



Биол. журн. Армении, 1 (62), 2010

БИОДЕГРАДАЦИЯ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ

С.Ш. ТАТИКЯН, Н.И. МКРТЧЯН, Н.В. СИМОНЯН, Г.Э. ХАЧАТРЯН

*Ереванский физический институт,
лаборатория радиационной биофизики*

Исследована способность культур микроорганизмов из коллекции, собранной в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ, подвергать биодegradации триазиновые гербициды, широко используемые в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками. Выявлен ряд штаммов, способных использовать гербициды метазин и пропазин в качестве источников углерода и азота. Исследовано влияние ряда факторов на скорость роста этих культур и деградацию пропазина. Полученные данные позволяют сделать допущение о том, что ферментативный аппарат, вовлеченный исследованными микроорганизмами в процесс деградации, различен.

Гербицид – деградация – метазин – пропазин

Հետազոտված է որոշ մանրէների կուլտուրաների եռազինային հերբիցիդներ քայքայելու ունակությունը: Աշխատանքներում օգտագործվել են Ռադիացիոն կենսաֆիզիկայի լաբորատորիայում ստեղծված մանրէների հավաքածուի կուլտուրաները: Հայտնաբերված են շտամներ, որոնք ընդունակ են օգտագործել մետազինը և պրոպազինը որպես ածխածնի և ազոտի աղբյուր: Ուսումնասիրված է այդ կուլտուրաների աճի և պրոպազինի քայքայման արագության կախումը մի շարք պայմաններից: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրել, որ այդ կուլտուրաներում հերբիցիդների քայքայումն իրականացնող ֆերմենտային ապարատները միմյանցից տարբերվում են:

Հերբիցիդ (քայքայում) / մետազին / պրոպազին

The capability of some cultures of microorganisms to degradate the triazine herbicides widely used in agriculture for struggling against weeds has been investigated. In the current work the collection of microorganisms created in the Laboratory of radiation biophysics of YerPhI was used. A number of strains capable to use herbicides metazine and propazine as carbon and nitrogen sources were found out. The dependence of these cultures growth rate and propazine degradation on a number of factors has been investigated. The obtained data allow making an assumption that the enzymatic system, involved in the degradation process by these microorganisms, is different.

Herbicide – degradation – metazine – propazine

Современное сельское хозяйство потребляет огромное количество пестицидов различной структуры и назначения. Все эти соединения более или менее длительное время остаются в почве и могут накапливаться в растениях или мигрировать на значительные расстояния вместе с грунтовыми водами. Практика показывает, что даже при строгом соблюдении технологии применения ядохимикатов невозможно предотвратить загрязнение окружающей среды, не говоря уже о таких

областях деятельности человека, как войны и химическая индустрия, где загрязнение вообще не поддается контролю. В литературе можно найти много примеров обнаружения различных пестицидов в воде и продуктах питания [2, 3, 4, 13, 15]. Очевидно, что природоохранные мероприятия не могут ограничиваться только усилением контроля за использованием ядохимикатов, но должны включать также создание и применение технологий очистки загрязненных почв и воды, а также методов экспресс-анализа степени их загрязненности. Применение микробиологических культур для этих целей является очень перспективным направлением. Такие технологии не требуют больших экономических затрат, и, будучи биосовместимыми, являются наиболее щадящими. Современные методы биотехнологии позволяют получать культуры для деградации самых разнообразных, даже химически таких стабильных соединений, как ДДТ [6, 10]. Несколько лет назад в нашей лаборатории из дикой микрофлоры были выделены два штамма *Pseudomonas sp.*, способные разрушать 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ) [11]. Нам также удалось на протяжении нескольких лет собрать коллекцию микроорганизмов, толерантных к присутствию различных токсичных соединений.

Триазिनковые гербициды - симазин, пропазин, атразин и ряд других являются наиболее широко применяемыми гербицидами для защиты целого ряда сельскохозяйственных культур от сорняков. Например, по данным Environment Protection Agency (EPA), годовое потребление только симазина в США превышает 2 млн тонн [17].

В литературе описана микробиологическая деградация некоторых триазинковых гербицидов как отдельными культурами, так и смешанной микрофлорой. В описанных случаях деградация в основном происходит с участием анаэробных или факультативно анаэробных микроорганизмов [5,7,8,9,12]. В настоящей работе рассмотрена микробиологическая деградация гербицидов триазиновой группы некоторыми микроорганизмами родов *Pseudomonas* и *Bacillus* в аэробных условиях.

Материал и методы: Культуры микроорганизмов. В работе были использованы культуры микроорганизмов, в основном идентифицированных до уровня рода из коллекции культур, собранных в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ на протяжении многих лет в ходе выполнения проектов, связанных с исследованием окружающей среды.

Штаммы микроорганизмов выращивали на плотных агаризованных средах различного состава. В качестве основы для ростовой среды применялась солевая агаризованная минимальная среда (МС) следующего состава: агар-агар – 2%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,15%, KH_2PO_4 – 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,02%.

В качестве объектов биodeградации были использованы коммерческие препараты пропазина и метазина.

Для выяснения способности культур подвергать гербициды (Ге) биodeградации проверяли их способность расти на МС с добавкой одного лишь гербицида, а также в комбинации с глюкозой в качестве источника углерода, или хлористым аммонием в качестве источника азота.

Посев культур на чашки Петри осуществляли двумя основными способами: стеклянным шпателем и бактериологической щеткой. Во втором случае каждая культура предварительно рассевалась шпателированием на чашки с мясопептонным бульоном, затем из отдельных колоний готовили клеточную суспензию на стерильной водопроводной воде, которая вносилась в ячейки подставки бактериологической щетки.

В наших экспериментах использовали два соединения триазиновой природы – метазин и пропазин. Так как эти соединения практически нерастворимы в воде, их растворяли в спирте и добавляли на поверхность уже готовой среды в чашках Петри, равномерно распределяя по поверхности агара стеклянным шпателем до полного испарения спирта. На поверхность чашки вносили 1 или 2 мг гербицида. На контрольные чашки добавляли такое же количество спирта. Выращивание микроорганизмов проводили при 28° в течение 5-17 дней.

В предварительной серии экспериментов интенсивность роста микроорганизмов оценивали по площади разрастания отдельных колоний, образовавшихся на месте отпечат-

ков щетки. Для этого чашки с колониями фотографировали, и эти рисунки обрабатывали с помощью инструментария обработки изображения программы MatLab, который позволяет автоматически вычерчивать контуры и определять площадь полученной кривой. У наиболее перспективных штаммов, отобранных в результате такой оценки, определяли титр.

Для определения титра выросших культур, отобранных с помощью первой методики, штаммы высевали на чашки Петри газоном и выращивали на протяжении 10-15 дней в стандартных условиях. Через каждые 2-3 дня после посева из пластины агара вырезали куски одинакового размера и выросшую культуру смывали с поверхности агара фиксированным объемом водопроводной воды или буфера. Оптическую плотность клеточной суспензии определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм.

Определение пропазина. Из агаровой среды вырезали куски одинаковой площади и экстрагировали пропазин ацетоном. Содержание пропазина в экстракционной жидкости определяли тонкослойной хроматографией на пластинках Silufol. Элюцию проводили смесью ацетон-толуол в соотношении 2:1. Для проявления пятен применяли методику, описанную в ГОСТ-30349-96 [1]. Пластины опрыскивали реактивом следующего состава: 1%-ный раствор AgNO_3 – 0,5 мл, водный аммиак – 0,7 мл, ацетон до 10 мл, высушивали и облучали ультрафиолетовой кварцевой лампой несколько минут, в результате чего образовывались темные серо-коричневые пятна.

Результаты и обсуждение: В ходе исследований, проводимых в лаборатории радиационной биофизики ЕрФИ, была собрана значительная коллекция культур микроорганизмов, которые были выделены из воды и почвы различных регионов территории республики – Ереванское озеро, Гетар, окрестности промышленных предприятий, таких как НПО «Наирит», завод химреактивов, Армянская АЭС и т.д.

Способность культуры микроорганизмов разрушать некоторое органическое соединение, в первую очередь, предполагает толерантность этой культуры к его присутствию и способность использовать его как источник углерода или/и азота. Исходя из этого предположения, для выявления микроорганизмов, потенциально способных утилизировать метазин и пропазин, мы исследовали способность роста культур из коллекции лаборатории в присутствии этих гербицидов. В этой серии экспериментов было исследовано более 120 культур, в основном представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Культуры выращивали на агаризованной среде (МС+Ге, МС+Ге+Гл). Кроме этого были проанализированы водные вытяжки из проб почвы, взятых в различных районах республики, на предмет наличия в ней микрофлоры, устойчивой к упомянутым гербицидам. В результате сканирования были обнаружены несколько культур, рост которых в присутствии пропазина и метазина оказался более интенсивным, чем в контрольной среде. Эти культуры микроорганизмов были отобраны для дальнейших исследований.

На рис. 1 представлены сравнительные фотографии отпечатков (бляшек), выросших при посеве исследуемых культур на чашки Петри бактериологической щеткой на 12-й день на контрольной (МС) и опытной (МС+Ге) средах. Незначительный рост культур на контрольной среде, скорее всего, обусловлен наличием органических примесей в агаре. Кроме того, известно, что некоторые культуры микроорганизмов способны размножаться даже в условиях резкой нехватки источников энергии [14]. Учитывая этот факт, а также то обстоятельство, что культуры микроорганизмов могут оказаться просто толерантными к присутствию токсичных соединений, все опыты тщательно контролировались и выполнялись в нескольких повторностях, по 2-3 параллельных посева в каждой. Следует отметить, что поведение этих культур микроорганизмов в присутствии пропазина и метазина довольно одинаково и в тех случаях, когда наличие гербицида приводит к увеличению интенсивности роста, и тогда, когда его наличие подавляет рост микроорганизмов (на рисунке обведены пунктирной линией).

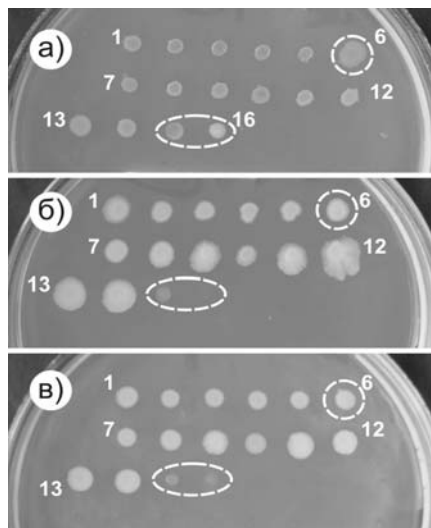


Рис.1. Сравнение отпечатков (бляшек) при посеве культур на чашки Петри бактериологической щеткой на минимальную среду (МС – а) и на среду, содержащую метазин (б) и пропазин (в).

Учитывая то, что эти соединения являются близкими аналогами, такая картина вполне закономерна (рис.2).

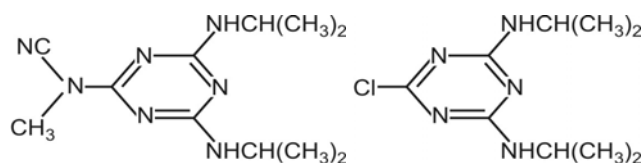


Рис.2. Структурные формулы метазина (слева) и пропазина (справа).

Однако и в поведении отдельных культур наблюдаются значительные различия при исследовании влияния концентрации гербицидов на рост микроорганизмов. Это хорошо видно на приведенной ниже гистограмме, где представлена интенсивность роста культур микроорганизмов в присутствии различных концентраций метазина и пропазина. Повышение концентрации метазина в культуральной среде приводит к заметному повышению интенсивности роста нескольких культур (например №№ 9-11: здесь и далее приводятся просто порядковые номера бляшек). Остальные культуры, хотя и проявляют некоторое угнетение роста, тем не менее, по сравнению с контролем, растут значительно интенсивнее (за исключением культур №№ 6,15,16). Конечно, эти культуры в дальнейших исследованиях не использовались, и здесь представлены только для иллюстрации отрицательного влияния ядохимикатов на почвенную микрофлору. В среде с добавкой пропазина только для одной культуры повышение концентрации гербицида приводит к увеличению интенсивности роста. Примечательно, что эта культура интенсивнее растет также в присутствии более высокой концентрации метазина, а у тех же культур №№ 6, 15, 16 наблюдается угнетение роста. Как видно из рис.1, № 16 практически не растет в присутствии гербицида, а у № 15 при высокой концентрации наблюдается лишь незначительный рост.

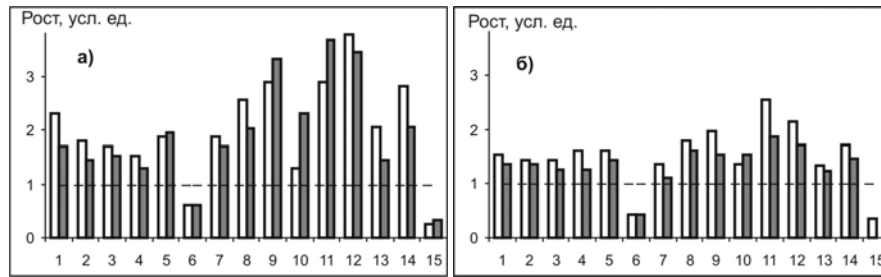


Рис. 3. Влияние различных концентраций метазина (а) и пропазина (б) на рост некоторых культур. Светлые столбики – низкая концентрация, темные – высокая. Для каждого отдельного случая интенсивность роста культуры на контрольной среде принята за единицу (пунктирная линия). Номера соответствуют номерам колоний на рис.1.

На рис. 4 представлена динамика роста некоторых культур в присутствии различных концентраций метазина. Здесь представлены те культуры, которые положительно реагируют на увеличение концентрации гербицида. На наш взгляд, очень перспективным может оказаться штамм *Pseudomonas sp.* T25 (№ 10 на гистограмме).

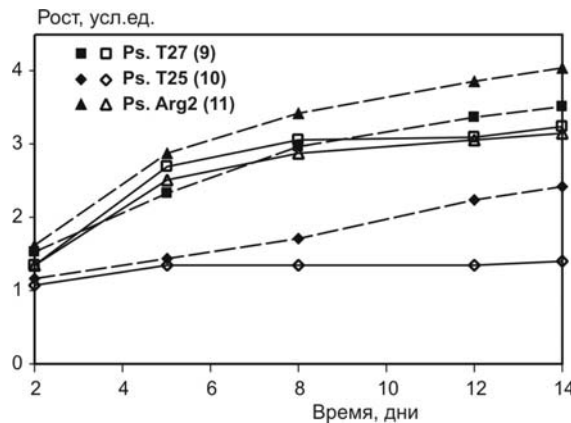


Рис. 4. Динамика роста некоторых штаммов микроорганизмов в присутствии низкой (сплошные линии) и высокой (пунктирные линии) концентрации метазина. Номера в скобках соответствуют номерам на рис.1. Рост контроля в каждой точке принят за единицу.

В течение первых 5 дней скорость роста штамма Т 25 практически одинакова при разных концентрациях метазина, однако в дальнейшем рост их культуры при высокой концентрации происходит значительно интенсивнее. Можно предположить, что в данном случае наблюдается хорошо известное явление индукции, когда под воздействием определенного соединения происходит активация соответствующего ферментативного аппарата. Добавление в среду глюкозы в концентрации до 0,3% или хлорида аммония (0,1%) практически не приводила к дополнительной интенсификации роста (данные не представлены).

На рис. 5 представлены изменение титра микроорганизмов и количества пропазина в среде при выращивании нескольких культур рода *Pseudomonas*. Это культуры №№ 9-11 на гистограмме.

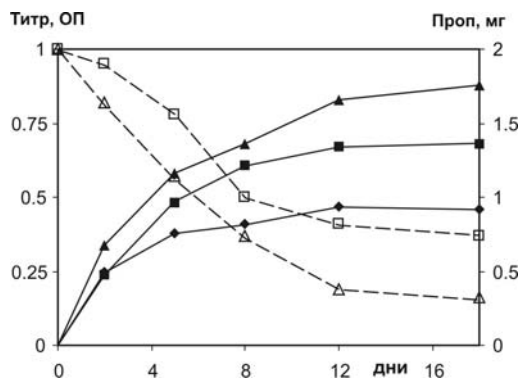


Рис. 5. Изменение титра (сплошные линии) и количества пропазина в среде роста (пунктирные линии). Культуры и обозначения те же, что на рис. 4.

Из рисунка видно, что рост микроорганизмов сопровождается эффективным уменьшением количества введенного пропазина. Учитывая, что это соединение богато не только углеродом, но и азотом (5 атомов азота в молекуле), можно предположить, что пропазин служит источником как углерода, так и азота. К сожалению, отсутствие достаточно чувствительных доступных методик определения метазина на данном этапе работ не позволило получить достоверные данные об изменении его количества в ходе выращивания культур микроорганизмов. Отметим, что методика, использованная для определения пропазина, является высокочувствительной, но основана на наличии хлора в составе определяемой молекулы.

Мы пока не исследовали пути и продукты деградации этих гербицидов. Ниже приводится хорошо известный в литературе путь деградации триазиновых гербицидов, который протекает до распада кольца и образования CO_2 и NH_3 (рис. 6.) с участием почвенной микрофлоры [16]. Эта схема деградации – общая для многих соединений триазиновой группы, где, в частности, аммелин и циануриновая кислота являются промежуточными продуктами распада.



Рис. 6. Биодеградация триазиновых гербицидов. На схеме представлены только некоторые этапы.

Можно предположить, что наблюдаемая нами деградация метазина и пропазина также происходит аналогичным путем, однако детальное исследование процесса деградации является предметом дальнейшего исследования. Исследована способность роста ряда микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Bacillus* на средах, содержащих триазиновые гербициды.

Выявлены несколько культур, которые не только толерантны к этим соединениям, но способны также подвергнуть их частичной или полной деградации. Исследовано влияние ростовой среды на особенности роста некоторых микроорганизмов. Показано, что эти культуры по-разному реагируют на природу и концентрацию гербицида, что позволяет предположить наличие у них различного ферментативного аппарата, вовлеченного в процесс биodeградации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Межгосударственный стандарт ГОСТ 30349-96 "Фрукты, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов". М., Изд-во стандартов, 1997.
2. Эйхлер В., Яды в нашей пище, М., "Мир", 1986.
3. *Alle A., Dembelle A., Yao B. and Ado G.* Distribution of Organochlorine Pesticides in Human Breast Milk and Adipose Tissue from Two Locations in Cote d'Ivoire. *Asian Journal of Applied Sciences* 2, 456-463, 2009.
4. *Ahmad S., Zia-Ul-Haq M., Imran M. et al.* Determination of Residual Contents of Pesticides in Rice Crop from Different Regions of Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 40, 3, 1253-1257, 2008.
5. *Cook, A.M.* Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 46, 93-116, 1987.
6. *Corona-Cruz A., Gold-Bouchot G., Gutierrez-Rojas M., Monroy-Hermosillo O. and Favela E.* Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 2, 219-225, 1999.
7. *Crowford, J.J.; Sims, G.K.; Mulvaney, R.L.; Radosevich, M.* Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 5, 618-623, 1998.
8. *Ghosh P. K., Philip L., and Bandyopadhyay M. J.* Anaerobic Treatment of Atrazine Bearing Wastewater. *Environ. Sci. Health*, B36, 3, 301-316 2001.
9. *Jessee, J.A., Benoit R.A., Hendricks A.C., Allen G.C., Neal J.L.* Anaerobic degradation of cyanuric acid, cysteine, and atrazine by a facultative anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 97-102, 1983.
10. *Kamanavalli Ch.M. and Ninnekar H.Z.* Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* Species. *Current Microbiology*, 48, 1, pp. 10-13, 2004.
11. *Khachatryan G.E., Mkrtchyan N.I., Simonyan N.V., Khachatryan T.V., Tatikyan S.Sh.* Two Unidentified Aerobic Bacterial Strains That Transform 2,4,6-Trinitrotoluene. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 393-395, 2000.
12. *Mandelbaum R.T., Wackett, L.P., and Allan, D.L.* Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 6, 1695-1701, 1993.
13. Mohapatra S. P., Kumar M., Gajbhiye V. T. 1 and Agnihotri N. P. Ground water contamination by organochlorine insecticide residues in a rural area in the indo-gangetic plain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 35, 2, 155-164, 1995.
14. *Myasnik M., Safiyazov Zh., Akhmedova D., and Simonyan N.* Growth Patterns of *E. Coli* in Saline., *Studia Biophys.*, 17, 55-62, 1969.
15. *Oleszek W., Terelak H., Maliszewska-Kordybach B., Kukula S.* Soil, Food and Agroproduct Contamination Monitoring in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 3, 261-268, 2003.
16. *Scribner E., Thurman E.M., Zimmerman L.R.* Analysis of Selected Herbicide Metabolites in Surface and Ground Water of the United States. *The Science of the Total Environment*, 248, 2, 157-167, 2000.
17. http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw_contamfs/simazine.html

Поступила 04.09.2009.