

ЭКОЛОГИЯ/ECOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13>БИОДЕГРАДАЦИЯ ХЛОРАЦЕТАМИДНОГО ГЕРБИЦИДА БУТАХЛОРА ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ
TRAMETES HIRSUTA LE-BIN 072

Научная статья

Лукин А.С.¹, Берлина А.Н.², Федорова Т.В.^{3,*}¹ORCID : 0009-0000-3480-3686;²ORCID : 0000-0002-3761-7472;³ORCID : 0000-0002-0355-6800;^{1, 2, 3}Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (fedorova_tv[at]mail.ru)

Аннотация

Бутахлор — хлорацетамидный довсходовый гербицид с периодом полураспада до 29 дней, сохраняется в окружающей среде, оказывая токсическое воздействие на живые организмы. В рамках исследования была проведена оценка способности гриба белой гнили *Trametes hirsuta* к биодеструкции бутахлора. Показано, что на 10 сутки инкубирования грибных пеллет остаточное содержание гербицида в культуральной среде составляло менее 5% от исходного содержания (200 мг/л). Анализ активностей лигнолитических ферментов показал, что внесение бутахлора в среду культивирования индуцировало секрецию грибом как лакказы, так и различных грибных пероксидаз II класса — Mn-зависимых пероксидаз (MnP) и Mn-независимых пероксидаз (лигнин пероксидазы LiP, универсальной пероксидазы VP). Индукция лигнолитических пероксидаз была выше, чем лакказы — активность возрастала в 9 и 15 раз, достигая значений 400 и 35 Ед/мл для Mn-зависимых и Mn-независимых пероксидаз соответственно. При этом максимальная активность лакказы (120 Ед/мл) детектировалась на 3-и сутки инкубирования, тогда как максимальная активность пероксидаз наблюдалась на 5–7-й день. В конце культивирования грибных пеллет с гербицидом (15 сутки) по данным ИФА в культуральной среде обнаруживался конкурентный метаболит. Продукты деструкции бутахлора по данным *in vitro* тестирования с использованием коммерческого набора XenoScreen XL YES Assay kit эстрогенной активностью не обладали.

Ключевые слова: гербициды, бутахлор, биодеструкция, гриб белой гнили *Trametes hirsuta*, лигнолитические ферменты.

BIODEGRADATION OF THE CHLORACETAMIDE HERBICIDE BUTACHLOR BY THE WHITE-ROT FUNGUS
TRAMETES HIRSUTA LE-BIN 072

Research article

Lukin A.S.¹, Berlina A.N.², Fedorova T.V.^{3,*}¹ORCID : 0009-0000-3480-3686;²ORCID : 0000-0002-3761-7472;³ORCID : 0000-0002-0355-6800;^{1, 2, 3}Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (fedorova_tv[at]mail.ru)

Abstract

Butachlor is a chloracetamide pre-emergence herbicide with a half-life of up to 29 days, which persists in the environment and has a toxic effect on living organisms. The study evaluated the ability of the white rot-fungus *Trametes hirsuta* to biodegrade butachlor. It was shown that on the 10th day of incubation of fungal pellets, the residual herbicide content in the culture medium was less than 5% of the initial content (200 mg/l). Analysis of lignolytic enzyme activities showed that the addition of butachlor to the culture medium induced the secretion of both laccase and various class II fungal peroxidases — Mn-dependent peroxidases (MnP) and Mn-independent peroxidases (lignin peroxidase LiP, universal peroxidase VP). The induction of lignolytic peroxidases was higher than that of laccase — activity increased 9- and 15-fold, reaching values of 400 and 35 U/ml for Mn-dependent and Mn-independent peroxidases, respectively. The maximum activity of laccase (120 U/ml) was detected on the third day of incubation, while the maximum activity of peroxidases was observed on the fifth to seventh day. At the end of the cultivation of fungal pellets with herbicide (day 15), a competitive metabolite was detected in the culture medium according to ELISA data. According to *in vitro* testing using the commercial XenoScreen XL YES Assay kit, the products of butachlor degradation did not exhibit estrogenic activity.

Keywords: herbicides, butachlor, biodegradation, *Trametes hirsuta* white-rot fungus, lignolytic enzymes.

Введение

Широкое использование пестицидов в современном сельском хозяйстве не только обеспечило высокую и стабильную урожайность агрокультур, но и привело к попаданию в окружающую среду множества токсичных веществ, загрязняя почву, воду и сельскохозяйственную продукцию. Гербициды являются одним из наиболее широко используемых типов пестицидов, на долю которых приходится около 50% международного рынка пестицидов и которые используются для избирательного уничтожения или подавления роста растений.

Гербициды из химического класса хлорацетанилидов (или хлорацетамидов) (рис. 1) благодаря широкому спектру гербицидных свойств и низкой стоимости, широко применяются для борьбы с однолетними злаковыми и некоторыми двудольными сорняками в посевах многих культур, таких как рапс, подсолнечник, соя, кукуруза и свекла [1], [2]. Они вносятся на почву до всходов культуры (с заделкой или без), защищая посевы от сорняков в течение длительного времени. Это обеспечивает эффективную борьбу с сорной растительностью на ранних стадиях роста культурных растений. Эти селективные и системные гербициды подавляют синтез длинноцепочечных жирных кислот, предотвращая нормальный рост проростков сорняков [2].

Ацетохлор и бутахлор являются также очень популярными гербицидами в Азии с нормой расхода около $4,5 \times 10^7$ кг в год [3], [4] при рекомендуемой дозировке 3000 мл га^{-1} [5]. На Индию приходится около $6,75 \times 10^6$ кг годового использования бутахлора [6]. S-метолахлор применяется в России как селективный довсходовый почвенный гербицид для борьбы с однолетними злаковыми и некоторыми двудольными сорняками на посевах таких культур, как кукуруза, подсолнечник, соя, сахарная свекла, рапс и капуста [7]. В сельском хозяйстве США в 2021 г. было использовано 41,7 млн фунтов ацетохлора согласно данным Министерства сельского хозяйства США (USDA) [8].

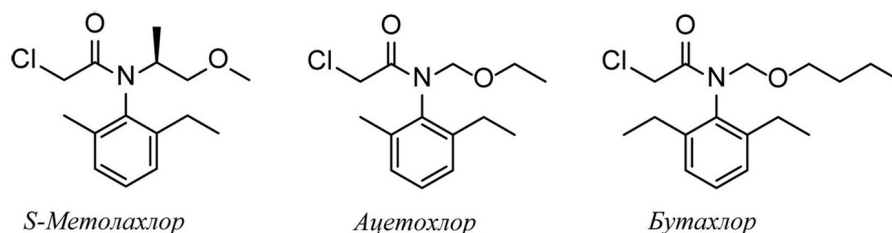


Рисунок 1 - Гербициды из химического класса хлорацетамидов

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.1>

Попадая в почву, хлорацетамиды не только вызывают изменения физических и химических свойств почвы, но и оказывают острое токсическое воздействие на рост бактерий в почве, что приводит к ухудшению состояния почв, снижению их устойчивости и буферной способности [8], [9], [10]. Предполагается, что данные гербициды канцерогены по своей природе. Так, бутахлор вызывает злокачественную трансформацию *in vitro*, стимулируя пролиферацию клеток, митохондриальную дисфункцию, хромосомные разрывы, окислительное повреждение ДНК [11] и нарушает работу эндокринной системы [12]. Известно также, что бутахлор является нейротоксином [13] и замедляет рост дождевых червей [14]. Агентство по охране окружающей среды США (EPA) классифицировало ацетохлор как канцероген группы B2 [15].

В связи с вызываемыми неблагоприятными эффектами на окружающую среду и здоровье человека удаление хлорацетамидов из почвы и воды стало ключевым направлением современных исследований. Хотя для обработки пестицидов доступны различные химические и физические процессы, такие как фотоокисление, химический гидролиз и адсорбция, более эффективным подходом являются недорогие и экологически безопасные технологии биоремедиации [3], [16]. Использование биологических методов удаления пестицидов способствуют также восстановлению качества почвы и повышают ее плодородие [17].

Биоремедиация, опосредованная грибами, или микоремедиация, является инновационной многообещающей технологией очистки окружающей среды от экотоксикантов, благодаря своей экономической эффективности, экологичности и универсальности [18]. В последние годы детоксикация загрязненных земельных и водных ландшафтов путем применения одного или нескольких видов грибов в качестве природных агентов привлекает внимание ученых как эффективный инструмент для восстановления окружающей среды. По сравнению с другими микроорганизмами, грибы могут не только быстро поглощать ксенобиотики и выживать в условиях с недостаточным содержанием питательных веществ, кислых значениях pH, низком содержании воды, но и продуцировать различные внеклеточные ферменты, которые могут взаимодействовать с различными поллютантами с высокой степенью неспецифичности. Таким образом, разнообразие грибов и их способность вырабатывать широкий спектр специфических и неспецифических ферментов делают грибы идеальными кандидатами для борьбы с широким спектром загрязняющих веществ. Они могут быть эффективны в очистке *in situ* или *ex situ* от различных загрязняющих веществ, таких как тяжёлые металлы, красители, гербициды и фармацевтические препараты [19], [20], [21], [22].

В данной работе была проведена оценка способности гриба белой гнили *Trametes hirsuta* к биодеструкции хлорацетамидных гербицидов на примере бутахлора.

Методы и принципы исследования

Пеллеты гриба белой гнили *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 из Коллекции культур базидиомицетов LE-BIN Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (Санкт-Петербург, Россия) культивировали на минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0.6; K_2HPO_4 — 0.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; CaCl_2 — 0.05; MnSO_4 — 0.05; ZnSO_4 — 0.001; FeSO_4 — 0.0005; NaNO_3 — 3.0; глюкоза — 10.0. Перед внесением грибных пеллет (из расчета 10 г сырой биомассы на 100 мл ростовой среды) в опытные колбы добавляли бутахлор в концентрации 200 мг/л, инкубировали в течение 15 суток на роторной качалке при 100 об./мин и 25°C. В ходе инкубации проводился отбор проб культуральной среды, в которых определяли остаточное содержание бутахлора и активность лигнолитических ферментов.

Определение остаточного содержания бутахлора (N-(бутоксиметил)-2-хлор-N-(2,6-диэтилфенил)ацетамид) в ростовой среде в процессе инкубации грибных пеллет (рис. 2) проводили методом ВЭЖХ и конкурентного ИФА, для чего готовили экстракты образцов культуральной жидкости на разных стадиях культивирования гриба и деградации бутахлора в дихлорметане (ДХМ) — 1:1 (об./об.). Затем экстракты упаривали, осадок перерастворяли в эквивалентном объеме 10 мМ ФБС с 20% метанола, далее растворы либо разбавляли 10 мМ ФБС с 20% метанола в 10 раз, либо использовали неразбавленными. ИФА проводился по методике [23] с модификациями.

Для проведения ИФА конъюгат БСА и производным бутахлора с концентрацией 1.0 мкг/мл в 10 мМ ФБС сорбировали в лунки микропланшета в течение ночи при 4°C. Затем микропланшет три раза промывали ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (ФБСТ). После стадии иммобилизации и промывки микропланшета в лунки вносили 50 мкл растворов бутахлора в соответствующей среде — либо 10 мМ ФБС с 20% метанола (концентрации в диапазоне 20000–0.12 и 0 нг/мл), либо восстановленной в том же буфере пробы, а также 50 мкл антисыворотки (разведение 1:9000). Концентрации и разведения конечные в лунках. Затем микропланшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки ФБСТ добавляли антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (разведение препарата 1:3000). После промывки (три раза ФБСТ и один раз дистиллированной водой) определяли активность ферментной метки, связавшейся с носителем, добавляя 100 мкл раствора субстрата (коммерческий раствор ТМБ+H₂O₂) и останавливая реакцию через 15 мин добавлением 50 мкл 0.1 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 450 нм и строили график зависимости оптической плотности от концентрации бутахлора с использованием программного обеспечения Origin 9.0 (OriginLab, США).

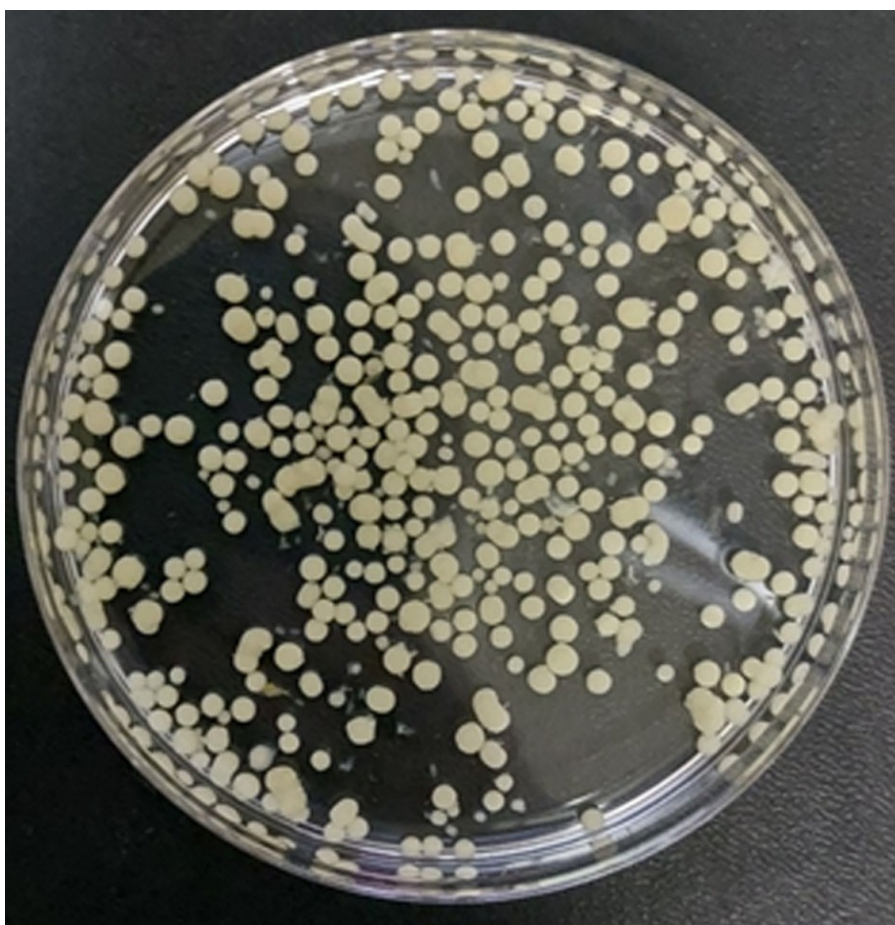


Рисунок 2 - Фото грибных пеллет гриба белой гнили *Trametes hirsuta*
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.2>

Активность лигнолитических ферментов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (США). Активность лакказы (КФ 1.10.3.2) определяли при длине волны $\lambda=436$ нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5, как описано в работе [24] с использованием раствора 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо-кислоты) диаммониевой соли (АБТС) в качестве хромогенного субстрата. Мп-зависимую пероксидазную активность (MnP, КФ 1.11.1.13) оценивали с применением в качестве субстрата 1 мМ раствора MnSO₄ в 0.1 М натрий-тарtratном буфере, pH 3.0 (измерения при длине волны $\lambda=238$ нм). Мп-независимую пероксидазную активность (лигнин пероксидаза LiP, КФ 1.11.1.14 и универсальная пероксидаза VP, КФ 1.11.1.16) оценивали с применением в качестве субстрата 100 мМ раствора вератрового спирта в 0.1 М натрий-тарtratном буфере, pH 5.0 (измерения при длине волны $\lambda=310$ нм). Определение пероксидазных активностей проводили в присутствии 0.1 мМ пероксида водорода в реакционной смеси [25]. За условную единицу ферментативной активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Анализ эстрогенной активности метаболитов бутахлора *in vitro* проводили с использованием коммерческого набора XenoScreen XL YES Assay kit (Xenometrix, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. В тесте YES используется рекомбинантный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащий плазмиду с рецептором человеческого эстрогена hER α , связанным с геном *lacZ*, который кодирует β -галактозидазу [26]. Затем реакция на химическое вещество или смесь измеряется с помощью субстрата для β -галактозидазы, продукт которой приводит к цветному или флуоресцентному сигналу. Взаимодействие рецептора hER α с молекулой лиганда модулирует транскрипцию репортерного гена *lacZ* и продукцию β -галактозидазы, которая, взаимодействуя с субстратом (хлорфенол красный- β -D-галактопиранозид, CPRG) приводит к образованию окрашенных продуктов. Измеряемая оптическая плотность при длине волны 570 нм напрямую коррелирует с количеством секретируемой β -галактозидазы и, следовательно, с активностью тестируемого вещества, связывающегося с рецептором эстрогена hER α .

Все эксперименты проводились в 3-х биологических повторах и с использованием соответствующих градуировочных кривых.

Основные результаты

Была изучена способность дереворазрушающего гриба белой гнили *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 к биодеструкции гербицида бутахлора. Рекомендуемая полевая доза внесения хлорацетамидных гербицидов составляет 5–10 мг/кг [27], [28]. В соответствии с литературными данными [29], [30], в предварительном эксперименте по влиянию гербицида на рост грибной биомассы были взяты следующие концентрации бутахлора — 10 мг/л (1 \times), 50 (5 \times), 100 (10 \times) и 200 (20 \times) мг/л. Результаты эксперимента показали, что даже при 20-ти кратном увеличении рекомендуемой дозы рост гриба не ингибировался. Количество сырой биомассой в конце инкубации (15 суток) было сопоставимо с таковой при культивировании грибных пеллет на контрольной среде без гербицида и составляло около 100 г/л сырой биомассы. Действительно, в условиях полевых экспериментов было продемонстрировано, что при внесении в почву 10-и кратных норм применения различных пестицидов (как в смеси, так и по отдельности), численность представителей отдела Basidiomycota в грибных сообществах увеличивалась, то есть ингибирующий эффект на рост базидиомицетов отсутствовал [31]. В дальнейших экспериментах по изучению биодеструкции гербицида грибом *T. hirsuta* концентрация бутахлора в ростовой среде составляла 200 мг/л.

В процессе инкубирования грибных пеллет отбирали образцы культуральной жидкости (КЖ) и определяли в них концентрацию бутахлора с использованием двух независимых аналитических методов — ВЭЖХ и ИФА (рис. 3 и 4).

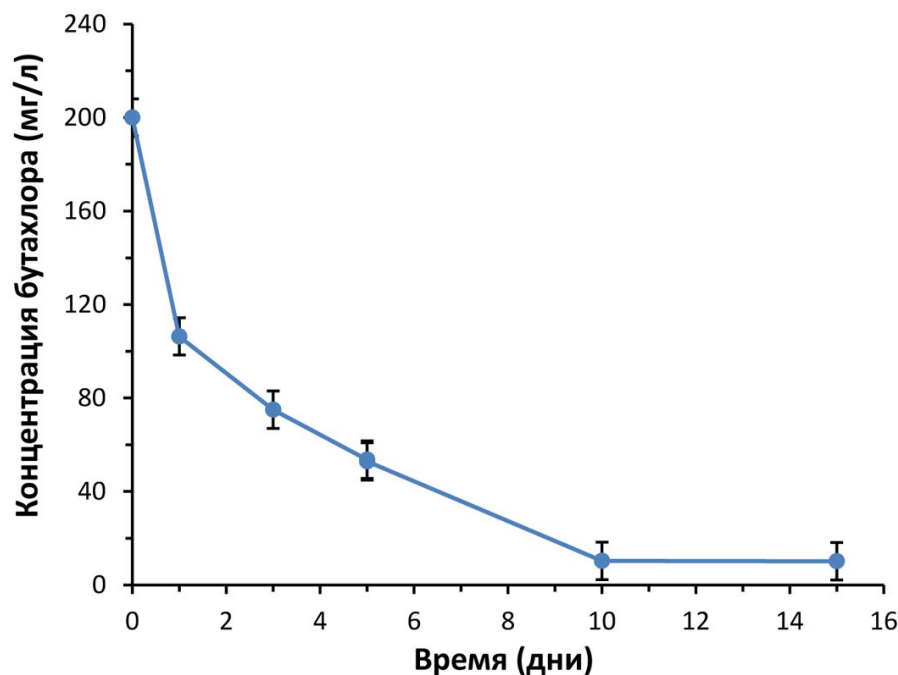


Рисунок 3 - Динамика убыли содержания бутахлора в образцах культуральных жидкостей, отобранных в разные дни инкубирования пеллет *Trametes hirsuta*. Концентрация бутахлора определена методом ВЭЖХ
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.3>

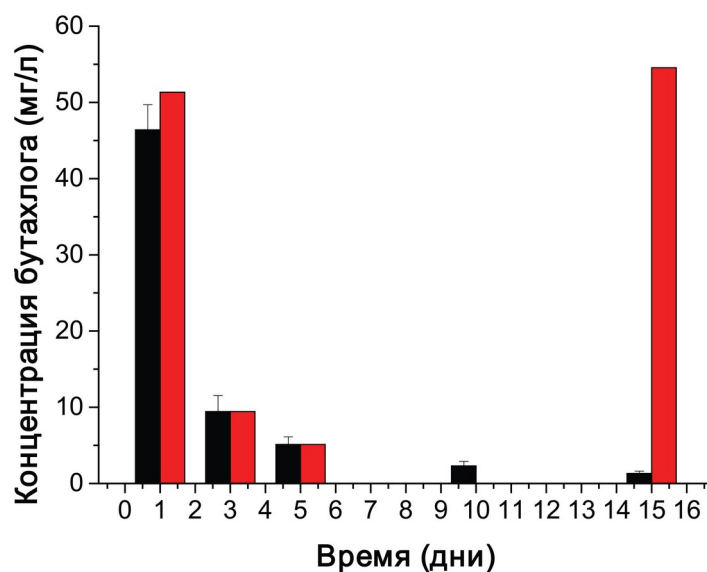


Рисунок 4 - Гистограмма, демонстрирующая убыль бутахлора в образцах культуральных жидкостей (черные столбцы) и возрастание количества конкурирующего в ИФА продукта деградации бутахлора (красные столбцы)
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.4>

Данные, представленные на рисунках 3 и 4, демонстрируют зависимость концентрации бутахлора от продолжительности инкубации грибных пеллет. В первые 5 дней культивирования базидиомицета *T. hirsuta* на среде с бутахлором видно характерное и закономерное убывание концентрации гербицида, измеренное как методом ВЭЖХ, так и ИФА. Однако при использовании метода ИФА в последующие дни культивирования в пробах КЖ детектируется конкурентное взаимодействие (рис. 4), связанное, вероятнее всего, с образованием продукта деструкции бутахлора, способного взаимодействовать с антителами и выступать в роли конкурента за центры связывания антител наравне с исходным бутахлором. Полученные данные ВЭЖХ и ИФА тестирования концентрации бутахлора в пробах КЖ были сравнены (рис. 5). Видно, что за счет обнаруженных артефактов исследования, а именно появления конкурирующего агента в результате грибной деградации бутахлора, не наблюдается абсолютной корреляции результатов между двумя данными аналитическими методами (коэффициент Пирсона не превышает значение 0,7209).

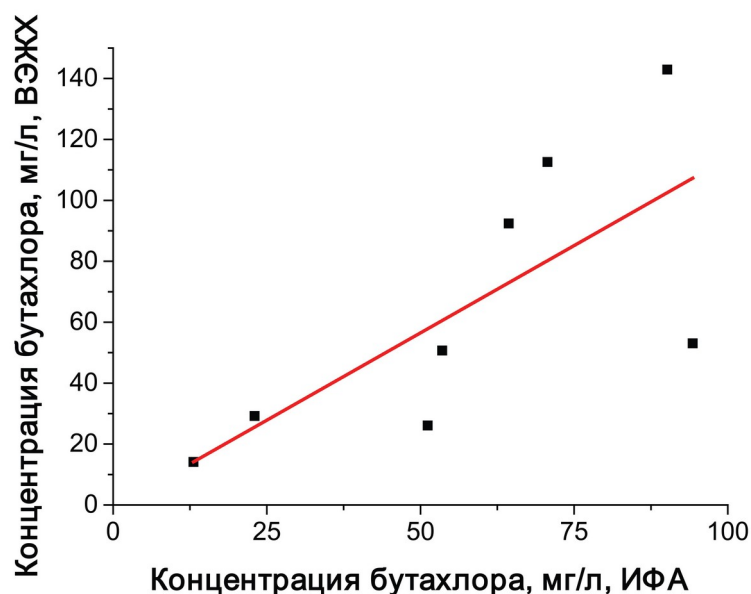


Рисунок 5 - Корреляционная кривая, полученная по результатам тестирования проб, полученных методами ВЭЖХ и ИФА

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.5>

Поскольку хорошо известно, что метаболиты хлорацетамидных гербицидов могут обладать эстрогенной активностью [32], нами было проведено определение таковой в образцах КЖ на разные сутки культивирования с использованием набора XenoScreen XL YES Assay kit. Полученные результаты показали, что детектируемый с помощью ИФА метаболит бутахлора не обладал эстрогенной активностью.

Динамика изменения активностей лигнолитических ферментов в процессе инкубирования грибных пеллет на контрольной минеральной среде и на этой же среде с внесением бутахлора представлена на рисунке 6. Показано, что внесение бутахлора в среду культивирования сильно индуцировало секрецию как лакказы, так и грибных пероксидаз — Mn-зависимых пероксидаз (MnP) и Mn-независимых пероксидаз. По сравнению с лакказами, индукция лигнолитических пероксидаз была выше — активность возрастала в 9 и 15 раз для MnP и Mn-независимых пероксидаз соответственно. При этом максимальная активность лакказы детектировалась на 3-й сутки культивирования, тогда как максимальная активность пероксидаз наблюдалась на 5–7-й день.

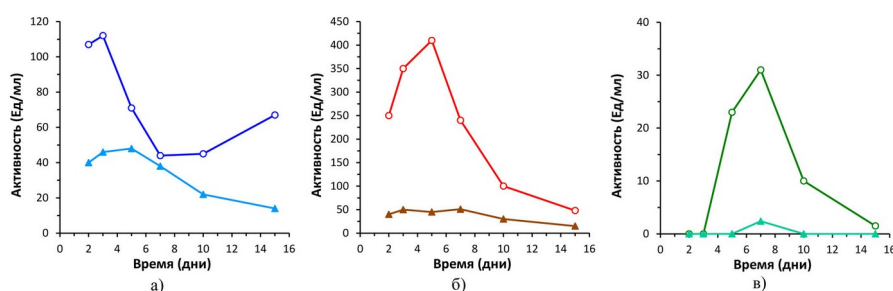


Рисунок 6 - Динамика ферментативных активностей в культуральной среде гриба *Trametes hirsuta*: а – лакказная активность (субстрат АБТС); б – активность Mn-зависимых пероксидаз (субстрат Mn^{2+}); в – активность Mn-независимых пероксидаз (субстрат вератровый спирт)

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2025.64.13.6>

Обсуждение

С использованием 2-х аналитических методов ВЭЖХ и конкурентного ИФА показано, что содержание бутахлора в культуральной среде снижается более эффективно в первые 2 дня инкубирования грибных пеллет *T. hirsuta* (рис. 3 и 4), что может быть связано с эффективной сорбцией бутахлора на грибном мицелии в первые сутки культивирования. Последующее более медленное снижение содержания бутахлора в образцах КЖ может быть опосредовано секрецией грибом лигнолитических ферментов (рис. 6), участвующих в биодegradации гербицида. Так, на 3-и сутки инкубирования отмечено значительное возрастание активности лакказы на среде с бутахлором (рис. 6а). Недавно было высказано предположение, что лакказа может играть значительную роль в деградации как бутахлора, так и других хлорацетамидных гербицидов [33]. Дальнейшее инкубирование грибных пеллет в присутствии гербицида приводило к

значительной индукции пероксидазной активности (рис. 6б и 6в). Аналогичная динамика ферментативных активностей *T. hirsuta* была продемонстрирована при биодegradации грибом соединения эфира фталевой кислоты DiBP [34]. При этом анализ секретомов гриба *T. hirsuta* показал увеличение продукции основных ферментов лигнолитического комплекса гриба, таких как лакказы и грибные пероксидазы II класса, в том числе MnP, LiP и VP [34]. Хорошо известно, что ферменты лигнолитического комплекса грибов участвуют в деструкции различных ксенобиотиков, как-то полиароматические углеводороды ПАУ, различные красители и антибиотики, эфиры фталевой кислоты и ряд других [35]. Ранее было показано, что лигнолитические ферменты гриба *T. hirsuta* участвуют в биодegradации красителя RBBR [36], эфиров фталевой кислоты [34], [37].

В конце инкубирования (на 15 сутки) наблюдался эффект, при котором по результатам ВЭЖХ анализа бутахлор в КЖ содержался в следовых количествах (рис. 3), однако по данным ИФА наблюдалась выраженная конкуренция за связывание антител (рис. 4). Вероятно, в результате дегradации бутахлора грибом *T. hirsuta* в культуральной среде образуется конкурирующий метаболит, распознаваемый антителами. До недавнего времени было известно только о трёх штаммах почвенных грибов (*Fusarium solani* и *F. oxysporum*, *Chaetomium globosum*) способных разлагать бутахлор [38]. Процессы разложения бутахлора почвенными грибами в основном включают дехлорирование, гидроксирование, дегидрирование, дебутоксиметилирование, деалкилирование и циклизацию. Среди образующихся метаболитов были обнаружены 2-хлор-*N*-(2,6-диэтилфенил)-*N*-метилацетами; 2-хлор-*N*-(2,6-диэтилфенил)ацетамид; *N*-(2,6-диэтилфенил)ацетамид; 2,6-диэтиланилин и др.

Тестирование *in vitro* показало отсутствие эстрогенной активности в образцах КЖ после биодеструкции. Необходимо проведение дальнейшего более детального изучения механизма биодеструкции хлорацетамидных гербицидов грибом белой гнили *T. hirsuta*.

Заключение

Доказано, что микроорганизмы и их ферменты эффективны в биодegradации хлорацетамидных гербицидов, включая бутахлор. В некоторых исследованиях изучались пути микробной дегradации бутахлора, но механизмы его дегradации всё ещё требуют дальнейшего систематического изучения, в особенности, что касается грибных генов и ферментов, связанных с дегradацией данного гербицида. В настоящем исследовании показано, что дереворазрушающий гриб белой гнили *Trametes hirsuta* способен эффективно разрушать бутахлор. В процессе биодеструкции задействован комплекс лигнолитических ферментов гриба, таких как лакказы и пероксидазы. Образующиеся при этом метаболиты бутахлора не обладают эстрогенной активностью.

Финансирование

Данная работа была поддержана Российским Научным Фондом, проект № 23-46-00018.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

This work was supported by the Russian Science Foundation, project № 23-46-00018.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Wang S. Physiological, biochemical and growth responses of Italian ryegrass to butachlor exposure. / S. Wang, H. Li, C. Lin // Pesticide Biochemistry and Physiology. — 2013. — Vol. 106. — № 1-2. — P. 21–27. — DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.03.007
2. Abigail M.E.A. Addressing the environmental impacts of butachlor and the available remediation strategies: a systematic review. / M.E.A. Abigail, S.M. Samuel, C. Ramalingam // International Journal of Environmental Science and Technology. — 2015. — Vol. 12. — № 12. — P. 4025–4036. — DOI: 10.1007/s13762-015-0866-2
3. Gao Y. Characterization of a Novel Butachlor Biodegradation Pathway and Cloning of the Debutoxylase (Dbo) Gene Responsible for Debutoxylation of Butachlor in *Bacillus* sp. hys-1. / Y. Gao, L. Jin, H. Shi et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 2015. — Vol. 63. — № 38. — P. 8381–8390. — DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03326
4. Singh J. Prospecting *Ammoniphilus* sp. JF isolated from agricultural fields for butachlor degradation. / J. Singh, Y.K. Nandabalan // 3 Biotech. — 2018. — Vol. 8. — № 3. — P. 164. — DOI: 10.1007/s13205-018-1165-7
5. Alla M.N. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. / M.N. Alla, A.M. Badawi, N.M. Hassan et al. // Pesticide Biochemistry and Physiology. — 2008. — Vol. 90. — № 1. — P. 8–18. — DOI: 10.1016/j.pestbp.2007.07.003
6. Verma J.P. Pesticide relevance and their microbial degradation: a state-of-art. / J.P. Verma, D.K. Jaiswal, R. Sagar // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. — 2014. — Vol. 13. — № 4. — P. 429–466. — DOI: 10.1007/s11157-014-9341-7
7. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Ч. I. Пестициды / Официальное издание. — М., 2019. — С. 335–636.
8. Lu A. A comparative review and computational assessment of acetochlor toxicity in fish: a novel endocrine disruptor?. / A. Lu, E. Ivantsova, C.J. Martyniuk // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. — 2023. — Vol. 271. — P. 109685. — DOI: 10.1016/j.cbpc.2023.109685

9. Lu T. A risk entropy approach for linking pesticides and soil bacterial communities. / T. Lu, C.T. Lei, M.Y. Gao et al. // Journal of Hazardous Materials. — 2024. — Vol. 469. — P. 133970. — DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.133970
10. Zhang C. Insight into the soil aggregate-mediated restoration mechanism of degraded black soil via biochar addition: Emphasizing the driving role of core microbial communities and nutrient cycling. / C. Zhang, X. Zhao, A.J. Liang et al. // Environmental Research. — 2023. — Vol. 228. — P. 115895. — DOI: 10.1016/j.envres.2023.115895
11. Dwivedi S. Butachlor induced dissipation of mitochondrial membrane potential, oxidative DNA damage and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells. / S. Dwivedi, Q. Saquib, A.A. Al-Khedhairi et al. // Toxicology. — 2012. — Vol. 302. — № 1. — P. 77–87. — DOI: 10.1016/j.tox.2012.07.014
12. Chang J. Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). / J. Chang, S. Liu, S. Zhou et al. // Experimental and Toxicologic Pathology. — 2013. — Vol. 65. — № 1-2. — P. 205–209. — DOI: 10.1016/j.etp.2011.08.007
13. Liu W.Y. Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. / W.Y. Liu, C.Y. Wang, T.S. Wang et al. // Ecotoxicology. — 2011. — Vol. 20. — № 2. — P. 377–384. — DOI: 10.1007/s10646-010-0589-6
14. Muthukaruppan G. Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. / G. Muthukaruppan, S. Janardhanan, G. Vijayalakshmi // Journal of Soils and Sediments. — 2005. — Vol. 5. — № 2. — P. 82–86. — DOI: 10.1065/jss2004.09.111
15. Dou R. Contamination of pyrethroids and atrazine in greenhouse and open-field agricultural soils in China. / R. Dou, J.T. Sun, F.C. Deng et al. // Science of The Total Environment. — 2020. — Vol. 701. — P. 134916. — DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134916
16. Kaur R. Toxicity and degradation of the insecticide monocrotophos. / R. Kaur, D. Goyal // Environmental Chemistry Letters. — 2019. — Vol. 17. — № 3. — P. 1299–1324. — DOI: 10.1007/s10311-019-00884-y
17. Lin Z. Effects of two ecological earthworm species on tetracycline degradation performance, pathway and bacterial community structure in laterite soil. / Z. Lin, Z. Zhen, S.W. Luo et al. // Journal of Hazardous Materials. — 2021. — Vol. 412. — P. 125212. — DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125212
18. Akhtar N. Mycoremediation: expunging environmental pollutants. / N. Akhtar, M.A. Mannan // Biotechnology Reports. — 2020. — Vol. 26. — P. e00452. — DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00452
19. Chen L. Removal of heavy-metal pollutants by white rot fungi: Mechanisms, achievements, and perspectives. / L. Chen, X. Zhang, M. Zhang et al. // Journal of Cleaner Production. — 2022. — Vol. 354. — P. 131681. — DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.131681
20. Daâssi D. Fungal consortia mediated bio-treatment of organic matter and metals uptake from sewage water: Maize agro-physiological assessment. / D. Daâssi, A.N. Hajaji, L.J.H. Alssulime et al. // Catalysts. — 2024. — Vol. 14. — № 4. — P. 257. — DOI: 10.3390/catal14040257
21. Swathy K. Biodegradation of pesticide in agricultural soil employing entomopathogenic fungi: Current state of the art and future perspectives. / K. Swathy, P. Vivekanandhan, A. Yuvaraj et al. // Heliyon. — 2023. — Vol. 10. — № 1. — P. e23406. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23406
22. Akrouit I. Valorizing fungal diversity for the degradation of fluoroquinolones. / I. Akrouit, K. Staita, H. Zouari-Mechichi et al. // Heliyon. — 2024. — Vol. 10. — № 10. — P. e30611. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30611
23. Berlina A.N. Influence of organic solvents on the results of immunoenzyme determination of herbicide butachlor: selection of sample preparation modes. / A.N. Berlina, N.I. Smirnova, N.S. Komova et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2024. — Vol. 60. — № 4. — P. 776–783. — DOI: 10.1134/S0003683824604359
24. Savinova O.S. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: twins with different faces. / O.S. Savinova, K.V. Moiseenko, E.A. Vavilova et al. // Biochimie. — 2017. — Vol. 142. — P. 183–190. — DOI: 10.1016/j.biochi.2017.09.013
25. Savinova O.S. Peroxidase of *Trametes hirsuta* LE-BIN 072: Purification, Characteristics, and Application for Dye Decolorization. / O.S. Savinova, T.V. Fedorova // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2024. — Vol. 60. — № 6. — P. 1209–1222. — DOI: 10.1134/S0003683824605730
26. Bergmann A. Estrogenic activity of food contact materials—evaluation of 20 chemicals using a yeast estrogen screen on HPTLC or 96-well plates. / A. Bergmann, E. Simon, A. Schifferli // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2020. — Vol. 412. — № 19. — P. 4527–4536. — DOI: 10.1007/s00216-020-02701-w
27. Zhang Y. Short-term response of soil enzyme activities and bacterial communities in black soil to a herbicide mixture: Atrazine and Acetochlor. / Y. Zhang, Y. Hu, N. An et al. // Applied Soil Ecology. — 2023. — Vol. 181. — P. 104652. — DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104652
28. Hou X. Response of acetochlor degradation and bacterial community in black soil to the application of vermicompost. / X. Hou, X. Wang, Y. Ou et al. // Biology and Fertility of Soils. — 2025. — Vol. 61. — № 1. — P. 13–26. — DOI: 10.1007/s00374-024-01867-0
29. Abd-Alrahman S.H. Bioremediation of Water Contaminated with Fenitrothion and Butachlor using Microorganisms Isolated from Soil. / S.H. Abd-Alrahman, Z.H. Zidan, M.I. Abdel-Megeed et al. // Journal of Pure and Applied Microbiology. — 2013. — Vol. 7. — P. 1757–1762.
30. Mohanty S.S. Degradation kinetics and mechanistic study on herbicide bioremediation using hyper butachlor-tolerant *Pseudomonas putida* G3. / S.S. Mohanty, H.M. Jena // Process Safety and Environmental Protection. — 2019. — Vol. 125. — P. 172–181. — DOI: 10.1016/j.psep.2019.03.014
31. Астайкина А.А. Влияние пестицидной нагрузки на микробное сообщество агродерново-подзолистого почвы. / А.А. Астайкина, Р.А. Стрелецкий, М.Н. Маслов и др. // Почвоведение. — 2020. — № 5. — С. 639–650. — DOI: 10.31857/S0032180X20050032

32. Ma T. Effects of Insecticide and Herbicides on Thyroid Disturbances in Zebrafish. / T. Ma, X. An, P. Wu et al. // *Toxics*. — 2024. — Vol. 12. — № 8. — P. 570. — DOI: 10.3390/toxics12080570
33. Wang S. Dose-Dependent Effects of Butachlor Accumulation and Degradation on Amino Acid Metabolism and Lignin Biosynthesis in Rice. / S. Wang, J. Chen, L. Zhu // *Environmental Pollution*. — 2025. — Vol. 382. — P. 126771. — DOI: 10.1016/j.envpol.2025.126771
34. Savinova O.S. Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta*. / O.S. Savinova, A.V. Shabaev, O.A. Glazunova // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2022. — Vol. 58. — № Suppl. 1. — P. S113–S125. — DOI: 10.1134/S0003683822100118
35. Torres-Farrad G. White rot fungi as tools for the bioremediation of xenobiotics: a review. / G. Torres-Farrad, S. Thijs, F. Rineau et al. // *Journal of Fungi*. — 2024. — Vol. 10. — № 3. — P. 167. — DOI: 10.3390/jof10030167
36. Glazunova O.A. Xenobiotic removal by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 activated carbon-based mycelial pellets: Remazol brilliant blue R case study. / O.A. Glazunova, K.V. Moiseenko, T.V. Fedorova // *Water*. — 2024. — Vol. 16. — № 1. — P. 133. — DOI: 10.3390/w16010133
37. Savinova O.S. Biodestruction of phthalic acid esters by white rot fungi. / O.S. Savinova, A.V. Shabaev, O.A. Glazunova // *Applied Biochemistry and Microbiology*. — 2022. — Vol. 58. — № 5. — P. 598–612. — DOI: 10.1134/S0003683822050143
38. Lin Z. Current insights into the microbial degradation for butachlor: strains, metabolic pathways, and molecular mechanisms. / Z. Lin, S. Pang, Z. Zhou // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2021. — Vol. 105. — № 11. — P. 4369–4381. — DOI: 10.1007/s00253-021-11346-3

Список литературы на английском языке / References in English

1. Wang S. Physiological, biochemical and growth responses of Italian ryegrass to butachlor exposure. / S. Wang, H. Li, C. Lin // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. — 2013. — Vol. 106. — № 1-2. — P. 21–27. — DOI: 10.1016/j.pestbp.2013.03.007
2. Abigail M.E.A. Addressing the environmental impacts of butachlor and the available remediation strategies: a systematic review. / M.E.A. Abigail, S.M. Samuel, C. Ramalingam // *International Journal of Environmental Science and Technology*. — 2015. — Vol. 12. — № 12. — P. 4025–4036. — DOI: 10.1007/s13762-015-0866-2
3. Gao Y. Characterization of a Novel Butachlor Biodegradation Pathway and Cloning of the Debutoxylase (Dbo) Gene Responsible for Debutoxylation of Butachlor in *Bacillus* sp. hys-1. / Y. Gao, L. Jin, H. Shi et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2015. — Vol. 63. — № 38. — P. 8381–8390. — DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03326
4. Singh J. Prospecting *Ammoniphilus* sp. JF isolated from agricultural fields for butachlor degradation. / J. Singh, Y.K. Nandabalan // *3 Biotech*. — 2018. — Vol. 8. — № 3. — P. 164. — DOI: 10.1007/s13205-018-1165-7
5. Alla M.N. Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings. / M.N. Alla, A.M. Badawi, N.M. Hassan et al. // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. — 2008. — Vol. 90. — № 1. — P. 8–18. — DOI: 10.1016/j.pestbp.2007.07.003
6. Verma J.P. Pesticide relevance and their microbial degradation: a state-of-art. / J.P. Verma, D.K. Jaiswal, R. Sagar // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. — 2014. — Vol. 13. — № 4. — P. 429–466. — DOI: 10.1007/s11157-014-9341-7
7. Gosudarstvennyj katalog pesticidov i agrohimiķatov, razreshennyh k primeneniyu na territorii Rossijskoj Federacii. Ch. I. Pesticidy [State Catalogue of Pesticides and Agrochemicals Permitted for Use in the Territory of the Russian Federation. Part 1. Pesticides] / Official Edition. — Moscow, 2019. — P. 335–636. [in Russian]
8. Lu A. A comparative review and computational assessment of acetochlor toxicity in fish: a novel endocrine disruptor?. / A. Lu, E. Ivantsova, C.J. Martyniuk // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. — 2023. — Vol. 271. — P. 109685. — DOI: 10.1016/j.cbpc.2023.109685
9. Lu T. A risk entropy approach for linking pesticides and soil bacterial communities. / T. Lu, C.T. Lei, M.Y. Gao et al. // *Journal of Hazardous Materials*. — 2024. — Vol. 469. — P. 133970. — DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.133970
10. Zhang C. Insight into the soil aggregate-mediated restoration mechanism of degraded black soil via biochar addition: Emphasizing the driving role of core microbial communities and nutrient cycling. / C. Zhang, X. Zhao, A.J. Liang et al. // *Environmental Research*. — 2023. — Vol. 228. — P. 115895. — DOI: 10.1016/j.envres.2023.115895
11. Dwivedi S. Butachlor induced dissipation of mitochondrial membrane potential, oxidative DNA damage and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells. / S. Dwivedi, Q. Saquib, A.A. Al-Khedhairy et al. // *Toxicology*. — 2012. — Vol. 302. — № 1. — P. 77–87. — DOI: 10.1016/j.tox.2012.07.014
12. Chang J. Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). / J. Chang, S. Liu, S. Zhou et al. // *Experimental and Toxicologic Pathology*. — 2013. — Vol. 65. — № 1-2. — P. 205–209. — DOI: 10.1016/j.etp.2011.08.007
13. Liu W.Y. Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. / W.Y. Liu, C.Y. Wang, T.S. Wang et al. // *Ecotoxicology*. — 2011. — Vol. 20. — № 2. — P. 377–384. — DOI: 10.1007/s10646-010-0589-6
14. Muthukaruppan G. Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. / G. Muthukaruppan, S. Janardhanan, G. Vijayalakshmi // *Journal of Soils and Sediments*. — 2005. — Vol. 5. — № 2. — P. 82–86. — DOI: 10.1065/jss2004.09.111
15. Dou R. Contamination of pyrethroids and atrazine in greenhouse and open-field agricultural soils in China. / R. Dou, J.T. Sun, F.C. Deng et al. // *Science of The Total Environment*. — 2020. — Vol. 701. — P. 134916. — DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134916

16. Kaur R. Toxicity and degradation of the insecticide monocrotophos. / R. Kaur, D. Goyal // Environmental Chemistry Letters. — 2019. — Vol. 17. — № 3. — P. 1299–1324. — DOI: 10.1007/s10311-019-00884-y
17. Lin Z. Effects of two ecological earthworm species on tetracycline degradation performance, pathway and bacterial community structure in laterite soil. / Z. Lin, Z. Zhen, S.W. Luo et al. // Journal of Hazardous Materials. — 2021. — Vol. 412. — P. 125212. — DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125212
18. Akhtar N. Mycoremediation: expunging environmental pollutants. / N. Akhtar, M.A. Mannan // Biotechnology Reports. — 2020. — Vol. 26. — P. e00452. — DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00452
19. Chen L. Removal of heavy-metal pollutants by white rot fungi: Mechanisms, achievements, and perspectives. / L. Chen, X. Zhang, M. Zhang et al. // Journal of Cleaner Production. — 2022. — Vol. 354. — P. 131681. — DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.131681
20. Daâssi D. Fungal consortia mediated bio-treatment of organic matter and metals uptake from sewage water: Maize agro-physiological assessment. / D. Daâssi, A.N. Hajaji, L.J.H. Alssulime et al. // Catalysts. — 2024. — Vol. 14. — № 4. — P. 257. — DOI: 10.3390/catal14040257
21. Swathy K. Biodegradation of pesticide in agricultural soil employing entomopathogenic fungi: Current state of the art and future perspectives. / K. Swathy, P. Vivekanandhan, A. Yuvaraj et al. // Heliyon. — 2023. — Vol. 10. — № 1. — P. e23406. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23406
22. Akrouit I. Valorizing fungal diversity for the degradation of fluoroquinolones. / I. Akrouit, K. Staita, H. Zouari-Mechichi et al. // Heliyon. — 2024. — Vol. 10. — № 10. — P. e30611. — DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30611
23. Berlina A.N. Influence of organic solvents on the results of immunoenzyme determination of herbicide butachlor: selection of sample preparation modes. / A.N. Berlina, N.I. Smirnova, N.S. Komova et al. // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2024. — Vol. 60. — № 4. — P. 776–783. — DOI: 10.1134/S0003683824604359
24. Savinova O.S. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: twins with different faces. / O.S. Savinova, K.V. Moiseenko, E.A. Vavilova et al. // Biochimie. — 2017. — Vol. 142. — P. 183–190. — DOI: 10.1016/j.biochi.2017.09.013
25. Savinova O.S. Peroxidase of *Trametes hirsuta* LE-BIN 072: Purification, Characteristics, and Application for Dye Decolorization. / O.S. Savinova, T.V. Fedorova // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2024. — Vol. 60. — № 6. — P. 1209–1222. — DOI: 10.1134/S0003683824605730
26. Bergmann A. Estrogenic activity of food contact materials—evaluation of 20 chemicals using a yeast estrogen screen on HPTLC or 96-well plates. / A. Bergmann, E. Simon, A. Schifferli // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2020. — Vol. 412. — № 19. — P. 4527–4536. — DOI: 10.1007/s00216-020-02701-w
27. Zhang Y. Short-term response of soil enzyme activities and bacterial communities in black soil to a herbicide mixture: Atrazine and Acetochlor. / Y. Zhang, Y. Hu, N. An et al. // Applied Soil Ecology. — 2023. — Vol. 181. — P. 104652. — DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104652
28. Hou X. Response of acetochlor degradation and bacterial community in black soil to the application of vermicompost. / X. Hou, X. Wang, Y. Ou et al. // Biology and Fertility of Soils. — 2025. — Vol. 61. — № 1. — P. 13–26. — DOI: 10.1007/s00374-024-01867-0
29. Abd-Alrahman S.H. Bioremediation of Water Contaminated with Fenitrothion and Butachlor using Microorganisms Isolated from Soil. / S.H. Abd-Alrahman, Z.H. Zidan, M.I. Abdel-Megeed et al. // Journal of Pure and Applied Microbiology. — 2013. — Vol. 7. — P. 1757–1762.
30. Mohanty S.S. Degradation kinetics and mechanistic study on herbicide bioremediation using hyper butachlor-tolerant *Pseudomonas putida* G3. / S.S. Mohanty, H.M. Jena // Process Safety and Environmental Protection. — 2019. — Vol. 125. — P. 172–181. — DOI: 10.1016/j.psep.2019.03.014
31. Astajkina A.A. Vliyanie pesticidnoj nagruzki na mikrobnoe soobshhestvo agrodernovo-podzolistoj pochvy' [The Impact of Pesticides on the Microbial Community of Agrosoddy-Podzolic Soil]. / A.A. Astajkina, R.A. Strelecckij, M.N. Maslov et al. // Eurasian Soil Science. — 2020. — № 5. — P. 639–650. — DOI: 10.31857/S0032180X20050032 [in Russian]
32. Ma T. Effects of Insecticide and Herbicides on Thyroid Disturbances in Zebrafish. / T. Ma, X. An, P. Wu et al. // Toxics. — 2024. — Vol. 12. — № 8. — P. 570. — DOI: 10.3390/toxics12080570
33. Wang S. Dose-Dependent Effects of Butachlor Accumulation and Degradation on Amino Acid Metabolism and Lignin Biosynthesis in Rice. / S. Wang, J. Chen, L. Zhu // Environmental Pollution. — 2025. — Vol. 382. — P. 126771. — DOI: 10.1016/j.envpol.2025.126771
34. Savinova O.S. Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta*. / O.S. Savinova, A.V. Shabaev, O.A. Glazunova // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2022. — Vol. 58. — № Suppl. 1. — P. S113–S125. — DOI: 10.1134/S0003683822100118
35. Torres-Farrad  G. White rot fungi as tools for the bioremediation of xenobiotics: a review. / G. Torres-Farrad , S. Thijs, F. Rineau et al. // Journal of Fungi. — 2024. — Vol. 10. — № 3. — P. 167. — DOI: 10.3390/jof10030167
36. Glazunova O.A. Xenobiotic removal by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 activated carbon-based mycelial pellets: Remazol brilliant blue R case study. / O.A. Glazunova, K.V. Moiseenko, T.V. Fedorova // Water. — 2024. — Vol. 16. — № 1. — P. 133. — DOI: 10.3390/w16010133
37. Savinova O.S. Biodestruction of phthalic acid esters by white rot fungi. / O.S. Savinova, A.V. Shabaev, O.A. Glazunova // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2022. — Vol. 58. — № 5. — P. 598–612. — DOI: 10.1134/S0003683822050143
38. Lin Z. Current insights into the microbial degradation for butachlor: strains, metabolic pathways, and molecular mechanisms. / Z. Lin, S. Pang, Z. Zhou // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2021. — Vol. 105. — № 11. — P. 4369–4381. — DOI: 10.1007/s00253-021-11346-3