

УДК 573.6:579.66:632.954

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

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕГРАДАЦИИ 2,4-ДИХЛОРФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ В МОДЕЛЬНЫХ ПОЧВЕННЫХ СИСТЕМАХ

Почвенные бактерии обладают высоким адаптивным потенциалом и уникальными ферментными системами и могут утилизировать многие ксенобиотики. Эта способность микроорганизмов широко используется при разработке различных приемов биоремедиации почв. Основным подходом, применяемым для интенсификации процесса деградации пестицидов, является интродукция в почву культур микроорганизмов – активных деструкторов токсикантов. Перед интродукцией микроорганизмов в окружающую среду необходимо спрогнозировать их выживаемость, поведение и оценить эффективность биодegradации пестицида. Кроме того, биодegradация ксенобиотиков должна проводиться без накопления токсичных интермедиатов.

В настоящей статье приведены результаты, полученные при изучении деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты бактериями-деструкторами. В ходе эксперимента установлено, что штамм 222 способен осуществлять деградацию 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в почве. Ксенобиотик в почве разлагался в умеренном темпе, через 25 дней его остаточное количество было 35% от начальной концентрации, а через 40 дней содержание ксенобиотика в модельной почвенной системе составило порядка 10%. На промежуточных этапах биодegradации с помощью метода ВЭЖХ-МС контролировали образование интермедиатов. В качестве промежуточных метаболитов в почвенных экстрактах обнаруживаются 2,4-дихлорфенол и 2-хлормалеилацетат. По результатам исследований сделан вывод о возможности использования штамма 222 при разработке биопрепарата для ремедиации почв, загрязненных пестицидами на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты.

Ключевые слова: гербицид, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, бактерии-деструкторы, биодegradация, модельная почвенная система, интермедиат, хлорфенол, ВЭЖХ-МС.

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

STUDY OF THE MECHANISM OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID MICROBIAL DEGRADATION IN MODEL SOIL SYSTEMS

Soil bacteria have a high adaptive potential and unique enzyme systems that can utilize many xenobiotics. This ability of microorganisms is widely used in the development of various methods of soil bioremediation. The main approach used to intensify the process of degradation of pesticides is the introduction into the soil of the microorganism's cultures that are the active toxicant destructors. Before the introduction of the microorganisms into the environment, it is necessary to predict their survival rate, behavior, and assess the effectiveness of a pesticide biodegradation. In addition, the biodegradation of xenobiotics should be carried out without the accumulation of toxic intermediates.

This article presents the results obtained in the study of the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria-destructors. During the experiment, it was established that strain 222 is capable to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrade in the soil. The xenobiotic in the soil was decomposed at a moderate rate, after 25 days its residual amount was 35% of the initial concentration, and after 40 days the content of xenobiotics in the model soil system was about 10%. The formation of intermediates at the intermediate stages of the biodegradation was monitored using the HPLC-MS method. 2,4-Dichlorophenol and 2-chloromaleylacetate are found in soil extracts as the intermediate metabolites. According to the research, it was concluded that the strain 222 can be used in the development of a biological product for the remediation of soils contaminated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-based pesticides.

Key words: herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, bacteria destructors, biodegradation, model soil system, intermediate, chlorophenol, HPLC-MS.

Введение. Хлорированные фенолы относятся к ряду особо опасных органических загрязнителей, обладающих высокой персистентностью, обуславливающей их длительное сохранение в окружающей среде.

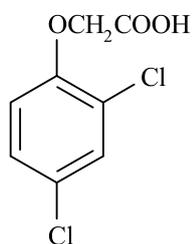
Основными источниками образования хлорированных фенолов являются производства

бумаги, красителей, пестицидов, гербицидов, пластмасс. Хлорфенолы поступают в окружающую среду при термическом разложении технических продуктов, сжигании осадков сточных вод, муниципальных, медицинских и опасных отходов (например, изделий из ПВХ); в процессе осуществления электролизных методов

получения никеля и магния из их хлоридов, литья стали из меди, переплавке лома железа, а также при производстве алюминия. Хлорированные фенолы широко используются химической промышленностью в синтезе фунгицидов, а также в качестве консерванта древесины [1, 2].

Наиболее мощным каналом глобального распространения галогенорганических соединений являются гербициды, применение которых началось еще в 30-х гг. прошлого столетия.

Гербициды на основе хлорфеноксиалканкарбоновых кислот (ФКК) интенсивно используются при уничтожении сорняков. Среди гербицидов этой группы широко применяются препараты натриевой и аммонийной солей, а также 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота [3]:



2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) – хлорорганическое соединение, которое используется как гербицид и регулятор роста растений. Это действующее вещество входит в состав более 1500 гербицидов. 2,4-Д рекомендуется для контроля широколиственных сорняков при выращивании злаковых культур, обработке газонов и пастбищ [4]. 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. Доступность и дешевизна исходных продуктов, простота технологического оформления процесса получения 2,4-Д – одна из причин длительной привязанности сельского хозяйства к гербицидным препаратам на ее основе [5].

Сама по себе 2,4-Д относится к малотоксичным и легко разлагающимся в природных условиях гербицидам, и длительное время считалось, что это практически безвредный и не представляющий опасности для окружающей среды препарат. Однако оказалось, что сказанное верно лишь в отношении высокоочищенных образцов самой феноксиуксусной кислоты. В процессе промышленного получения 2,4-Д в нее попадают микропримеси исключительно токсичных соединений – хлорированных в различных положениях производных дибензо-р-диоксина [6].

Существует довольно много работ по выделению и культивированию микроорганизмов с «потенциалом биodeградации» ксенобиотиков. Авторы этих работ рассматривают методические аспекты и практические результаты выделенных микроорганизмов, принципы культивирования, хранения и использования штаммов-деструкторов [7]. Кроме того, важными направлениями исследований являются изучение физиологии и биохимии микробных культур, установление механизмов деструкции органических веществ в живой клетке. На основании таких сведений можно обоснованно подбирать микроорганизмы, способные к биodeградации определенных соединений, а также определять соединения, которые могут быть разрушены определенными группами микроорганизмов. В смешанных культурах микроорганизмов деструкция ксенобиотиков осуществляется более быстро и полно, поскольку имеет место комбинация катаболических возможностей отдельных представителей сообществ микроорганизмов. В результате этого достигается минерализация, недоступная чистым культурам микроорганизмов. Для получения микроорганизмов – активных деструкторов ксенобиотиков – применяют селективные среды, содержащие данные ксенобиотики. Культуры микроорганизмов выделяют из образцов природных субстратов либо используют коллекционные штаммы, в том числе искусственные смеси таких штаммов. Широкие возможности для отбора активных деструкторов имеет непрерывное культивирование в режиме возрастающих концентраций загрязнений. В таких условиях из исходных сообществ элиминируются микроорганизмы, имеющие невысокую скорость роста и недостаточный потенциал биodeградации данных загрязнений. В селекционированном сообществе преобладает от 2 до 10 видов микроорганизмов, обычно бактерий, осуществляющих эффективное окисление загрязнений. Этот метод является основным в селекции микробных сообществ, предназначенных для биологической очистки сточных вод.

Основная часть. Объектами исследования в данной экспериментальной работе являлись почвенные бактерии-деструкторы 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Цель работы – изучение процесса деградации 2,4-Д ферментными системами бактерий-деструкторов в модельной почвенной системе, а также механизмов деградации 2,4-Д наиболее активным штаммом-деструктором. Ранее нами были выделены 12 штаммов бактерий, способных осуществлять деградацию указанного ксенобиотика. Выделенные микроорганизмы охарактеризовали до рода по морфологическим и физиолого-био-

химическим признакам: форма клеток, подвижность, окраска по методу Грама, оксидазная и каталазная активности, способность формировать гранулы поли- β -оксимасляной кислоты и наличие эндоспор [8].

Для приготовления почвы использовали серую лесную почву, взятую вблизи Минска. Перед использованием почву просеивали через сито, затем навеску почвы подвергали стерилизации. В подготовленную почву вносили бактери-деструкторы и гербицид и инкубировали при температуре 25–30°C на протяжении 7 недель. Чашки ежедневно взвешивали для контроля испарения влаги и при необходимости восполняли ее потерю стерильной водой. В модельной почвенной системе контролировали численность бактерий, а также содержание ксенобиотика. Для определения общей численности микроорганизмов в почве отбирали пробы массой 1 г из разных участков для усреднения. Пробы ресуспендировали в 5 мл физраствора, тщательно перемешивали и после соответствующих разведений высевали на твердую питательную среду. Посевы инкубировали при 30°C в течение суток. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) рассчитывали на 1 г сухой почвы. Для определения содержания гербицидов в почве отбирали пробы массой 1 г из разных участков для усреднения. Навеску сухой почвы экстрагировали метиленхлоридом, полученный экстракт упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и анализировали методом ВЭЖХ-МС.

В качестве подвижной фазы использовали 50%-ный раствор ацетонитрила в 0,1%-ной муравьиной кислоте при скорости элюирования 0,7 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Тип ионизации – электроспрей ионизации (ESI). Параметры ионизации: напряжение на капил-

ляре – 3 кВ, напряжение на экстракторе – 1 В, напряжение на конусе – 40 В, температура источника – 130°C, температура испарения – 350°C, расход инертного газа (азота) на испарителе – 400 л/ч, расход газа на конусе – 150 л/ч.

Анализ ВЭЖХ-МС проводили на высокоэффективном хромато-масс-спектрометре Waters с диодно-матричным детектором PDA 996 и масс-детектором Micromass ZQ 2000 (Waters, США), с использованием колонки HYPERSIL C₁₈ длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм и с размером частиц 5 мкм. Запись масс-спектров осуществляли в режиме регистрации положительных (ESI⁺) и отрицательных ионов (ESI⁻).

Количественное определение гербицидов в культуральной жидкости проводили методом абсолютной калибровки. Для построения калибровочного графика использовали стандартные растворы гербицидов с концентрацией 0,5; 1; 1,5; 2 мг/мл. По результатам хроматографического анализа были построены зависимости содержания пестицида от времени культивирования (рис. 1).

Изучение процесса деградации 2,4-Д (внесенное количество 1 мг/г сухой почвы) в модельном эксперименте со стерильной почвой показало, что концентрация ксенобиотика в течение 40 дней практически не изменялась. Небольшое уменьшение концентрации ксенобиотика происходило за счет его адсорбции компонентами почвы. Процесс адсорбции во многом зависит от влажности почвы. Вода, поглощенная почвой, препятствует межмолекулярному взаимодействию токсикантов с почвенными коллоидами. Поэтому влажная почва связывает большие количества гербицида, чем сухая, и степень доступности поглощенных почвой пестицидов для микроорганизмов и растений при адсорбции уменьшается.

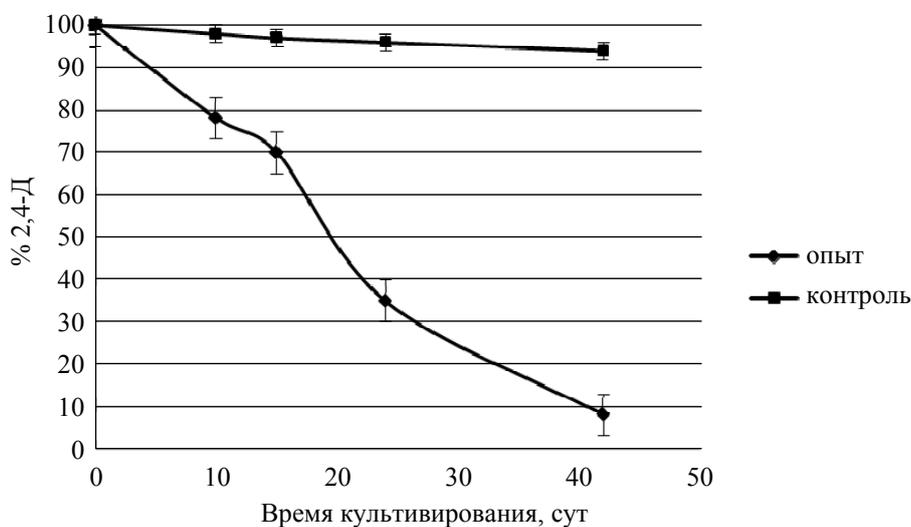


Рис. 1. Динамика биодegradации 2,4-Д в модельной почвенной системе

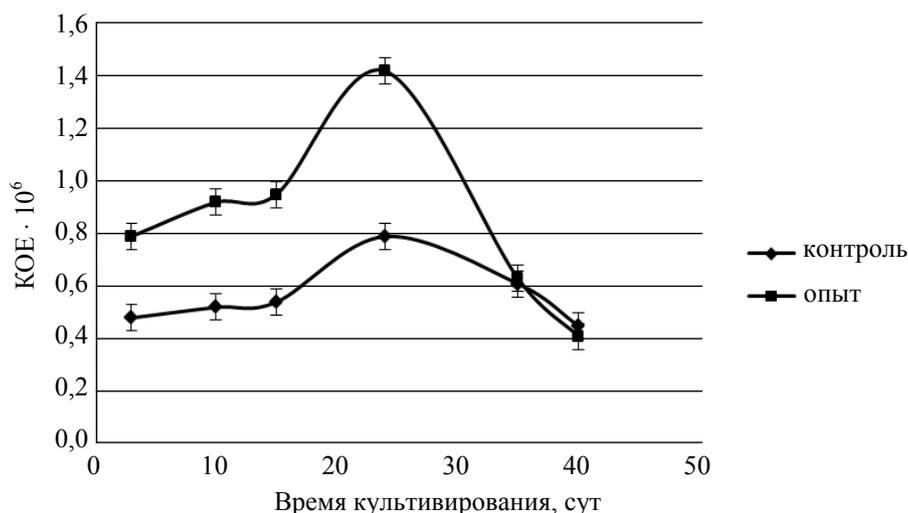


Рис. 2. Диаграмма численности интродуцированных бактерий-деструкторов в модельной почвенной системе

Доступной для них является лишь та часть токсиканта, которая находится в почвенном растворе. В связи с этим для уменьшения влияния процессов сорбции 2,4-Д на ее биодоступность влажность почвы в эксперименте с интродуцированными бактериями контролировалась и поддерживалась на уровне 40%. Деградация 2,4-Д в почве, содержащей интродуцированные клетки бактерий-деструкторов, заметна уже на 10-е сутки (рис. 1). 2,4-Д в почве разлагалась в умеренном темпе, через 25 дней ее остаточное количество составляло 35%, а через 40 суток – порядка 10%.

Помимо анализа изменения концентрации 2,4-Д в модельной почвенной системе контролировали общее количество интродуцированных бактерий (рис. 2).

Число жизнеспособных бактерий в 1 г сухой почвы в начале эксперимента составило $1 \cdot 10^6$ КОЕ/г. В опыте с модельно загрязненной 2,4-Д почвой число жизнеспособных бактерий в 1 г сухой почвы было максимальным на 25-е сутки эксперимента, затем наблюдали снижение этого показателя вследствие истощения в среде основного источника питания.

Сравнительный анализ количества клеток в модельных почвенных системах с 2,4-Д и в модельной почвенной системе без ксенобиотика показал, что максимальная концентрация бактерий-деструкторов в почве с 2,4-Д выше максимальной концентрации указанных микроорганизмов в почве в отсутствие гербицида. Это свидетельствует о том, что 2,4-Д не оказывает ингибирующего действия на рост клеток штамма деструктора, а наоборот, является ростовым субстратом.

При масс-спектрометрическом анализе почвенного экстракта, помимо ионов 2,4-Д, зарегистрированных в отрицательной области, обнаруживались ионы, принадлежавшие двум разным соединениям. По результатам электронных и масс-спектров этих соединений установили наличие промежуточных продуктов биodeградации: 2,4-дихлорфенола и 2-хлормалеилацетата. Из литературных источников известно, что 2,4-дихлорфенол относится к 4 классу опасности (малоопасное вещество) и представляет собой наименьшую угрозу из-за своих невысоких показателей опасности и токсичности. Таким образом, по результатам эксперимента можно предположить, что деградация 2,4-Д в почве выделенными бактериями-деструкторами протекает через образование нетоксичных интермедиатов.

Закключение. Представленные результаты свидетельствуют, что бактерии штамма 222 могут быть использованы в качестве бактерий-деструкторов 2,4-Д при разработке эффективной технологии биоремедиации почв.

Для изучения структуры интермедиатов гербицида были подобраны условия хроматографирования и параметры ионизации образующихся соединений. Также был осуществлен подбор подвижной фазы для хроматографического разделения 2,4-Д и промежуточных метаболитов. Описанный хромато-масс-спектрометрический метод анализа 2,4-Д и интермедиатов ее микробной деградации в почве и водных средах может быть использован для анализа динамики ксенобиотика и промежуточных продуктов его биodeградации в почве и водных средах, а также для оценки загрязнения ими сельскохозяйственных угодий и прилегающих водоемов.

Литература

1. Annachhatre A. P., Gheewala S. H. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds // *Biotechnol Adv.* 1996. Vol. 14, no. 1. P. 138–146.
2. Beltrame P. R., Camiti P., Pitea D. Kinetics of phenol degradation by activated sludge in a continuous-stirred reactor // *J. Water Pollut Control Fed.* 1990. Vol. 52. P. 126–133.
3. 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) [Электронный ресурс] // Пестициды.ру. 2018. URL: http://www.pesticide.ru/active_substance/dichlorophenoxyacetic_acid (дата обращения: 12.05.2018).
4. Куликова Н. Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. 152 с.
5. 2,4-D. Chemical Watch Factsheet [Электронный ресурс] / A Beyond Pesticides Factsheet. URL: <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pesticides/factsheets/2-4-D.pdf> (дата обращения: 17.02.2018).
6. Отравление соединениями 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [Электронный ресурс] // ЗооВет. 2018. URL: <http://zoovet.info/bolezni-zhivotnykh/82-nezaraznye-bolezni-zhivotnykh/153-otravleniya-zhivotnykh/812-otравlenie-soedineniyami-24-dikhlorfenoksiuksusnoj-kislotoj> (дата обращения: 20.05.2018).
7. Arora P. K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives // *Microbial Cell Factories.* 2014. P. 315–326.
8. Применение микроорганизмов-деструкторов для биоремедиации почв, загрязненных 2,4-Д и пестицидами группы сульфонилмочевины / О. С. Игнатовец [и др.] // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI века = Sakharov readings 2017: environmental problems of the XXI century: материалы 17-й Междунар. науч. конф., Минск, 18–19 мая 2017 г.: в 2 ч. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол.: С. Е. Головатый [и др.]; под ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. Ч. 2. С. 27–28.

References

1. Annachhatre A. P., Gheewala S. H. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol Adv.*, 1996, vol. 14, no. 1, pp. 138–146.
2. Beltrame P. R., Camiti P., Pitea D. Kinetics of phenol degradation by activated sludge in a continuous-stirred reactor *J. Water Pollut Control Fed.*, 1990, vol. 52, pp. 126–133.
3. 2,4-D (2,4-dikhlorfenoksiuksusnaya kislota) [2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)]. Available at: http://www.pesticide.ru/active_substance/dichlorophenoxyacetic_acid (accessed 12.05.2018).
4. Kulikova N. F. *Gerbitsidy i ekologicheskiye aspekty ikh primeneniya* [Herbicides and environmental aspects of their use]. Moscow, Knizhnyy dom “LIBROKOM” Publ., 2010. 152 p.
5. 2,4-D. Chemical Watch Factsheet. Available at: <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pesticides/factsheets/2-4-D.pdf> (accessed 17.02.2018).
6. *Otravleniye soedineniyami 2,4-dikhlorfenoksiuksusnoj kislotoj* [Poisoning with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid compounds]. Available at: <http://zoovet.info/bolezni-zhivotnykh/82-nezaraznye-bolezni-zhivotnykh/153-otравleniya-zhivotnykh/812-otравlenie-soedineniyami-24-dikhlorfenoksiuksusnoj-kislotoj> (accessed 20.05.2018).
7. Arora P. K., Bae H. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, 2014, pp. 315–326.
8. Ignatovets O., Feskova A., Leontiev V., Akhramovich T. [Application of microorganisms-destroyers for bioremediation of soils polluted by 2,4-D and pesticides of the sulfonylurea group]. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii (Sakharovskiye chteniya 2017 goda: ekologicheskiye problemy XXI veka)* [Materials of the International Scientific Conference (Sacharov readings 2017: environmental problems of the XXI century)]. Minsk, 2017, part 2, pp. 27–28 (In Russian).

Информация об авторах

Игнатовец Ольга Степановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Поступила 18.10.2018