

Mirosława Słaba*, Milena A. Piątek*, Jerzy Długoński*

**DEGRADACJA ALACHLORU PRZEZ MIKROSKOPOWY GRZYB
STRZĘPKOWY *PAECILOMYCES MARQUANDII* W WARUNKACH
NIEDOBORU TLENU I ZRÓŻNICOWANEGO ZASOLENIA**

**ALACHLOR DEGRADATION BY MICROSCOPIC FILAMENTOUS
FUNGUS *PAECILOMYCES MARQUANDII* IN THE CONDITIONS OF
OXYGEN LIMITATION AND DIFFERENTIAL SALINITY**

Słowa kluczowe: alachlor, warunki mikroaerofilne, zasolenie, *Paecilomyces marquandii*.

Key words: alachlor, microaerobic conditions, salinity, *Paecilomyces marquandii*.

*In the presented work the effect of some environmental conditions like oxygen limitation and NaCl presence on alachlor elimination by microscopic fungus *P. marquandii* was tested. In the microaerobic conditions, when the oxygen content reached 12 or even 6%, the growth was 2–3 times lower but 50–60% of the herbicide (50 mg/l) was eliminated by the fungus after 7 days of incubations.*

Simultaneous presence of alachlor and NaCl (8.0 and 16 g/l) had also deleterious effect on the fungus growth. However, the herbicide degradation ability was higher in calculation per unit of dry mass (4.91 mg of substrate / 1 g in comparison to 3.66 mg/g).

*The obtained results show the possibility of *P. marquandii* application for alachlor degradation from polluted areas including marine environments with the low salinity e.g. the Baltic Sea.*

1. WPROWADZENIE

Alachlor (2'-6'-dietylo-N-(metoksymetylo)-chloroacetanilid) jest herbicydem anilidowym, powszechnie stosowanym w rolnictwie aż do początku XXI wieku, kiedy w sposób bezsporny wykazano jego właściwości ksenoestrogenne i zaliczono do EDCs (ang. *Endocrine Disrupting Compounds*), czyli substancji zakłócających prawidłowe funkcjonowanie

* *Dr Mirosława Słaba, mgr Milena Adela Piątek, prof. dr hab. Jerzy Długoński – Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel.: 42 635 44 65; fax: 42 678 49 32; e-mail: jdlugo@biol.uni.lodz.pl*

układu hormonalnego ludzi i zwierząt [Tessier i Clark 1995; Quiang i in. 2010]. Ksenobiotyk ten jest dobrze rozpuszczalny w wodzie (242 mg/l, w temp. 20°C), szybko przenika do wód powierzchniowych i gruntowych oraz łatwo wiąże się zarówno ze składnikami osadów dennych, jak i składnikami gleby [Fava i in. 2000; Hladik i in. 2005; 2008]. Dlatego też wciąż istnieje realne ryzyko skażenia zbiorników wodnych alachlorem oraz jego toksycznymi pochodnymi [Chirnside i in. 2007; Chang i in. 2009].

Zgodnie z dyrektywą 2008/105/EC Parlamentu i Rady Europejskiej z roku 2008 (Official Journal of the European Union L 348/84, 24.12.2008) [Dyrektywa... 2008] oraz rozporządzeniem Ministra Środowiska Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 2 lipca 2010 r. [Rozporządzenie Ministra Środowiska... 2010] alachlor został umieszczony na liście substancji szczególnie niebezpiecznych dla środowiska wodnego, które powinny być całkowicie z niego wyeliminowane.

We wcześniejszej pracy autorów wykazano, że badany przez nas mikroskopowy grzyb strzępkowy *Paecilomyces marquandii*, w optymalnych warunkach wzrostu, jest zdolny do efektywnej (ponad 85%) degradacji alachloru, w czasie 7 dni hodowli, przy stężeniu wyjściowym ksenobiotyku 50 mg/l. Zidentyfikowane zostały również 2 produkty wytwarzane przez badany szczep w trakcie rozkładu alachloru [Słaba i in. 2009].

W warunkach naturalnych nie zawsze można zapewnić parametry optymalne z punktu widzenia wzrostu drobnoustrojów, czy biodegradacji ksenobiotyków. U grzybów, szczególnie istotną rolę w przebiegu tych procesów odgrywa dostępność tlenu oraz zasolenie środowiska. Dlatego w prezentowanej pracy sprawdzono, jaki wpływ na wysoką zdolność degradacyjną *Paecilomyces marquandii* ma ograniczenie dostępu tlenu oraz zwiększone zasolenie hodowli, spowodowane wprowadzeniem do badanych układów NaCl.

2. MATERIAŁY I METODY

Drobnoustrój. W badaniach użyto mikroskopowy grzyb strzępkowy *Paecilomyces marquandii* (Ascomycota), wchodzący w skład kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego, oznaczony numerem IM 6003. Szczep ten został uprzednio wyizolowany z odpadów poflotacyjnych huty metali nieżelaznych.

Odczynniki. Alachlor (2'-6'-dietylo-N-(metoksymetylo)-chloroacetanilid) (Fluka) wprowadzono do hodowli w postaci stężonego roztworu etanolowego (10 mg/ml, w 96% alkoholu etylowym). NaCl (POCH) dodawano do hodowli w postaci uprzednio wyjałowianego, stężonego roztworu wodnego (250 mg/ml).

Do ekstrakcji używano octanu etylu (POCH), a do odwadniania prób bezwodny siarczan sodu (Chempur). Zarówno w czasie przygotowywania prób, jak i do analizy chromatograficznej, stosowano rozpuszczalniki organiczne: metanol i acetonitryl (Baker).

Hodowle *P. marquandii* z dodatkiem alachloru w warunkach deficytu tlenu i/lub w obecności NaCl. Zarodniki pochodzące z hodowli 7-, 10-dniowych, na skosach ZT, zmywano podłożem grzybowym Sabouraud. Zawiesinę zarodników, pozbawioną resztek grzybni, inkubowano w temperaturze 28°C w kolbach stożkowych o objętości 100 ml na wytrząsarce obrotowej (160 obr/min.). Po 24 godzinach pasażowano homogenną grzybnię (15% objętości) do nowej porcji podłoża i inkubowano przez kolejne 24 godziny. Szczegółowy tok przygotowania hodowli *P. marquandii* opisano we wcześniejszych pracach autorów [Słaba i Długoński 2004; Słaba i in. 2009; 2010].

Następnie do kolb z podłożem Sabouraud dodawano 0,1 ml stężonego roztworu alachloru, aby uzyskać w hodowlach wyjściowe stężenie herbicydu 50 mg/l i/lub odpowiednią objętość roztworu NaCl oraz inokulum (15%). Jednocześnie zakładano kontrole biotyczne, zawierające podłoże i inokulum, oraz kontrole abiotyczne, z samym podłożem i alachlorem lub podłożem, ksenobiotykiem i NaCl.

Atmosferę niskotlenową (6 i 12% tlenu w badanych układach) uzyskiwano wykorzystując urządzenie do hodowli drobnoustrojów w warunkach beztlenowych i przy ograniczonej zawartości tlenu – Anoxomat Mark II VP System (firma Mart, Holandia).

Postępowanie prowadzono według metody opracowanej przez producenta – firmę Mart Microbiology B.V. Drachten the Netherlands. Wszystkie hodowle i kontrole abiotyczne inkubowano w temperaturze 28°C, na wytrząsarce obrotowej (160 obr/min.). Po inkubacji biomasę sączone przez sączki, przepłukiwano 2 razy wodą dejonizowaną, suszono do stałej masy i wyznaczano suchą masę grzybni w g/l.

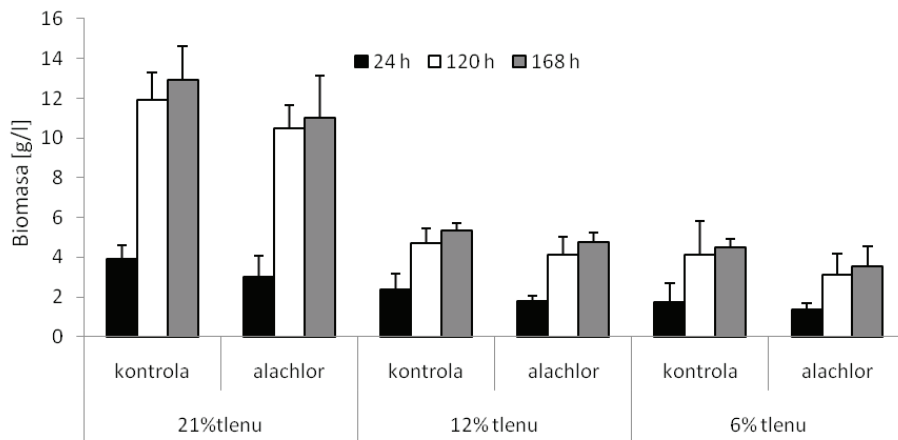
Próby zawierające alachlor homogenizowano z dodatkiem 20 ml octanu etylu. Po trzykrotnej ekstrakcji rozpuszczalnikiem, odwodnieniu i odparowaniu na wyparce próżniowej próby rozpuszczano w 50% roztworze metanolu z dodatkiem kwasu mrówkowego i przygotowywano do analizy chromatograficznej.

Analiza ilościowa zawartości alachloru. Oznaczenie ilościowe alachloru prowadzono przy użyciu zestawu HPLC MS/MS na chromatografie cieczowym Agilent1200 z detektorem masowym AB Sciex QTRAP 3200 i kolumną XDB C18, w następujących warunkach: faza ruchoma: acetonitryl: woda; przepływ 0,5 ml/min, wprowadzana objętość 10 µl.

Wszystkie próby wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki są średnią z trzech powtórzeń (\pm SD).

WYNIKI I Dyskusja

Na początku pracy określono wzrost mikroskopowego grzyba *P. marquandii* na podłożu Sabouraud w obecności alachloru i jednocześnie w warunkach niedoboru tlenu (rys. 1).

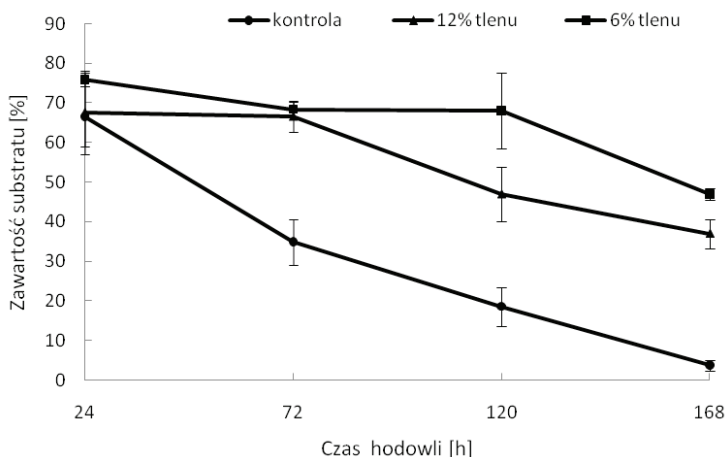


Rys. 1. Zawartość biomasy *P. marquandii* w hodowlach prowadzonych z dodatkiem alachloru i przy różnej zawartości tlenu

Fig. 1. *P. marquandii* biomass in cultures supplemented with alachlor and with a different content of oxygen

Na podstawie uzyskanych wyników (rys. 1) można stwierdzić, że w warunkach limitacji tlenu wzrost grzyba był 2 do 3 razy słabszy (w porównaniu do układu kontrolnego, prowadzonego bez ograniczania dostępu tlenu do kolb). Obecność alachloru w środowisku przy stężeniu wyjściowym 50 mg/l, przy normalnej (21%) oraz ograniczonej (12 i 6%) zawartości tlenu w układzie hodowlanym, nie ograniczała przyrostu biomasy w znaczący sposób.

Następnie zbadano zdolność *P. marquandii* do eliminacji herbicydu w atmosferze niskotlenowej (rys. 2).



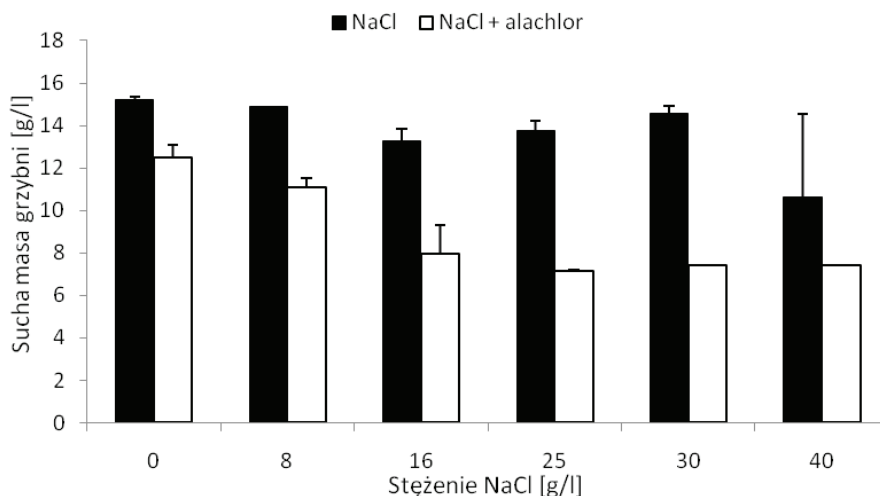
Rys. 2. Eliminacja alachloru przez *P. marquandii* w warunkach mikroaerofilnych

Fig. 2. Alachlor elimination by *P. marquandii* in the microaerobic conditions

Za 100% przyjęto zawartość ksenobiotyku, oznaczoną w kontrolach abiotycznych, zawierających podłoże i ksenobiotyk, poddanych takim samym procedurom jak próby badane, oprócz homogenizacji.

Po 168 godzinach, w hodowlach kontrolnych prowadzonych bez ograniczania dostępu tlenu do układu następował prawie całkowity ubytek substratu (rys. 2). W warunkach kontrolowanego niedoboru tlenu w środowisku wzrostu grzyba z hodowli eliminowane było 50 do 60% wyjściowej ilości alachloru. W literaturze opisano różne szczepy drobnoustrojów, w tym grzybów mikroskopowych, zdolnych do degradacji alachloru w warunkach tlenowych [Pothuluri i in. 1997; Stamper i Tuovinen 1998; Chirnside i in. 2007; Celis i in. 2008]. Dostępność tlenu jest bardzo ważnym czynnikiem środowiskowym, często limitującym degradację ksenobiotyków przez mikroorganizmy tlenowe, do których należy zdecydowana większość grzybów. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że grzyb strzępkowy *P. marquandii* nawet w niekorzystnych warunkach, do jakich należy niedotlenienie środowiska, może eliminować nawet do 60% alachloru, przy stężeniu wyjściowym herbicydu 50 mg/l.

W drugiej części pracy sprawdzono wpływ zasolenia na efektywność degradacji alachloru. W pierwszym etapie określono wpływ NaCl, w stężeniach od 8 do 40 g/l, na wzrost *P. marquandii*, w nieobecności i w obecności alachloru (stężenie wyjściowe 50 mg/l) (rys. 3).



Rys. 3. Przyrost biomasy *P. marquandii* po 5 dniach hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem alachloru i przy różnej zawartości NaCl

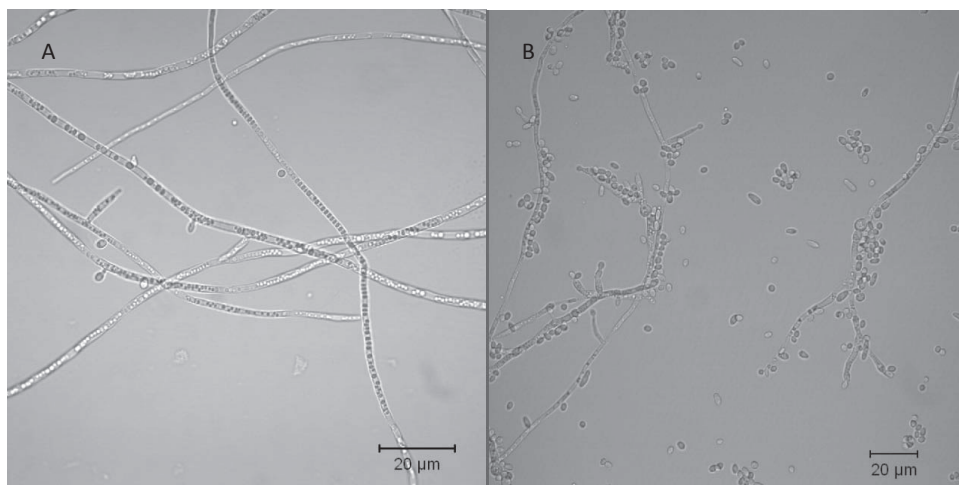
Fig. 3. *P. marquandii* biomass after 5 days of cultures on Sabouraud medium supplemented with alachlor and with different NaCl concentrations

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 3 można stwierdzić, że zarówno ksenobiotyk (50 mg/l), jak i NaCl w badanym zakresie stężeń (8–40 g/l), dodawane do ho-

dowli osobno nie wywoływały silnego ograniczenia wzrostu grzyba. Natomiast skojarzone działanie herbicydu i soli skutkowało ograniczeniem przyrostu biomasy do około 50%. Kontrola mikroskopowa preparatów pochodzących z 5-dniowych hodowli prowadzonych z dodatkiem alachloru i NaCl, ujawniła obecność licznych zarodników, w tym pozostających na etapie kiełkowania oraz strzępek krótszych w porównaniu do hodowli kontrolnej (rys. 4).

Preparaty wykonane z prób zawierających tylko alachlor lub tylko NaCl nie różniły się w sposób znaczący od kontroli. Obserwacje te, podobnie jak wyniki przedstawione na rysunku 3, świadczą o wzroście toksyczności alachloru w zasolonym środowisku.

Zasolenie w centralnej części Bałtyku wynosi 7 do 8 g/l, natomiast w części zachodniej (cieśnina Kattengat) osiąga 16 do 18 g/l [Wiktor i in. 1997]. Mając to na uwadze, w dalszej części badań przeanalizowano biodegradację alachloru w obecności 8 oraz 16 g/l NaCl.



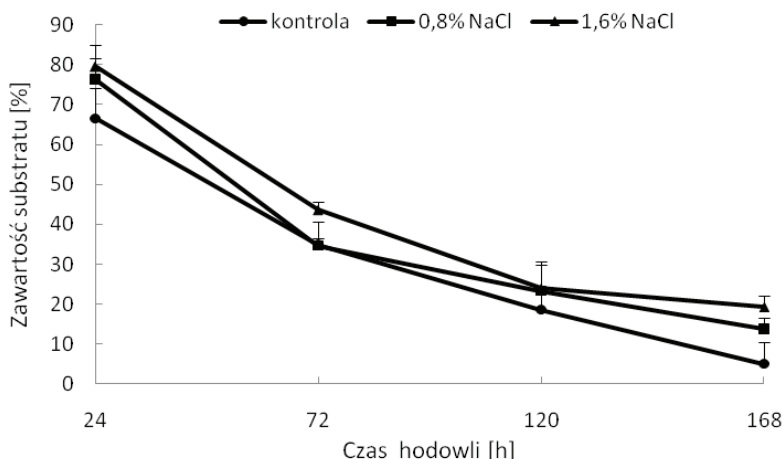
Rys. 4. Zdjęcia mikroskopowe wykonane ze 120 godzin hodowli *P. marquandii*: (A) kontrola oraz (B) hodowla prowadzona w obecności alachloru i NaCl (40 g/l)

Fig. 4. Photomicrographs of 120 h-old cultures of *P. marquandii*: (A) control and (B) culture supplemented with alachlor and NaCl (40 g/l)

Kinetyka degradacji alachloru w obecności NaCl (8 i 16 g/l) przebiegała podobnie jak w układzie kontrolnym, niezawierającym dodatku soli (rys. 5). Biorąc jednak pod uwagę ograniczony o blisko 50% przyrost biomasy w układzie zawierającym herbicyd i NaCl (rys. 3), można wnosić, że zdolność degradacyjna grzyba (w przeliczeniu na jednostkę suchej masy) znacznie wzrosła (z 3,66 mg substratu na 1 g do 4,91 mg/g).

W środowisku naturalnym NaCl występuje powszechnie, a nie tylko w środowisku morskim i w zależności od stężenia może mieć wpływ na aktywność degradacyjną drobnoustrojów. Mikroskopowy grzyb strzępkowy *Cunninghamella elegans* rozkłada szybciej tributylowy (TBT) w podłożu zawierającym 14 g/l NaCl niż w podłożu bez dodatku soli. Procesowi

temu towarzyszy również mniejsze nagromadzenie toksycznego produktu pośredniego: dibutylocyny (DBT) i zwiększenie zawartości praktycznie nietoksycznego końcowego produktu rozkładu – monobutylocyny (MBT) [Bernat i Długoński 2005].



Rys. 5. Wpływ różnych stężeń NaCl na ubytek alachloru z hodowli *P. marquandii*

Fig. 5. Influence of different concentrations of NaCl on alachlor depletion from *P. marquandii* cultures

PODSUMOWANIE

Przedstawione w poprzednim rozdziale dane wyraźnie wskazują, że w warunkach silnie toksycznego oddziaływania zanieczyszczeń grzyby mikroskopowe uruchamiają mechanizmy pozwalające na odtoksyczenie środowiska i eliminację czynników ograniczających ich przetrwanie w skażonym środowisku.

Analiza przedstawionych wyników pozwala sądzić, że mikroskopowy grzyb strzępkowy *P. marquandii* IM 6003 zachowuje zdolność do rozkładu alachloru w niekorzystnych warunkach, jakimi są: ograniczona dostępność tlenu i skojarzone działanie alachloru oraz NaCl i może być z powodzeniem wykorzystany do eliminacji toksycznego herbicydu w środowiskach charakteryzujących się zwiększonym stopniem zasolenia.

PIŚMIENNICTWO I AKTY PRAWNE

- BERNAT P., DŁUGOŃSKI J. 2005. Przekształcanie TBT przy udziale grzyba mikroskopowego *Cunninghamella elegans* w obecności NaCl. Inżynieria i Aparatura Chemiczna 4: 7–9.
- CELIS E., ELEFSINIOTIS P., SINGHAL N. 2008. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. Water Research 42: 3218–3224.

- CHANG H.S., CHOO K.H., LEE B., CHOI S.J. 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials* 172: 1–12.
- CHIRNSIDE A.E.M., RITTER W.F., RADOSEVICH M. 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide – contaminated mix – load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 3056–3065.
- Dyrektywa Parlamentu i Rady Europejskiej 2008/105/EC z dnia 16 grudnia 2008 r.** Oficjalne Czasopismo Unii Europejskiej L 348/84, 24.12.2008.
- FAVA L., BOTTONI P., CROBE A., FUNARI E. 2000. Leaching properties of some degradation products of alachlor and metolachlor. *Chemosphere* 41: 1503–1508.
- HLADIK M.L., BOUWER E.J., ROBERTS A.L. 2008. Neutral degradates of chloroacetamide herbicides: Occurrence in drinking water and removal during conventional water treatment. *Water Research*, 42: 4905–4914.
- HLADIK M.L., ROBERTS A.L., BOUWER E.J. 2005. Removal of neutral chloroacetamide herbicide degradates during simulated unit processes for drinking water treatment. *Water Research*. 39: 5033–5044.
- POTHULURI J.V., FREEMAN J.P., EVANS F.E., MOORMAN T.B., CERNIGLIA C.E. 1997. Metabolism of alachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 483–488.
- QIANG Z., LIU CH., DONG B., ZHANG Y. 2010. Degradation mechanism of alachlor during direct ozonation and O₃/H₂O₂ advanced oxidation process. *Chemosphere* 78: 517–526.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 2 lipca 2010.** (Dz.U. Nr 138, poz. 934: 11165–11166).
- SŁABA M., DŁUGOŃSKI J. 2004. Zinc and lead uptake by mycelium and regenerating protoplasts of *Verticillium marquandii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 323–328.
- SŁABA M., SZEWCZYK R., BERNAT P., DŁUGOŃSKI J. 2009. Simultaneous toxic action of zinc and alachlor resulted in enhancement of zinc uptake by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii*. *Science of the Total Environment*. 407: 4127–4133.
- SŁABA M., WROŃSKA N., FELCZAK A., DŁUGOŃSKI J. 2010. Zastosowanie grzyba strzępkowego *Paecilomyces marquandii* do jednoczesnej eliminacji cynku i związków cynoorganicznych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 42: 62–71.
- STAMPER D.M., TUOVINEN O.H. 1998. Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor and propachlor. *Critical Reviews in Microbiology* 24: 1–22.
- TESSIER D.M., CLARK J.M. 1995. Quantitative assessment of the mutagenic potential of environmental degradative products of alachlor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2504–2512.
- WIKTOR K., WĘCŁAWSKI J.M., ŻMIJEWSKA M.I. 1997. *Biogeografia Morza*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.