

СКРИНІНГ МІКРООРГАНІЗМІВ — ПОТЕНЦІЙНИХ ДЕСТРУКТОРІВ ГЕРБИЦІДІВ

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»

Здійснено скринінг мікроорганізмів — потенційних деструкторів гербицидів на основі імазамоксу, кломазону, гліфосату, 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. Досліджено здатність виділених ізолятів рости на середовищах з робочими концентраціями вказаних гербицидів та концентраціями, що в декілька разів перевищують рекомендовані виробником. Зафіксовано помітне збільшення чисельності мікроорганізмів за додавання робочих концентрацій гербицидів, що свідчить про існування толерантних до гербицидів форм. Проведено аналіз чисельності мікроорганізмів на середовищах з 2-, 5-, 10-, 15- та 20-кратним надлишком вказаних гербицидів та встановлено факт зниження кількості життєздатних мікробних клітин, починаючи з 2-кратного надлишку відповідного препарату, що пояснюється негативною селекцією не резистентних до гербицидів форм. Виділено штами, толерантні до вказаних гербицидів, та здійснено їх ідентифікацію, яка вказала на приналежність цих штамів до родів *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. та *Arthrobacter* sp.

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

Нагальною проблемою аграрного сектора на сьогодні є ліквідація наслідків нерационального землекористування та рекультивация ґрунтів, забруднених ксенобіотиками різноманітного походження та спектра дії. До таких сполук, насамперед, слід віднести гербициди, використання яких останніми десятиліттями стало невід'ємною частиною системного захисту культурних рослин від бур'янів [1].

Питання рекультивации ґрунту після пестицидного стресу особливо гостро стоїть для земель, на яких роками використовувалися хімічні препарати з однією й тією самою діючою речовиною. Як відомо, далеко не всі ксенобіотики можуть швидко розкладатись у ґрунті, деградуючи до менш токсичних речовин, багато з них мають властивість накопичуватись з часом, що негативно позначається на родючості поверхневих шарів ґрунту, а отже, і на врожайності культурних рослин [2].

Реакція ґрунтових мікроорганізмів на дію ксенобіотиків є доволі різноманітною

і залежить від багатьох чинників: хімічної природи, персистентності препарату, ґрунтово-кліматичних умов тощо. Одні мікроорганізми страждають від високих концентрацій пестицидів, інші, навпаки, включають їх у свої метаболічні шляхи, тим самим сприяючи деградації цих сполук в навколишньому природному середовищі. Штами-деструктори можуть стати ефективними біоагентами у створенні мікробних препаратів для рекультивации земель після надмірного або неефективного використання гербицидів [3].

Метою роботи був пошук та виділення мікроорганізмів-деструкторів найбільш поширених у сільському господарстві гербицидів на основі імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, що застосовуються в системах захисту різноманітних сільськогосподарських культур.

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»), Каліф 480 («Аган Кемікал Мануфакчерз Лтд», Ізраїль), Гліфовіт Екстра, РК («Укравіт», Україна), Дезормон 600 («Баєр КропСенс», Німеччина).

Полеві дослідження реакції ґрунтової мікробіоти на дію вказаних гербіцидів у агроценозах сої проводили впродовж 2014–2016 рр. у стаціонарних та короткотривалих дослідах на експериментальному полі відділу агроєкології і біобезпеки ІАП НААН (Хмельницький р-н, Вінницька обл.), координати: 49°35'833"N; 28 03'394"E; 311,2 м над рівнем моря. Ґрунт – чорнозем типовий глибокий, середньосуглинковий на карбонатному лесі.

Вегетаційні та лабораторні дослідження з екотоксикологічного оцінювання гербіцидів за впливом на об'єкти ґрунтової біоти проводили в лабораторії екології мікроорганізмів відділу агроєкології і біобезпеки ІАП НААН.

Виділення мікроорганізмів, резистентних до дії досліджуваних гербіцидів, проводили у зразках ґрунту, відібраного на ділянці дослідного поля, де впродовж тривалого часу використовували препарати цих гербіцидів, згідно із загальноприйнятими методиками ґрунтової мікробіології [4].

Для перевірки на здатність використовувати досліджувані гербіциди як джерело вуглецю отримані ізоляти культивували на твердих поживних середовищах з високим умістом гербіцидів: імазамоксу (0,2–2,0 г/л), кломазону (0,5–4,8), гліфосату (0,8–10,2) та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (0,6–7,2 г/л). Резистентні до гербіцидів ізоляти культивували в рідкому мінерально-сольовому середовищі на термошейкері з аерацією 250 грм при температурі 30°C упродовж 7 діб. Позитивний результат визначали візуально – за помутнінням розчину.

Попередню ідентифікацію відібраних ізолятів проводили за допомогою експрес-систем ідентифікації бактерій API® (BioMérieux, США) відповідно до інструкції виробника. Результати фіксу-

вали після 48 год, отримані цифрові профілі (API codes) порівнювали з профілями інтернет-бази даних відповідного набору (API database). Статистичну обробку даних проводили за допомогою стандартного пакета MS Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Унаслідок селекції ґрунтових мікроорганізмів на агаризованому поживному середовищі з робочою концентрацією імазамоксу та кломазону, рекомендованою інструкцією виробника, та на середовищі з 2-, 5-, 10-, 15- та 20-кратним надлишком відповідного препарату зафіксовано позитивний вплив незначних концентрацій досліджуваних гербіцидів на чисельність мікроорганізмів порівняно з негативним контролем без додавання гербіциду. За введення робочого розчину імазамоксу чисельність мікроорганізмів зростала на 90%, кломазону – на 80% (табл. 1). За 2-кратного надлишку імазамоксу чисельність мікроорганізмів зростала на 5%, кломазону – на 4, але знижувалась на 9 – уже за 5-кратного надлишку імазамоксу та на 15% – за 5-кратного надлишку кломазону порівняно з робочим розчином. За 20-кратного надлишку імазамоксу чисельність бактерій знизилася на 78%, а за тако-

Таблиця 1

Виділення мікроорганізмів, толерантних до імазамоксу та кломазону

Концентрація гербіциду, г/л	Чисельність бактерій, млн КУО/г АСГ*	
	імазамокс	кломазон
0 (контроль)	1,06	1,02
0,2 (робочий розчин)	2,01	1,84
0,4 (2x)	2,11	1,87
1,0 (5x)	1,83	1,57
2,0 (10x)	1,45	1,20
3,0 (15x)	0,70	0,50
4,0 (20x)	0,45	0,30

Примітка (до табл. 1, 2): *АСГ – абсолютно сухий ґрунт.

го самого надлишку кломазону — на 84%. Таке зниження чисельності мікроорганізмів можна пояснити явищем негативної селекції не резистентних до імазамоксу та кломазону форм.

Дослідження зростання мікроорганізмів на середовищі з робочою концентрацією гліфосату та 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, рекомендованою інструкцією виробника, а також на середовищі з 2-, 5-, 10-, 15- та 20-кратним надлишком досліджуваної речовини засвідчило, що вказані концентрації гербіцидів у середовищі зумовлюють помітне збільшення чисельності мікроорганізмів. За додавання робочого розчину гліфосату чисельність життєздатних клітин бактерій зростала на 89%, а 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти — на 84% (табл. 2). Проте вже за 2-кратного надлишку препарату спостерігається зниження чисельності живих клітин на 7% щодо обох гербіцидів. Надлишок гербіциду у 20-кратному розмірі спричиняв зниження чисельності мікроорганізмів на 83% у досліді з гліфосатом та на 69% — з 2,4-дихлорфеноксоцтовою кислотою порівняно з показниками в робочому розчині. Такі відмінності особливостей росту мікроорганізмів на середовищі з гліфосатом та 2,4-дихлорфеноксоцтовою кислотою порівняно з середовищами з імазамоksom та кломазоном можуть бути спричинені сильнішою токсичністю вказаних гербіцидів для більшості мікробних форм [5, 6].

Результати дослідження впливу імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти на чисельність мікроорганізмів у ґрунті свідчать про переважання росту ізолятів, які є толерантними до досліджуваних гербіцидів за додавання їх у середовище. Зауважимо, що у разі значного надлишку препарату ріст толерантних форм мікроорганізмів нівелюється нежиттєздатністю мікроорганізмів, не резистентних до значних концентрацій досліджуваних гербіцидів. Толерантність деяких мікробних форм може бути наслідком резистентності штаму до діючої речовини гербіциду, або здатності до її розкладання (деструкції). Штами-деструктори можуть залучати гербіцид до своїх метаболічних шляхів і тим самим спричиняти зниження його концентрації в навколишньому природному середовищі [7].

З огляду на те, що метою селекції були мікроорганізми, здатні рости на підвищених концентраціях досліджуваних гербіцидів, для подальшої перевірки вибирали різні за фенотипом колонії з 5- та 20-кратним перевищенням концентрацій діючої речовини. Зрештою, було вибрано по 5 представників, що за фенотипом належали до різних таксономічних груп, здатних рости на твердих поживних середовищах з високим умістом відповідних гербіцидів. Клоні IM1, IM2, IM3, IM4, IM5 були обрані як такі, що є толерантними до імазамоксу, клони CL1, CL2, CL3, CL4, CL5 — до кло-

Таблиця 2

Виділення мікроорганізмів, толерантних до гліфосату та 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти

Концентрація гербіциду, г/л	Чисельність бактерій, млн КВО/г АСТ	
	Гліфосат	2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
0 (контроль)	1,03	1,02
0,8 (робочий розчин)	1,95	1,88
1,6 (2x)	1,82	1,74
4,0 (5x)	1,75	1,62
8,0 (10x)	1,58	1,56
12,0 (15x)	0,68	0,83
16,0 (20x)	0,34	0,59

мазону, клони GL1, GL2, GL3, GL4, GL5 — до гліфосату, і клони D1, D2, D3, D4, D5 — до 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти.

Для ідентифікації та класифікації відібраних ізолятів використовували систему швидкої ідентифікації бактерій API®. Для вибору конкретних тест-систем API® проводили аналіз бактеріальної культури відповідно до схеми попереднього дослідження, рекомендованої виробником. Також проводили попереднє морфологічне дослідження колоній та окремих мікроорганізмів, їх забарвлення за Грамом, а також біохімічних реакцій на здатність метаболізувати певні індикаторні субстрати.

Для визначення основних біохімічних характеристик ізольованих грам-негативних мікроорганізмів використовували оксидазний та додаткові біохімічні мікротести, що входять до тест-системи API. Тест на наявність цитохром-оксидази (оксидазний тест) був позитивний для всіх грам-негативних ізолятів, тоді як здатність до окислення та ферментації глюкози різнилась. Слід наголосити, що ізоляти CL1, IM1, CL2, IM3 мали здатність метаболізувати глюкозу тільки в аеробних умовах (O/F = +/-), натомість ізоляти IM2 та IM4 не мали здатності до оксидації та ферментації (O/F = -/-) (табл. 3).

За результатами тестів ізоляти CL1, IM1, CL2 та IM3 були віднесені до роду *Pseudomonas* sp., тоді як IM2 та IM4 — до *Alcaligenes* sp.

Ідентифікація грам-позитивних ізолятів засвідчила, що руйнівну дію на кломазон мають ізоляти, віднесені до родів *Streptomyces* sp. (CL3) та *Bacillus* sp. (CL4, CL5). Здатністю розкладати імазамокс володіє представник роду *Bacillus* sp. (IM5). Гліфосат-руйнівні властивості мали представники родів *Bacillus* sp. (GL1, GL2) та *Arthrobacter* sp. (GL3, GL4, GL5). Характерною особливістю бактерій родів *Bacillus* sp. (D1, D2, D5) та *Streptomyces* sp. (D3, D4) є здатність до розкладання 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (табл. 4).

Оскільки тест-системи API® розроблено та призначено для вузькоспецифічної класифікації ряду патогенних мікроорганізмів з діагностичними цілями, база даних API® не містить необхідної інформації стосовно профілів ґрунтової мікрофлори. Тому ця тест-система використовувалась нами для визначення біохімічного профілю ізолятів, що надало змогу класифікувати мікроорганізми тільки до рівня роду. Подальші дослідження передбачають молекулярно-біологічні підходи, зокрема 16S рРНК-секвенування.

Таблиця 3

Результати попередніх тестів для ідентифікації грам-негативних ізолятів

Ізолят	Морфологічні ознаки	Забарвлення за Грамом	Активність			Попередній результат
			Оксидазна	Оксидазна/ферментативна		
CL1	Палички	Gram-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
IM1	Палички	Gram-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
IM2	Палички	Gram-	+	-	-	<i>Alcaligenes</i> sp.
CL2	Палички	Gram-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
IM3	Палички	Gram-	+	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
IM4	Палички	Gram-	+	-	-	<i>Alcaligenes</i> sp.

Результати попередніх тестів для ідентифікації грам-позитивних ізолятів

Ізолят	Морфологічні ознаки	Забарвлення за Грамом	Активність		Попередній результат
			Оксидазна	Каталазна	
CL3	Палички	Gram+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
CL4	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
CL5	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
IM5	Палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
GL1	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
GL2	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
GL3	Палички	Gram+	–	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
GL4	Палички	Gram+	–	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
GL5	Палички	Gram+	–	+	<i>Arthrobacter</i> sp.
D1	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D2	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D3	Палички	Gram+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
D4	Палички	Gram+	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
D5	Споровмісні палички	Gram+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.

ВИСНОВКИ

У процесі скринінгу мікроорганізмів — потенційних деструкторів гербіцидів на основі імазамоксу, кломазону, гліфосату та 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти було виявлено та відібрано штами, толерантні до досліджуваних гербіцидів. Серед мікроорганізмів, стійких до дії імазамоксу, було ідентифіковано такі, як *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. та *Bacillus* sp. Штами, то-

лерантні до кломазону, належать до родів *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. та *Bacillus* sp. Стійкими до гліфосату виявилися бактерії *Bacillus* sp. і *Arthrobacter* sp., а толерантними до 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти — *Bacillus* sp. та *Streptomyces* sp. Видова ідентифікація бактерій та дослідження їх потенційних властивостей щодо деградації гербіцидів стануть предметом подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Тимчишин О.Р. Екологічні пріоритети у розвитку аграрного виробництва в умовах сталого розвитку сільських територій / О.Р. Тимчишин, Р.С. Грабовський // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. — 2004. — Т. 16, № 3 (60). — Ч. 5. — С. 221–227.
2. Управління ґрунтовими режимами / Л.Р. Петренко, С.В. Вітвицький, С.Ю. Булігін, Р.П. Богданович. — К.: В-во НУБіП України, 2017. — 368 с.
3. Оптимизация технологии биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагард» / В.В. Олискевич, Н.М. Талаловская, С.Э. Третьякова и др. // Известия Саратовского ун-та. — 2013. — Т. 13, Вып. 2. — С. 101–107. — (Серия: Химия. Биология. Экология).
4. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г. Звягинцев. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — 309 с.

5. Исследование острой токсичности глифосата / С.Ю. Максимовских, Б.И. Кудрин, А.Н. Евдокимов, О.М. Плотникова // АПК России. — 2015. — № 72/1. — С. 102–105.
6. Электрохимическая деградация типичного гербицида / М.Д. Веденяпина, Е.Д. Стрельцова, Гутьеррес Портила Джонни Вилард Фернандо, А.А. Веденяпин // Конденсированные среды и межфазные границы. — 2009. — Т. 11, № 2. — С. 111–113.

7. Мікроорганізми як деструктори та індикатори токсичності гетероциклічних сполук / А.Р. Сущко, О.М. Дуган, Л.Р. Журахівська, Н.Г. Марінцова // Львівська Політехніка. — 2016. — № 2. — С. 102–107.

REFERENCES

1. Tymchyshyn, O.R., & Hrabovskyi, R.S. (2004). Ekolohichni pryorityty u rozvytku ahrarnoho vyrobnytstva v umovakh staloho rozvytku silskykh terytorii [Environmental priorities in the development of agricultural production in a sustainable rural development]. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterinarynoi medytsyny ta biotekhnologii imeni S.Z. Hzhyskoho — Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 16, 3, 60, 5, 221–227 [in Ukrainian].
2. Petrenko, L.R., Vitvytskyi S.V., Bulyhin S.Yu., & Bohdanovych R.P. (2017). *Upravlinnia gruntovymy rezhymamy [Management of soil modes]*. Kyiv: Vydavnytstvo Natsionalnoho Universytetu Bioresursiv i Pryrodokorystuvannia Ukrainy [in Ukrainian].
3. Olishevich, V.V., Talalovskaia, N.M., Tretiakova S.E. et al. (2013). Optimizatsiia tekhnologii bioremediatsii selskokhoziaistvennykh zemel, zagriaznennykh gerbitsidom «Gezagard» [Optimization technology bioremediation agricultural land of contaminated of herbicide «Gezagard»]. *Izvestiia Saratovskogo universiteta — News of Saratovs University*, 13, 2, 101–107 [in Russian].
4. Zviagintcev, D.G. (1991). *Metody pochvennoi mikrobiologii i biokhymii [Methods of soil microbiology and biochemistry]*. Moskva: Izdatelstvo Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta [in Russian].
5. Maksimovskikh, S.Iu., Kudrin, B.I., Evdokimov, A.N., & Plotnikova, O.M. (2015). Issledovanie ostroi toksichnosti glifosata [Investigation of the acute glyphosate toxicity]. *Agrarno-promyshlennyi kompleks Rossii — Russian agribusiness industry*, 72, 1, 102–105 [in Russian].
6. Vedeniapina, M.D., Streltcova, E.D., Guterres Portila Dzhonni Vilard Fernando, & Vedeniapin, A.A. (2009). Elektrokhimicheskaia degradatsiia tipichnogo gerbitsida [Electrochemical degradation of the typical herbicide]. *Kondensirovannye sredy i mezhfaznye granitsy — Condensed matter and interphases*, 11, 2, 111–113 [in Russian].
7. Sushko, A.R., Duhan, O.M., Zhurakhivska, L.R., & Marintsova, N.H. (2016). Mikroorganizmy yak destruktory ta indykatory toksychnosti heterotsyklichnykh spolk [Microorganisms as destructors and indicators of toxicity of heterocyclic compounds]. *Lvivska Politekhnika — Lviv Polytechnic National University*, 2, 102–107 [in Ukrainian].

УДК 502:620.3:595.3

ЕКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ Nb-ВМІСНИХ НАНОКОМПЗИТІВ НА ОСНОВІ САПОНІТУ НА *DAPHNIA MAGNA*

М.В. Савчук, М.Ф. Стародуб

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено морфологію новосинтезованих Nb-вмісних нанокмпозитів на основі сапоніту та їх вплив, у т.ч. основного складового нанорозмірного SiO_2 , на розвиток *Daphnia magna*. Висвітлено, що нанокмпозити є пористими, за умов розчинення вони агломерують у більшій структурі з розміром 40–100 нм. Встановлено, що за дії нанокмпозитів у діапазоні концентрації 150–300 мг/л летальних та морфологічних змін *D. magna* не було зафіксовано, а їх репродуктивна функція залишалася на рівні контролю. В діапазоні концентрацій 150–600 мг/л наноматеріал SiO_2 зумовлював зростання смертності ракоподібних до 57%, а репродуктивна функція їх у таких умовах знижувалась.

Ключові слова: нанокмпозити, сапоніт, наночастинки, *Daphnia magna*, токсичність.

Нині нанотехнології дедалі більше застосовуються у різних галузях, створюючи

підґрунтя для нових напрямів технологічного розвитку людства. Застосування наноматеріалів у промисловості, медицині та сільському господарстві відкриває нові