
БІОРІЗНОМАНІТТЯ ТА БІОБЕЗПЕКА ЕКОСИСТЕМ

УДК 579.64

БІОДЕГРАДАЦІЯ ГЕРБІЦИДІВ ШТАМАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ

І.С. Бровко¹, І.О. Подгурська^{1,2}, Я.В. Чабанюк¹, О.О. Кордунян¹

¹ Інститут агроекології і природокористування НААН

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Досліджено здатність мікроорганізмів-деструкторів гербіцидів на основі імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти рости на середовищах з додаванням указаних речовин як єдиного джерела вуглецю. Побудовано криві розвитку культур ізольованих, здатних до зростання на середовищах, що містять вказані гербіциди, та визначено добу переходу культури у стаціонарну фазу росту. Встановлено факт швидкого нарощування біомаси ізольованих та вихід культур на логарифмічну фазу вже з першої доби культивування, що свідчить про можливість залучення гербіцидів до метаболічних процесів клітин бактерій. Проведено аналіз деградації вказаних гербіцидів за дії мікроорганізмів-деструкторів, що засвідчує можливість деструкції імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти до 82, 83, 86 та 80% на сьому добу культивування відповідно. Доведено неможливість досягнення подібного рівня деградації вказаних гербіцидів унаслідок гідролітичної дисоціації на стерильному середовищі.

Ключові слова: мікроорганізми-деструктори, імазамокс, кломазон, гліфосат, 2,4-дихлорфеноксицтова кислота.

Серед сучасних методів і технологій ремедіації ґрунтів, забруднених пестицидами, чільне місце займає біотехнологічний підхід як ефективний та економічний спосіб відновлення ґрунту. Останніми роками встановлено значну роль мікроорганізмів у підтримці екологічної рівноваги: численні форми бактерій мають здатність залучати до свого процесу обміну речовин ксенобіотики, тобто використовувати їх у конструктивному і енергетичному метаболізмі клітини [1]. Мікробна деградація токсичних сполук, що відбувається завдяки ферментним системам, є доволі новим і ефективним прийомом щодо деструкції різноманітних ксенобіотиків, зокрема гербіцидів.

Номенклатура екологічно важливих біологічних агентів, у т.ч. мікроорганізмів, систематично розширюється. З ґрунту та

інших субстратів повсякчас виділяють нові бактерії, що мають технологічне значення та можуть бути вдосконалені як традиційними методами селекції (мутагенез), так і за допомогою генної інженерії.

Найпоширеніший метод санації ґрунтів полягає в доборі культури мікроорганізму-детоксикатора, накопиченні його біомаси і змішуванні з ґрунтом на ділянках, де необхідно очищення від токсичних сполук. Ефективність такого методу обумовлено потенційною здатністю внесеної культури за своїми біологічними властивостями включитися у процеси вже складеного ґрунтового біоценозу. Мікробна деструкція є найбільш ефективним і екологічно прийнятним способом видалення органічних ксенобіотиків, зокрема гербіцидів. Для їх знешкодження використовують різноманітні мікроорганізми, проте для екологічних потреб найчастіше залучають саме гетеротрофні форми [2].

Біологічні методи відновлення забруднених ґрунтів потребують набагато менше витрат для свого застосування, аніж відомі небіологічні технології, що й пояснює актуальність досліджень у цьому аспекті. Саме тому розробка і застосування на практиці біотехнологічних способів очищення ґрунтів, забруднених гербицидами, є доволі перспективним напрямом, який об'єднує зусилля вчених і практиків з різноманітних галузей науки [3].

Метою роботи було дослідження особливостей росту мікроорганізмів-деструкторів гербицидів на середовищах, які містять імазамокс, кломазон, гліфосат та 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту як єдине джерело вуглецю, та встановлення рівня мікробної деградації вказаних речовин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення досліджень були обрані комерційні препарати на основі діючих речовин імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти – Пульсар® 40 (ТОВ «BASF Україна», Україна), Каліф 480 («Аган Кемікал Мануфакчерз Лтд.», Ізраїль), Гліфовіт Екстра, РК («Укравіт», Україна), Дезормон 600 («Баєр КропСаєнс», Німеччина).

Для визначення рівня деградації імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти за впливу мікроорганізмів біомасу *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. та *Arthrobacter* sp. нарощували у м'ясопептонному бульйоні до оптичної густини (OD_{600}), що дорівнює 2; проводили центрифугування при 10000 g; двічі промивали та ресуспендували рідким мінерально-сольовим середовищем і доводили до $OD_{600} = 1$; розводили мінерально-сольовим середовищем з додаванням імазамоксу, кломазону, гліфосату або 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти у концентрації 0,05 г/л у співвідношенні 1:100 (об./об.). Кожен клон інкубували впродовж 7 днів при 30°C і аерації 150 грм у трьох повторностях; контроль без інокулянта інкубували за ідентичних умов. Зразки відбирали з інтервалом у 24 год. Інтенсивність росту бактерій ви-

значали за оптичною густиною проби при довжині хвилі 600 нм на спектрофотометрі (Optizen 2120UV, РОК).

Концентрацію досліджуваного гербициду визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на HPLC-хроматографі, обладнаному діодно-матричним детектором (Agilent 1100 series, США). Хроматографічне розділення здійснювали на колонці YWG-C18; калібрування – за серійними розведеньнями стандартів препаратів (PESTANAL® analytical standard, SIGMA, UK).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наші попередні дослідження були спрямовані на виділення та ідентифікацію штамів мікроорганізмів-деструкторів гербицидів на основі імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти [4]. Унаслідок проведеного скринінгу було отримано 4 клони, здатні рости на середовищах з імазамоксом як єдиним джерелом вуглецю; 3 клони, здатні до зростання на середовищах з кломазоном; та по 2 клони, які могли нарощувати свою біомасу на середовищах з додаванням гліфосату або 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти відповідно. Вірогідно, отриманим клонам характерною є не лише резистентність до досліджуваних гербицидів, а й здатність метаболізувати останні, що робить їх перспективними об'єктами для подальших досліджень та використання в біотехнологіях ремедіації ґрунтів, забруднених пестицидами.

Для детального кількісного дослідження використання вказаних гербицидів у своєму метаболізмі обраними клонами через певний проміжок часу відібрані культури культивували на мінерально-сольовому середовищі з 50 мг/мл досліджуваного гербициду з стартовою оптичною густиною культури 0,1 оптичної одиниці (о.од.), при довжині хвилі 600 нм ($OD_{600} = 0,1$). Для кожного з відібраних клонів були побудовані криві розвитку культури.

За додавання в середовище препарату на основі імазамоксу впродовж 7 діб культивування спостерігалася позитивна динаміка росту та збільшення оптичної

густини для кожного з ізолятів (рис. 1). Найбільший обсяг біомаси зафіксовано на 6 добу культивування для всіх досліджених ізолятів, після чого відбувався вихід культури на певне плато, що обумовлено початком стаціонарної фази росту. Найбільшу біомасу у процесі культивування нарощував ізолят ІМ2, що відповідало 0,90 о.од. густини, а найменшу – ізолят ІМ1 – 0,70 о.од.

Культивування трьох відібраних ізолятів з використанням гербіциду кломазон сприяло позитивній динаміці їх росту. Ізоляти СL1 та СL3 потрапляли у стаціонарну фазу росту на 5 добу, тобто на 1 добу раніше, ніж ізоляти, здатні рости за дії препарату імазамокс. Найбільша біомаса спостерігалася у варіанті з ізолятом СL3 – 0,87 о.од. на 7 добу культивування (рис. 2).

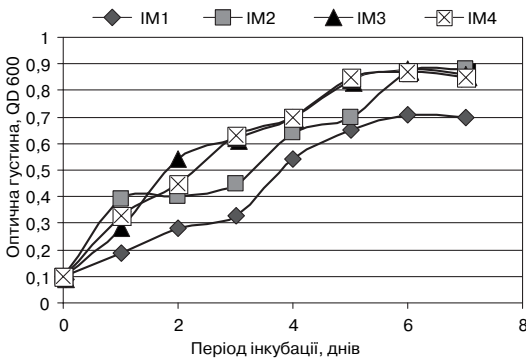


Рис. 1. Розвиток культур ізолятів за дії гербіциду імазамокс як єдиного джерела вуглецю: ІМ1, ІМ2, ІМ3, ІМ4 – номери ізолятів

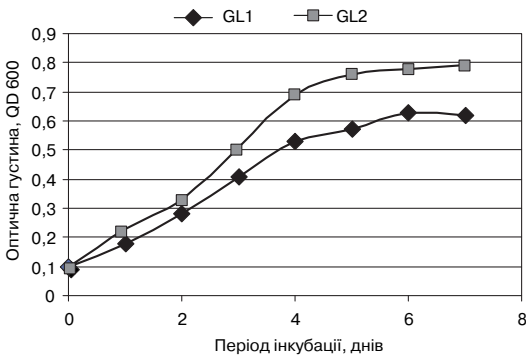


Рис. 3. Розвиток культур ізолятів за дії гербіциду гліфосат як єдиного джерела вуглецю: GL1, GL2 – номери ізолятів

Дослідження здатності мікроорганізмів рости на середовищах з гліфосатом засвідчило, що ізоляти GL1 та GL2 швидко нарощували біомасу та досягали стаціонарної фази росту вже на 4 день культивування. Максимальна оптична густина становила 0,79 о.од. для ізоляту GL2, мінімальна – 0,62 о.од. для ізоляту GL1 (рис. 3).

Крива росту ізолятів на середовищах з 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою свідчить про рівномірний розвиток бактерій упродовж логарифмічної фази росту та перехід до стаціонарної фази на 4 день культивування. На 7 добу максимальний обсяг біомаси було нарощено ізолятом D1, що відповідало 0,81 о.од. оптичної густини, а мінімальна – ізолятом D2 – 0,72 о.од. (рис. 4).

Слід зауважити, що за дії всіх речовин у всіх варіантах досліді під час розвитку

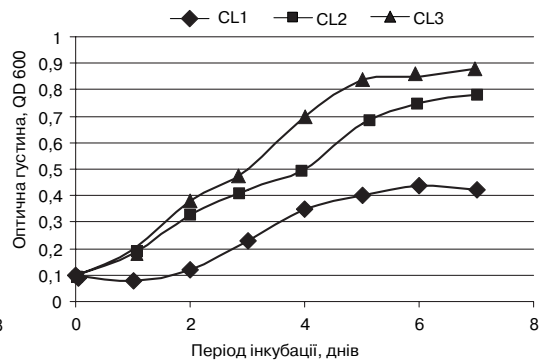


Рис. 2. Розвиток культур ізолятів за дії гербіциду кломазон як єдиного джерела вуглецю: СL1, СL2, СL3 – номери ізолятів

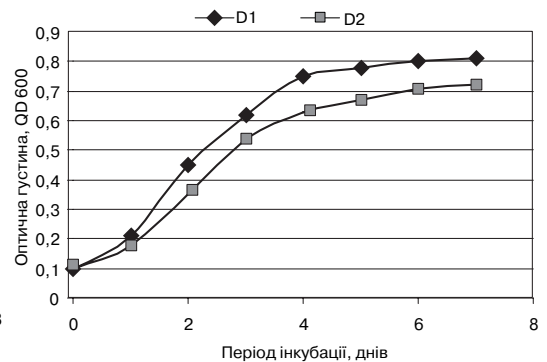


Рис. 4. Розвиток культур ізолятів за дії гербіциду 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти як єдиного джерела вуглецю: D1, D2 – номери ізолятів

культур не спостерігалася адаптаційна фаза росту — швидке нарощування біомаси та вихід культур у логарифмічну фазу росту відбувався вже на першу добу культивування, що може свідчити про можливість залучення цих речовин до метаболічних процесів клітини.

Тому наступним етапом досліджень було з'ясування деградації вказаних гербіцидів за дії мікроорганізмів-деструкторів. Концентрації цих сполук у середовищах, де культивувалися досліджувані ізоляти, визначали кожні 24 год (табл. 1).

Окремо досліджували можливість гідролітичної деградації гербіцидів на середо-

вищах без додавання культури мікроорганізму-деструктора (табл. 2).

Так, у варіанті з використанням препарату імазамокс ізоляти ІМ1, ІМ2, ІМ3 та ІМ4 метаболізують близько 82% цієї речовини впродовж періоду спостереження. Зауважимо, що близько 50% імазамоксу метаболізується на 2–3 добу інкубації, що значно перевищує рівень гідролітичної деградації за цей час.

Рівні деградації кломазону свідчать, що ізоляти СЛ1, СЛ2 та СЛ3 можуть метаболізувати 68–83% вказаного гербіциду впродовж 7 днів культивування порівняно з майже повною відсутністю деградації

Таблиця 1

Рівні деградації імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти за дії штамів мікроорганізмів-деструкторів

Період інкубації, днів	Деградація гербіциду, %											
	Імазамокс				Кломазон			Гліфосат		2,4-D		
	ІМ1	ІМ2	ІМ3	ІМ4	СЛ1	СЛ2	СЛ3	СЛ1	СЛ2	СЛ1	СЛ2	
1	16	20	22	32	14	20	38	16	28	38	20	
2	20	28	36	47	16	22	44	24	36	42	24	
3	40	44	38	50	28	40	60	55	59	56	46	
4	54	62	50	74	42	60	72	70	74	68	56	
5	58	74	70	78	56	70	76	74	76	72	70	
6	64	80	76	79	58	80	78	78	79	76	78	
7	68	82	78	80	68	83	82	84	86	80	80	

Таблиця 2

Рівні деградації імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти у стерильному середовищі

Період інкубації, днів	Деградація гербіциду, %			
	Імазамокс	Кломазон	Гліфосат	2,4-D
1	0,4	0,0	0,6	0,2
2	0,8	0,1	1,0	0,3
3	1,5	0,2	1,2	0,4
4	2,0	0,3	1,4	0,6
5	2,8	0,3	1,6	0,7
6	3,6	0,3	2,0	1,0
7	4,4	0,4	2,2	1,4

пестициду в стерильному середовищі, що узгоджується з попередніми даними про незначну деградацію імазамоксу та відсутність деградації кломазону під дією гідролізу [5].

Мікробна деструкція гліфосату ізолятами GL1 та GL2 відбувалася доволі активно — на 3-й день інкубації вона становила вже 55–59%, а на 7-й — 84–86%, на противагу 2%-ій деградації гербіциду в стерильних умовах. Отримані результати підтверджують дані щодо швидкої деградації гербіциду під дією штамів-деструкторів та незначний ступінь його гідролітичної дисоціації [6].

Розкладання 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти клонами D1 і D2 відбувалося також доволі активно: на 3-й день інкубації 46–56% гербіциду зазнало деструкції, а на 7-й — 80%. Рівень гідролітичної дисоціації не перевищував 1,4%, що цілком узгоджується з попередніми даними про стабільність вмісту вказаного гербіциду в стерильному середовищі [7].

ВИСНОВКИ

Дослідження здатності виділених ізолятів мікроорганізмів-деструкторів до росту на середовищах із додаванням імазамоксу, кломазону, гліфосату і 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти та до деструкції вказаних гербіцидів засвідчило перспективність використання виділених клонів для розроблення біотехнології очищення ділянок ґрунту, забруднених гербіцидами. Встановлено здатність досліджених ізолятів рости на середовищах з перевищенням доз гербіцидів та можливість їх використання як єдиного джерела вуглецю, що свідчить про здатність діючої речовини гербіциду вступати в метаболічні процеси клітин мікроорганізмів. Рівні деградації гербіцидів під дією штамів-деструкторів досягали 82% для імазамоксу, 83 — кломазону, 86 — гліфосату і 80% — для 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти на 7-й день культивування, що є свідченням високого потенціалу виділених ізолятів у технологіях біоремедіації.

ЛІТЕРАТУРА

1. Решетов Г.Г. Эффективность метода микробной деструкции пестицида тетраметилтиурамдисульфида / Г.Г. Решетов, Т.Т. Тугаева // Вестник Саратовского государственного социально-экономического университета. — 2012. — № 1. — С. 220–223.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология: принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
3. Квеститадзе Г.И. Введение в биотехнологию / Г.И. Квеститадзе, А.М. Безбородов. — М.: Наука, 2002. — 283 с.
4. Скринінг мікроорганізмів — потенційних деструкторів гербіцидів / І.С. Бровко, І.О. Подгурська, Я.В. Чабанюк, О.О. Кордунян // Агроєкологічний журнал. — 2018. — № 1. — С. 127–132.

5. Dziedzic J.E. FMC 57020 hydrolysis study / J.E. Dziedzic. — FMC Corporation, Princeton, 1982. — 11 p.
6. Кузнецова Е.М. Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков / Е.М. Кузнецова, В.Д. Чмил // Современные проблемы токсикологии. — 2010. — № 1. — С. 87–95.
7. Галиулин Р.В. Особенности разложения гербицида 2,4-Д в системе почва — вода — донные отложения / Р.В. Галиулин, Р.А. Галиулина // Вода: химия и экология. — 2012. — № 1. — С. 86–89.

REFERENCES

1. Reshetov, G.G. & Tugaeva, T.T. (2012). Effektivnost metoda mikrobnoi destrakcii pestitsida tetrametil-tiuramidisulfida [Effective methods of microbial destruction of TMTD pesticide]. *Vestnik Saratovskogo gosudarstvennogo sotcialno-ekonomicheskogo universiteta* — *Bulletin of the Saratov State Social and Economic University*, 1, 220–223 [in Russian].
2. Glick, B. & Pasternak, Dzh. (2002). *Molekuliarnaia biotekhnologija: printcipy i primenenie* [Molecular biotechnology. Principles and Applications]. Moskva: Mir [in Russian].
3. Kvestitadze, G.I. & Bezborodov, A.M. (2002). *Vvedenie v biotekhnologiiu* [Introduction to biotechnology]. Moskva: Nauka [in Russian].

4. Brovko, I.S., Podgurskaia, I.O., Chabanyuk, Ya.V., & Kordunyan, O.O. (2018). Skryninh mikroorhanizmiv — potentsiinykh destrukturiv herbitysydiv [Screening of potential microorganisms as herbicide degraders]. *Ahroekolohichniy zhurnal — Agroecological Journal*, 1, 127–132 [in Ukrainian].
5. Dziedzic, J.E. (1982). *FMC 57020 hydrolysis study*. Princeton: FMC Corporation [in English].
6. Kuznetsova, E.M. & Chmil, V.D. (2010). *Glifosat: povedenie v okruzhaiushchei srede i urovni ostatkov*

[Glyphosate: Environmental fate and levels of residues]. *Sovremennyye problemy toksikologii – Modern Problems of Toxicology*, 1, 87–95 [in Russian].

7. Galiulin, R.V. & Galiulina, R.A. (2012). Oso-bennosti razlozheniia gerbitcida 2,4-D v sis-

teme pochva–voda–donnye otlozheniia [2,4-D herbicide degradation in soil–water–bottom sediment system]. *Voda: khimiia i ekologiia – Water: Chemistry and Ecology*, 1, 86–89 [in Russian].

УДК 631.847.211: 633.34

КОРЕКЦІЯ РИЗОБІАЛЬНИХ УГРУПОВАНЬ ҐРУНТУ ЗА ІНТРОДУКЦІЇ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* РІЗНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ГРУП

Д.В. Крутило¹, О.В. Надкернична¹, О.В. Шерстобова², М.А. Ушакова¹

¹ Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН

² Інститут агроєкології і природокористування НААН

*Досліджено ефективність бінарної композиції штамів *B. japonicum* 46 + *B. japonicum* KB11 як основи мікробних препаратів Ризобіот та Ризогумін для сої. Висвітлено, що поєднання у біопрепаратах двох штамів бульбочкових бактерій сої різних генетичних груп та інтродукція їх у агроценози дає змогу провести корекцію ризобіальних угруповань ґрунту. Обробка насіння сої композицією штамів *B. japonicum* забезпечує формування збалансованих симбіотичних систем за дії інтродукованих та місцевих ризобій. Цей прийом надає можливість інтенсифікувати процес бульбочкоутворення, підвищити рівень симбіотичної азотфіксації, збільшити врожайність культури на 18–35% порівняно з контролем (без інокуляції). Найефективнішим за різних ґрунтово-кліматичних умов є використання торфової форми біопрепарату Ризогумін.*

Ключові слова: ризобіальне угруповання ґрунту, *Bradyrhizobium japonicum*, серогрупи, симбіотична система, соя, урожайність.

Однією з важливих особливостей бобових культур є їх здатність до симбіозу із азотфіксувальними мікроорганізмами — бульбочковими бактеріями, які частково або повністю забезпечують потреби рослин у цьому елементі. Використання активних штамів бульбочкових бактерій для покращення росту та живлення бобових вважається перспективним підходом в екологічному землеробстві [1, 2]. Як основа біологічних препаратів вони забезпечують підвищення врожайності бобових культур, поліпшення якості одержуваної продукції та сприяють формуванню в агроценозах місцевих угруповань специфічних бульбочкових бактерій. Представників ґрунтових популяцій ризобій розглядають як цінний генетичний ресурс для біотехнології сіль-

ського господарства, а з іншого боку, вони можуть бути конкурентами штамів-інокулянтів, знижуючи ефективність мікробних препаратів [1, 3, 4].

Наші попередні дослідження засвідчили, що в ґрунтах України популяції бульбочкових бактерій сої є доволі гетерогенними [5]. Їх представляють дві групи штамів: з повільним та інтенсивним ростом, що різняться за фенотиповими та генотиповими властивостями. Повільно-рослі ризобії віднесено до кількох генетичних груп: USDA 4, USDA 6 та USDA 110, тоді як інтенсивно-рослі штами є менш різномірними — вони належать до однієї генетичної групи USDA 123 [6]. На основі відібраних активних штамів сформовано колекцію бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту. Встановлено, що інтенсивно-рослі штами краще, ніж повільно-рослі, приживаються у ґрунті [7], і це

© Д.В. Крутило, О.В. Надкернична, О.В. Шерстобова, М.А. Ушакова, 2018