[[[(6-оксиметил-4-метокси-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]амино]сульфонил]-бензоат;

6 – N-[4-метокси-6-(гидроксиметил)-1,3,5-триазин-2-ил]-мочевина; **7** – 4-метокси-6-метил-2-аминометил-1,3,5-триазин;

8 – 2-гидрокси-4-метил-6-диметиламино-1,3,5-триазин; **9** – 4-метокси-6-метил-2-амино-1,3,5-триазин;

10 – метил-2-[[[(4-гидрокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-ил)метиламино]карбонил]амино]сульфонил]-бензоат

Одной из ключевых стадий в исследовании механизмов биodeградации гербицидов в почве является пробоподготовка, которая существенным образом зависит от способа и полноты

экстракции остаточных количеств этих соединений и их метаболитов. Проблема состоит в том, что вышеназванные соединения адсорбируются компонентами различных типов почв

по-разному. В связи с этим полнота извлечения остаточных количеств гербицидов и их метаболитов будет сильно зависеть от способа экстракции, состава экстрагента и типа почв.

Существуют следующие способы извлечения загрязняющих веществ из почвы [9]:

- термодесорбция;
- жидкостная экстракция;
- экстракция в микроволновом поле;
- экстракция субкритической водой;
- сверхкритическая флюидная экстракция;
- парофазный анализ.

Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, рассмотрение которых выходит за рамки данной статьи.

В настоящей работе использован метод жидкостной экстракции метсульфурон-метила, трибенурон-метила и метаболитов их деградации из модельной системы, состоящей из стерильной агродерново-подзолистой почвы и культуры соответствующих микроорганизмов-деструкторов. Причем в качестве экстрагента был выбран метилхлорид, обеспечивший наиболее полное извлечение метсульфурон-метила, трибенурон-метила и их метаболитов.

Заключение. Представленные в статье результаты исследований, выполненных в рамках задания «Анализ путей биотрансформации пестицидов группы сульфонилмочевины для разработки технологии ремедиации природных сред» ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», свидетельствуют о том, что метод хромато-масс-спектрометрии является исключительно информативным для установления механизмов биотрансформации и биodeградации пестицидов. Выработанные в ходе выполнения исследований подходы легли в основу методик мониторинга данных гербицидов и метаболитов их деградации в объектах окружающей среды, а также будут использованы для создания биопрепаратов, предназначенных для ремедиации природных

сред, загрязненных гербицидами ряда сульфонилмочевины.

Литература

1. Куликова, Н. А. Гербициды и экологические аспекты их применения: учеб. пособие / Н. А. Куликова, Г. Ф. Лебедева. – М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 152 с.
2. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь: справ. издание / Л. В. Плешко [и др.]. – Минск: ООО «Редакция журнала «Земляробства і ахова раслін», 2011. – 544 с.
3. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides / Q. Zhou [et al.] // *Pesticide Biochem. and Physiol.* – 2007. – Vol. 89. – P. 89–96.
4. Халиков, И. С. Исследование трансформации сульфонилмочевин в природных средах: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.10 / И.С. Халиков; ВНИХСЗР. – М., 1992. – 28 с.
5. Scientific report on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tribenuron / *EFSA Journal.* – 2005. – Vol. 3. – 52 p.
6. Caselli, M. Light-induced degradation of metsulfuron-methyl in water / M. Caselli // *Chemosphere.* – 2005. – Vol. 59. – P. 1137–1143.
7. Metabolic pathways of agrochemicals: herbicides and plant growth regulators / D. H. Hutson [et al.]; editor-in-chief T. Roberts. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. – 851 p.
8. Stoytcheva, M. Pesticides in the modern world – pesticides use and management / M. Stoytcheva. – Rijeka: InTech, 2011. – 520 p.
9. Другов, Ю. С. Пробоподготовка в экологическом анализе: практ. руководство / Ю. С. Другов, А. А. Родин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 855 с.

Поступила 27.02.2013