

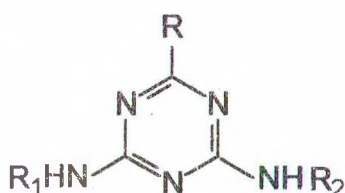
УДК 579.861:576.8

И. М. Бурак, студентка;
 В. Н. Леонтьев, доцент;
 Т. И. Ахрамович, ассистент;
 Н. В. Гриц, доцент

БИОДЕГРАДАЦИЯ СИММ-ТРИАЗИНОВЫХ ПЕСТИЦИДОВ

The results of investigation on biodegradation of pesticides – simazine and prometryne by *Pseudomonas aurantica* and *Pseudomonas aeruginosa* are presented.

Наиболее распространенными симм-триазиновыми пестицидами являются прометрин и симазин, которые представляют собой соединения следующей структуры:



где для симазина: R -Cl, R₁ -Et, R₂ -Et
 для прометрина: R -CH₃, R₁ -i-Pr, R₂ -i-P

Концентрация гербицида в почве - трудно поддающаяся прогнозированию величина, зависящая от многих факторов: дозы, способа и глубины заделки, типа почвы, степени адсорбции, климатических условий (температура, влажность, орошение), pH почвы, ассоциации развивающихся микроорганизмов и т.д.

Деградация гербицидов протекает по нескольким путям одновременно: разложение под действием УФ-света, химический гидролиз, микробиологическое разложение [1].

К деградации триазиновых гербицидов способны очень многие микроорганизмы, как бактерии, так и мицелиальные грибы, особенно часто упоминаются *Aspergillus* и *Penicillium*.

Основной путь разложения зависит от pH почвы (табл. 1) [2].

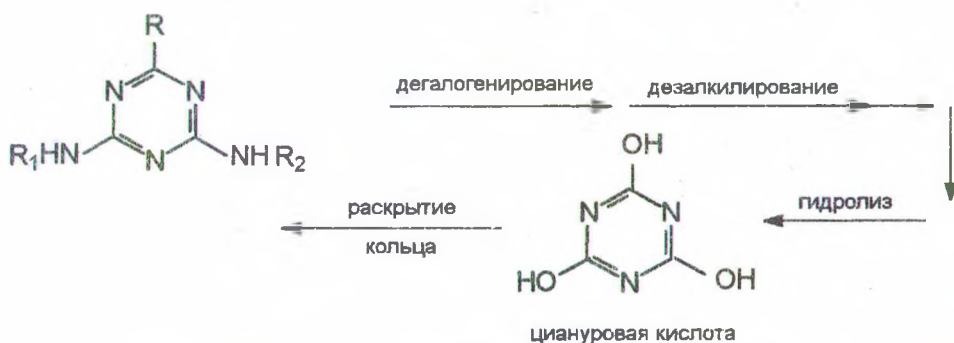
Таблица 1

Влияние pH на пути деградации гербицидов в почве

pH	Менее 5,5	5,5	6,5-7,5	Более 8,5
Основной путь разложения	Гидролиз, особенно при t около 30°С	Грибы	Бактерии	Гидролиз

Прометрин намного лучше адсорбируется почвой, чем симазин. Основная роль в поглощении почвой триазинов принадлежит органическим веществам (гуминовые кислоты и т.д.), поэтому торфяные почвы особенно прочно удерживают гербициды от вымывания.

Что касается механизма микробиологического разложения гербицидов, то имеется прямая ссылка на работу по установлению путей дезалкилирования симазина грибом *Aspergillus fumigatus* [1,2]:



Первой стадией разложения хлортриазиновых гербицидов является гидролиз по атому хлора.

Прометрин в результате микробиологического окисления превращается в сульфоксид и сульфон и далее в гидроксипрометрин [2].

Aspergillus niger, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus* используют серу прометрина в качестве источника серы.

Некоторые микроорганизмы могут расти, когда триазины являются единственным источником углерода и/или азота.

Целью настоящей работы явилось изучение путей биodeградации симазина и прометрина бактериями рода *Pseudomonas*.

В работе использовано 65 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*.

Для выбора штаммов бактерий, способных к биodeградации гербицидов, сначала изучили возможность их роста на питательном агаре в присутствии 0,1% гербицида. Результаты, полученные после 48 ч инкубирования бактерий при 30°C, представлены в табл.2. Как следует из табл.2, большинство штаммов (30) бактерий растут как на среде с прометрином, так и на среде с симазином. Отсутствуют штаммы бактерий, которые хорошо бы росли на среде с одним гербицидом и не росли на среде с другим. Лишь у 5-ти штаммов наблюдался слабый рост в присутствии прометрина при полном его отсутствии на среде с симазином. Отсутствие роста на средах с обоими гербицидами наблюдали у 26-ти штаммов бактерий.

Таблица 2

**Ингибирующее действие гербицидов на рост бактерий рода
*Pseudomonas***

Прометрин	Симазин	Число штаммов
+	+	30
±	±	4
-	-	26
±	-	5

Примечание: + - наличие роста; - - отсутствие роста;
± - слабый рост.

Следующим этапом работы явилось выяснение возможности штаммов бактерий, растущих на средах с гербицидами, использовать последние в качестве единственного источника углерода или азота. Для этого бактерии, растущие на средах с гербицидами, высевали на синтетическую среду с гербицидом и инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Результаты исследований представлены в табл.3 и 4.

Таблица 3

**Использование прометрина в качестве единственного источника
углерода или азота бактериями рода *Pseudomonas***

Источник N	Источник С	Число штаммов
±	±	22
+	±	1
±	+	1
±	-	4
-	-	4

Примечание: то же, что и в табл.2.

Таблица 4

**Использование симазина в качестве единственного источника углерода
или азота бактериями рода *Pseudomonas***

Источник N	Источник С	Число штаммов
±	±	24
+	±	1
±	+	1
-	±	2
-	-	4

Примечание: то же, что и в табл.2.

Таким образом, большинство штаммов бактерий сравнительно плохо используют оба гербицида как в качестве единственного источника азота, так и углерода. Для более полной деградации гербицидов могут подходить именно те штаммы, которые хорошо растут на средах с гербицидами, используя их при этом в качестве единственного источника углерода. В этом случае можно ожидать, что эти бактерии будут осуществлять деструкцию триазинового гетероцикла. В связи с этим для дальнейших исследований были выбраны бактерии *Pseudomonas aeruginosa* B-7 и *Pseudomonas aurantica* B-162, которые активно росли на средах с прометрином и симазиним соответственно, используя их при этом в качестве единственного источника углерода.

Следующим этапом работы явилось изучение биodeградации ксенобиотиков выбранными штаммами бактерий с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), электронной спектроскопии и адсорбционной тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Предварительно выращенные на синтетической среде MM9 с глюкозой (0,2%) и тщательно отмытые от ростовой среды клетки бактерий ресуспендировали в среде MM9 с гербицидом (0,1%) в качестве единственного источника углерода и инкубировали при 30°C в условиях аэрации (180 мин⁻¹) в течение 50 ч (для симазина) и 120 ч (для прометрина). Пробы культуральной жидкости объемом 5 мл отбирали через 1, 5, 22, 50, 75 и 120 ч с начала ферментации. Клетки отделяли центрифугированием, гербициды и продукты их биodeградации из супернатанта экстрагировали хлороформом, хлороформенный слой отделяли, сушили безводным Na₂SO₄, хлороформ упаривали, а сухой остаток растворяли в 0,7 мл метанола и анализировали на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 10A на колонке с обращенной фазой C-18.

Динамика изменения содержания прометрина и симазина в культуральной жидкости бактерий *P.aeruginosa* B-7 и *P.aurantica* B-162 представлена на рис. 1 и 2 соответственно.

Как видно из рис. 1 и 2, интенсивность пика соответствующего гербицида в обоих случаях увеличивалась до 22-го ч ферментации. Затем на 50-м ч содержание симазина в среде уменьшилось почти до нуля, тогда как содержание прометрина уменьшилось незначительно и колебалось на уровне этого значения до 120-го ч ферментации.

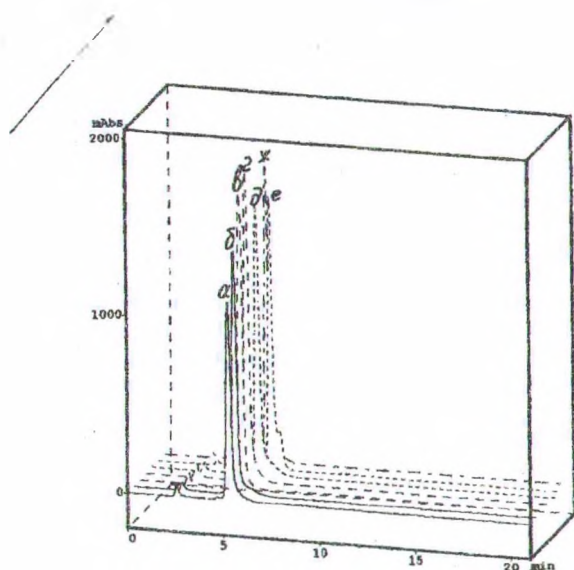


Рис.1. Динамика изменения содержания прометрина в культуральной жидкости бактерий *P.aeruginosa* B-7: а – время ферментации 0 ч; б – 1 ч; в – 5 ч; г – 22 ч; д – 50 ч; е – 75 ч; ж – 120 ч

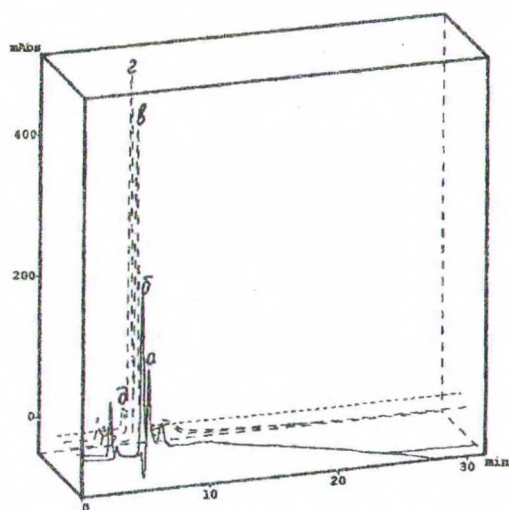


Рис.2. Динамика изменения содержания симазина в культуральной жидкости бактерий *P.aurantica* B-162: а – время ферментации 0 ч; б – 1 ч; в – 5 ч; г – 22 ч; д – 50 ч

Анализ электронных спектров поглощения симазина, прометрина и продуктов их биodeградации показывает, что независимо от заместителей в триазиновом гетероцикле максимум поглощения смещается в интервале 1-3 нм в синюю либо красную области спектра. Это свидетельствует о том, что данные заместители вызывают незначительные смещения электронной плотности в гетероциклическом триазиновом кольце. В связи с этим увеличение интенсивности хроматографических пиков может быть обусловлено тем, что продукты биodeградации гербицидов являются более полярными соединениями и их концентрация в водной среде повышается. Так как время удержания симазина и прометрина на колонке с фазой С-18 практически одинаково, то, вероятно, эта фаза не обладает достаточной селективностью и к продуктам биodeградации гербицидов. Вместе с тем полученные результаты свидетельствуют о том, что бактерии *Pseudomonas aurantica* B-162 способны осуществлять деградацию симазина с деструкцией триазинового кольца (рис.2). Тогда как бактерии *Pseudomonas aeruginosa* B-7 вызывают лишь биотрансформацию прометрина и конечным продуктом, вероятно, является триокситриазин (циануровая кислота) (рис.1).

Спектральный анализ хлороформенных экстрактов культуральной жидкости, полученных после 50-ти ч ферментации (для симазина) и 120-ти ч ферментации (для прометрина), разделенных методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 (элюент гексан/изопропанол : 1/1), показал, что, по крайней мере, три вещества с R_f , равным 0,85, 0,68 и 0,15, имеют максимумы поглощения в области 223 нм, т.е. области, характерной для триазинового хромофора прометрина.

Таким образом, проведенные исследования показали, что бактерии рода *Pseudomonas* могут эффективно разрушать гербициды триазинового ряда. Применение иммобилизованных клеток этих бактерий позволит повысить эффективность биodeградации, поскольку иммобилизация ускоряет основные биосинтетические превращения у микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Самгин П. А. Инактивация и передвижение триазиновых гербицидов в почве. - М.:ВНИИТЭИСХ, 1975. - 60 с.
2. Разложение гербицидов. - М.:Мир, 1971. - 358 с.