

УДК 631.81.036

Магистрант Я.Л. Страх

Науч. рук. ст. преп. А.М. Шимкевич (кафедра биотехнологии, БГТУ)

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПЕСТИЦИДОВ. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ

В настоящее время для снижения степени засорения посевов сельскохозяйственных культур сорной растительностью, приводящей к уменьшению урожайности и, как следствие, к значительному экономическому ущербу, используются довольно большие объёмы различных гербицидов. Они, в свою очередь, являются серьезными источниками загрязнения окружающей среды. Это представляет также потенциальную опасность и для здоровья населения.

Гербициды – средства химической защиты, препятствующие развитию сорных растений. Наибольшую практическую значимость среди них имеют галогенсодержащие органические соединения, а также средства защиты растений на основе сульфонилмочевины. Остаточные количества данных веществ, являющихся ксенобиотиками, продолжительное время сохраняются в окружающей среде и оказывают непосредственное негативное воздействие на биологические объекты в короткие промежутки времени, а также в долгосрочной перспективе [1]. В связи с этим важное значение имеет разработка эффективных подходов утилизации остатков ядохимикатов. Весьма перспективным методом является ремедиация почв по типу направленной биodeградации, то есть, использование бактерий-деструкторов с целью разрушения химической структуры загрязняющих веществ.

Целью данной работы является изучение динамики деградации таких гербицидов, как 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) и метсульфурон-метил культурами выделенных из почвы бактерий.

Материалы и методы. В качестве объекта для работы были использованы штаммы почвенных микроорганизмов-деструкторов пестицидов из коллекции кафедры биотехнологии БГТУ. Микроорганизмы выращивали на плотной синтетической питательной среде ММ9 [2], содержащей 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) в концентрации 200 мг/л, ММ9 с метсульфурон-метилом в концентрации 200 мг/л и на среде ММ9 с одновременным присутствием 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) и метсульфурон-метилом в вышеуказанных концентрациях. Посевы инкубировали в течение 3-х суток при температуре 20°C. Отбирали штаммы микроорганизмов, проявившие наиболее активный рост во всех трех случаях. Дальнейшую селекцию микроорганизмов проводили в жидкой синтетической питательной среде ММ9 с 2,4-Д(2-

этилгексильный эфир) (200 мг/л) и метсульфурон-метилом (200 мг/л) с инкубированием в течение 5 суток с аэрацией (20°C, 100 мин⁻¹). На основании результатов измерения оптической плотности клеточной суспензии ($\lambda=560$ нм, спектрофотометр Analytik Jena ScanDrop²) был отобран один штамм, характеризующийся наибольшим ростом при указанных условиях.

Изучение динамики деградации гербицидов проводили в жидкой культуре на среде MM9, содержащей ядохимикаты в пяти вариантах: 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) 200 мг/л, 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) 400 мг/л, метсульфурон-метил 200 мг/л, метсульфурон-метил 400 мг/л, 2,4-Д(2-этилгексильный эфир) 200 мг/л и метсульфурон-метил 200 мг/л. Культивирование проводили в течение 21 дня.

Отбирали пробы культуральной жидкости объемом 3 мл, биомассу отделяли центрифугированием (6000 об/мин., 15 мин.). Экстракцию гербицидов из супернатанта осуществляли равным объемом диэтилового эфира, верхнюю фракцию отделяли и высушивали безводным Na₂SO₄. Экстракт упаривали досуха, сухой остаток растворяли в 1 мл подвижной фазы и анализировали методом ВЭЖХ-МС для метсульфурон-метила и ГХ для 2,4-Д (2-этилгексильный эфир).

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 капилляре – 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/час, расход газа на конусе – 150 л/час. Анализ ВЭЖХ-МС проводили на хромато-масс-спектрометре «Waters» с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором PDA 996 и масс-детектором «Micromass ZQ 2000» (Waters, США), использовали колонку “HYPERSIL C18” длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм и с размером частиц 5 мкм. Запись масс-спектров производили в режиме регистрации положительных (ESI+) и отрицательных ионов (ESI-). Анализ ГХ проводили на газовом хроматографе AGILENT. Использовали колонку HP-5, детектор пламенно-ионизационный. Температура инжектора – 250°C, поток газа-носителя через колонку – 2,12 см³/мин; объем вводимой пробы – 0,6 мкл, начальная температура термостата колонки – 50°C; время выдерживания при начальной температуре – 1 мин; конечная температура термостата колонки – 260°C, температурный градиент термостата – 10°C/мин,

время выдерживания при конечной температуре – 10 мин; температура детектора 300°C.

Результаты. Анализ проб культуральной жидкости, показал, что общая тенденция в изменении содержания использованных гербицидов имеет сходный характер. Так, при культивировании отобранного штамма бактерий на среде содержащей 2,4-Д (2-этилгексилловый эфир) в концентрациях 200 мг/л и 400 мг/л, а также на среде с одновременным присутствием обоих гербицидов отмечено, что содержание 2,4-Д начинает заметно снижаться уже после первых суток. Затем, после пяти суток культивирования, данный показатель начинает увеличиваться, и эта тенденция может сохраняться вплоть до 15-х суток. При этом, однако, содержание гербицида в культуральной жидкости не превышает данный показатель, зафиксированный после первых суток. В дальнейшем содержание 2,4-Д вновь снижается. Отмеченные колебания содержания гербицида в культуральной жидкости, возможно, можно связать с тем, что клетки микроорганизмов на первых этапах культивирования усиленно поглощают гербицид, однако при этом не осуществляют деградацию всей поглощённой массы, остатки которой затем высвобождаются. Тем не менее, сравнение содержания гербицида 2,4-Д в среде в начале культивирования и в конце (21-е сутки) показывает, что его количество заметно снижается: на 96–91% при исходной концентрации 200 мг/л и 400 мг/л, соответственно, а также на 62% при совместном внесении двух гербицидов.

Таким образом, выделенный штамм представляет определённый интерес для дальнейших исследований, предполагающих, в том числе, изучение активности ферментов дегалогеназ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гербициды и окружающая среда / Ю.Я. Спиридонова [и др.] // *Агрохимия*. – 2000. – №1. – С. 37–41.
2. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М.: Мир, 1976. – 436 с.