

УДК 504.53:504.054:581.6:577.15

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗАГРЯЗНЕННОЙ УГЛЕВОДОРОДАМИ ПОЧВЫ

Е. В. Плешакова^{1,2}, А. Ю. Муратова¹, О. В. Турковская¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

² Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83
E-mail: plekat@rambler.ru

Поступила в редакцию 24.09.09 г.

Изменение биологической активности загрязненной углеводородами почвы. – Плешакова Е. В., Муратова А. Ю., Турковская О. В. – Исследована активность ферментов дегидрогеназ и пероксидаз в почве после культивирования люцерны посевной и ржи озимой в условиях загрязнения углеводородами нефтешлама и дизельного топлива в концентрации 12 и 10 г/кг соответственно. Показано, что растения стимулируют активность ферментов в загрязненной углеводородами почве. При этом ферментативная активность зависит как от типа загрязнителя, так и от вида растения. В почве, загрязненной дизельным топливом, люцерна выражено стимулировала активность дегидрогеназ и пероксидаз. В почве, загрязненной нефтешламом, активность пероксидаз была максимальной под рожью. Фиторемедиацию почвы, загрязненной нефтешламом, наиболее эффективно осуществляла люцерна, а почвы, загрязненной дизельным топливом, – рожь.

Ключевые слова: углеводородное загрязнение, фиторемедиация, дегидрогеназы, пероксидазы, *Medicago sativa*, *Secale cereale*.

Biological activity changes of hydrocarbon-contaminated soil. – Pleshakova E. V., Muratova A. Yu., and Turkovskaya O. V. – The activity of dehydrogenases and peroxidases in soil after cultivation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and rye (*Secale cereale* L.) plants under the conditions of pollution with oil-sludge and diesel-fuel hydrocarbons with concentrations of 12 and 10 g/kg, respectively, was studied. The plants are shown to stimulate the enzyme activities in the hydrocarbon-contaminated soil. Enzymatic activity depends on both contaminant type and the plant species used. Alfalfa considerably stimulates the dehydrogenase and peroxidase activity in the diesel-fuel-contaminated soil. The peroxidase activity was maximal in the rye-planted oil-sludge-contaminated soil. Alfalfa was most effective in phytoremediation of the oil-sludge contaminated soil, while rye was most effective in phytoremediation of the diesel-fuel-contaminated soil.

Key words: hydrocarbon contamination, phytoremediation, dehydrogenases, peroxidases, *Medicago sativa*, *Secale cereale*.

ВВЕДЕНИЕ

Нефтяные углеводороды являются одними из наиболее опасных веществ, загрязняющих природную среду. Они вызывают значительные, преимущественно неблагоприятные, и трудно обратимые изменения в почвенных экосистемах: ингибируют дыхательную активность почвы, процессы азотфиксации, нитрификации, разрушения целлюлозы, приводят к накоплению трудноокисляемых метаболитов в почве, нарушают почвенное плодородие.

В настоящее время внимание ученых, биотехнологов сосредоточено на использовании технологии фиторемедиации для восстановления нефтезагрязненных почв, которая заключается в высеве устойчивых к нефтяному загрязнению растений, способных активизировать нефтеокисляющую микрофлору в почве.

Фиторемедиация как одна из наиболее экономичных, деликатных по отношению к живой природе, эстетически привлекательных технологий активно исследуется в течение последних десятилетий (Wiltse et al., 1998; Banks et al., 2003; Wang et al., 2008). Показано, что основным механизмом разрушения углеводородов нефти является деградация этих соединений микроорганизмами в ризосфере растений. Корневые экссудаты, выделяемые растениями, обеспечивают микробные популяции ризосферы источником углерода, энергии, иногда кислорода, а также микроэлементами и ферментами (Cunningham et al., 1995). Благодаря корневым экссудатам микробные популяции и их активность в 5 – 100 раз выше в ризосфере по сравнению с основной массой почвы. Такое индуцированное растениями увеличение численности микроорганизмов и их активности называется «ризосферным эффектом».

К настоящему времени известно, что вместе с корневыми экссудатами растения выделяют в почву ферменты, способные трансформировать органические ксенобиотики (Schnoor et al., 1995; Muratova et al., 2009). Показано (Gramms et al., 1999), что корни некоторых растений семейств бобовых, злаковых и пасленовых выделяют достаточное количество оксидоредуктаз, чтобы принимать активное участие в окислительной деградации почвенной органики.

Ферментативная активность почв – один из показателей потенциальной биологической активности почв, при участии экзо- и эндоферментов почвенных микроорганизмов, фауны и растений в почве осуществляются важнейшие биохимические процессы (Pascual et al., 2000). Активность почвенных ферментов аналитически определяется с высокой точностью и является устойчивым и чутким показателем биогенности почв (Галстян, 1974). Исследование изменений активности почвенных ферментов в результате применения технологии фиторемедиации может внести вклад в понимание механизмов участия растений в очистке почв от углеводородного загрязнения.

Целью настоящей работы являлось исследование изменений активности ферментов в загрязненной нефтяными углеводородами почве в процессе фиторемедиации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В лабораторных вегетационных опытах использовали 2 типа почвы: 1) чернозем южный, отобранный в окрестности с. Квасниковка Саратовской области; 2) чернозем слабовыщелоченный маломощный, отобранный вблизи р.п. Новые Бурасы Саратовской области. Некоторые агрохимические и биологические характеристики исследуемых почв представлены в табл. 1, характеристика фракционного состава нефтепродуктов – в табл. 2.

Перед экспериментом почву высушивали до воздушно-сухого состояния, удаляли крупные включения и просеивали через сито с диаметром ячеек 5 см. Нефтешлам

и дизельное топливо марки ДТ-Л вносили до конечной концентрации 12 и 10 г/кг почвы соответственно. По 2 кг почвы помещали в 2-литровые пластиковые вегетационные сосуды и выдерживали в течение 3 сут. после внесения загрязнителя.

Таблица 1

Агрохимические и биологические характеристики исследуемых почв

Показатели	Южный чернозем	Слабовыщелоченный маломощный чернозем
Общий С, %	1.4	4.4
Нитратный N, мг/кг	6.0	4.95
Аммонийный N, мг/кг	12.0	12.0
Подвижный P ₂ O ₅ , мг/100 г	20.0	39.0
ОГМ, клеток/г сухой почвы	1.6×10 ⁶	5.0×10 ⁶
УОМ, клеток/г сухой почвы	6.5×10 ⁵	21.3×10 ⁵
pH	7.3	5.64

В эксперименте использовали семена люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и ржи озимой (*Secale cereale* L.), полученные из ВНИИСХ Юго-Востока (г. Саратов). По 20 семян растений высаживали в подготовленные вегетационные сосуды. Каждый вариант опыта ставили в трех повторностях. В качестве контролей использовали загрязненную почву, находящуюся в аналогичных условиях, но без растений, и незагрязненную почву с растениями. Растения выращивали в течение 2.5 месяцев в контролируемых условиях: световой режим день/ночь – 14/10 ч, интенсивность освещения – 8000 люкс, дневная/ночная температура воздуха – 24/21°C. Растения поливали по мере необходимости до 40%-ной от полной влагоёмкости, количество необходимой для полива воды определяли взвешиванием сосудов с растениями.

Таблица 2

Соотношение нефтяных фракций в нефтепродуктах, %

Фракции	Нефтьшлам	Дизельное топливо
Парафины	33.90	76.56
Нафтенy	20.85	23.34
Моно- и бициклические ароматические соединения	10.27	0.04
ПАУ	11.16	0.12
Спирто-бензолные смолы	23.64	0

Через 2.5 месяца оценивали показатели активности почвенных ферментов: дегидрогеназ и пероксидаз в ризосфере. Активность дегидрогеназ в почве определяли колориметрически на КФК-2 по восстановлению субстрата, в качестве которого использовали бесцветное соединение 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, которое, акцептируя мобилизованной дегидрогеназой водород, превращалось в 2,3,5-трифенилформазан, имеющий красную окраску (Хазиев, 2005).

Пероксидазную активность южного чернозема определяли по методу К. А. Козлова, основанному на йодометрическом титровании реакционной смеси, содержащей в качестве субстрата пирокатехин, после взаимодействия с почвенной суспензией (Хазиев, 2005). Пероксидазную активность маломощного чернозема оценивали методом Л. А. Карягиной и Н. А. Михайловой, так как была показана нецелесообразность использования метода К. А. Козлова в связи с физико-химическими особенностями данной почвы. Определение проводили колориметрически на КФК-2 по окислению субстрата, который под действием пероксидазы в присутствии кислорода перекиси превращался в 1,4 *n*-бензохинон, имеющий желтую окраску.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Остаточное содержание нефтяных углеводородов в почве определяли гравиметрическим методом (Методические указания..., 2003), извлекая сумму неполярных и малополярных углеводородов из почвенного образца органическим растворителем (четырёххлористым углеродом) с одновременной очисткой элюата на окиси алюминия в хроматографической колонке и с помощью газохроматографического анализа (Ларионова и др., 2005; Другов, Родин, 2007).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ни один биологический процесс в почве не совершается без участия широко распространенных у почвенных микроорганизмов ферментов дегидрогеназ, которые катализируют реакции дегидрирования органических веществ и выполняют функцию промежуточных переносчиков водорода. В то же время известно, что дегидрогеназы ингибируются под действием ядовитых веществ и восстанавливают свою активность в очищенной почве.

В исходной чистой почве активность дегидрогеназ составляла 0.978 и 0.810 мкл H_2 /г за сутки в южном и маломощном черноземе соответственно. Загрязнение почвы нефтяными углеводородами стимулировало этот показатель. Через 3 сут. активность дегидрогеназ увеличилась: в почве, загрязненной нефтешламом, – на 25% (рис. 1, а), загрязненной дизельным топливом – на 14% (рис. 1, б).

В конце эксперимента (через 2.5 мес.) в чистой почве активность дегидрогеназ снизилась примерно в 2 и 4.5 раза в южном и маломощном черноземе соответственно, что, скорее всего, связано со снижением количества субстратов для дегидрогеназ. В загрязненной почве без растений активность дегидрогеназ также существенно снизилась: при загрязнении нефтешламом – в 3.5, дизельным топливом – в 5.6 раза от исходной активности в незагрязненной почве.

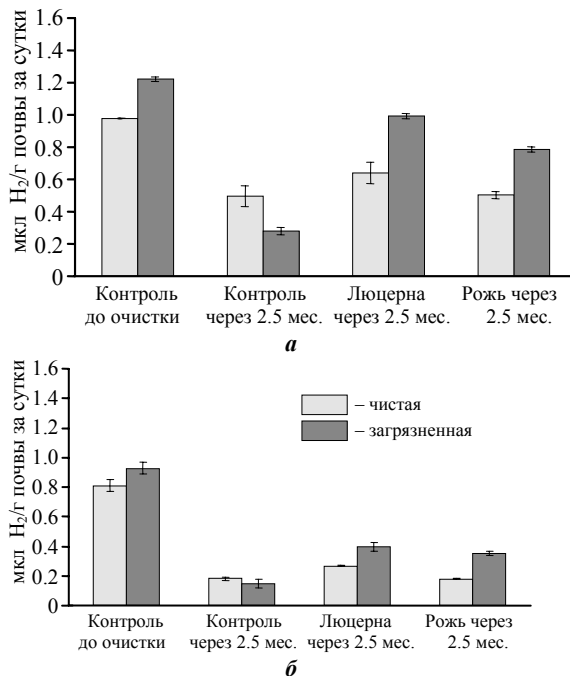


Рис. 1. Активность дегидрогеназ в почве, загрязненной нефтешламом (а) и дизельным топливом (б)

Культивирование растений в присутствии углеводов существенно влияло на показатель дегидрогеназной активности. Так, использование люцерны привело к тому, что через 2.5 мес. дегидрогеназная активность в почве с нефтешламом составляла 0.993 мкл H_2 /г почвы за сутки, превышая активность в исходной чистой почве. При выращивании ржи активность дегидрогеназ в почве, загрязненной нефтешламом, была чуть ниже, чем в исходной чистой почве.

В целом дизельное топливо оказывало более выраженное ингибирующее действие на активность почвенных дегидрогеназ, которая была значительно ниже исходных значений. В то же время культивирование люцерны и ржи в почве, загрязненной дизельным топливом, стимулировало активность дегидрогеназ, которая через 2.5 мес. была в 2.7 и 2.4 раза выше, чем в загрязненной почве без растений и в 1.5 и 2.0 раза выше, чем в чистой почве (см. рис. 1, б).

Проведенные эксперименты показали, что растения повышают активность дегидрогеназ в почве. Известно, что растения выделяют с корневыми экссудатами углеводы, спирты, аминокислоты, органические кислоты, витамины и т.п., вследствие чего в ризосферной зоне растений увеличивается численность микроорганизмов.

Последние, в свою очередь, производят ферменты, катализирующие разложение загрязняющих веществ, в том числе и дегидрогеназы, которые пополняют общий пул почвенных дегидрогеназ.

В отличие от дегидрогеназ, почвенные пероксидазы имеют преимущественно растительное происхождение. В исходно чистом южном черноземе этот показатель составлял 2 мл 0.01 н I_2 . Внесение нефтешлама снизило его в 3.2 раза. В чистом маломощном черноземе пероксидазная активность была равна 0.39 мг *n*-бензохинона. Внесение дизельного топлива незначительно снизило эту активность.

На рис. 2 представлены результаты определения пероксидазной активности, выраженные в единицах относительной активности (опыт/контроль).

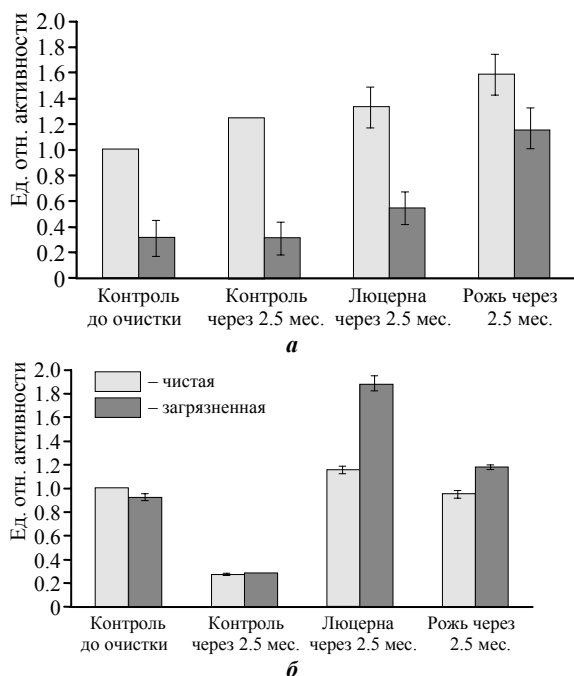


Рис. 2. Активность пероксидаз в почве, загрязненной нефтешламом (а) и дизельным топливом (б)

относительной активности (опыт/контроль). Через 2.5 мес. в чистой почве южного чернозема пероксидазная активность слегка увеличилась, в загрязненной нефтешламом без растений – осталась на уровне, сниженном под влиянием загрязнения. В почве

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

выщелоченного чернозема активность пероксидаз снизилась примерно в 4 раза, как в чистой, так и в загрязненной дизельным топливом почве без растений.

Активность пероксидаз в почве, загрязненной нефтешламом, при культивировании люцерны была почти в 2 раз ниже, чем в исходной чистой почве, но в 1.7 раз выше, чем в контроле без растений. Рожь, в отличие от люцерны, заметнее стимулировала пероксидазную активность почвы: в 3.7 раза относительно аналогичного варианта без растений.

При культивировании растений в условиях загрязнения дизельным топливом активность пероксидаз в почве в конце эксперимента была значительно выше незасеянного контроля. При выращивании люцерны в загрязненной почве наблюдалась высокая активность пероксидаз, превышающая данный показатель в 1.6 и 6.8 раза в чистой почве с растениями и загрязненной почве без растений соответственно. В случае ржи активность пероксидаз была выше в 1.2 и 4.3 раза относительно тех же контролей.

Наблюдаемые различия в пероксидазной почвенной активности, скорее всего, связаны с уровнем и активностью растительных пероксидаз, которые экскретируются в ризосферу и вносят значительный вклад в общий пул пероксидаз в почве. Рожь, исходя из полученных данных, превосходила люцерну по стимуляции активности пероксидаз в почве, загрязненной нефтешламом, и, напротив, люцерна заметнее стимулировала активность пероксидаз в почве, загрязненной дизельным топливом.

Использование ржи и люцерны увеличило степень деструкции общих нефтяных углеводов нефтешлама на 14 и 24% соответственно по сравнению с контролем (33%) (рис. 3). Степень деградации углеводов дизельного топлива в конце эксперимента составляла при культивировании ржи и люцерны 50 и 39%, что превышало степень очистки в контрольной почве без растений на 24 и 13% соответственно.

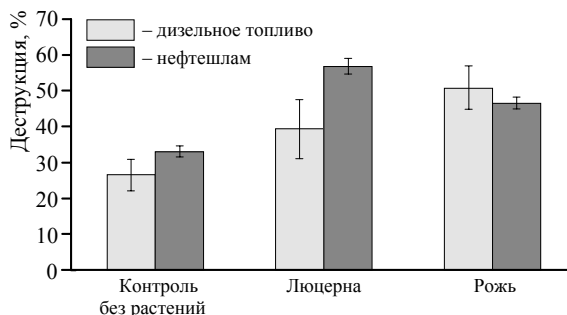


Рис. 3. Степень деструкции нефтяных углеводов в почве после очистки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом в ходе исследований было показано, что растения, используемые для ремедиации загрязненной нефтяными углеводородами почвы, стимулируют активность почвенных ферментов дегидрогеназ и пероксидаз, участвующих в детоксикации/деградации загрязнителя. На основании полученных данных можно предположить, что фиторемедиационный потенциал исследуемых растений реализовывался опосредованно, через стимуляцию численности и активности почвенной микрофлоры, проявляющей дегидрогеназную активность, и непосредственно через

увеличение продукции и экссудации растительных пероксидаз, что в конечном итоге способствовало снижению концентрации загрязнителя в почве.

В ходе проведенных исследований были установлены видовые различия растений по их влиянию на активность почвенных ферментов и деградацию углеводородных загрязнителей. Культивирование люцерны заметнее стимулировало активность дегидрогеназ в почвах, чем рожь, при загрязнении как нефтешламом, так и дизельным топливом. По стимулирующему влиянию на активность почвенных пероксидаз рожь превосходила люцерну при загрязнении почвы нефтешламом, при загрязнении дизельным топливом приоритетной была люцерна.

Степень деградации нефтешлама была выше при использовании для очистки почвы люцерны посевной, напротив, рожь озимая способствовала деградации дизельного топлива в большей степени, чем люцерна.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (госконтракт № 02.512.11.2210).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван : Айастан, 1974. 276 с.
- Другов Ю. С., Родин А. А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов : практическое руководство. М. : БИНОМ, 2007. 270 с.
- Ларионова Н. А., Семенова Е. Н., Бреус В. А., Неклюдов С. А., Бреус И. П. Экстракция и анализ углеводородов, содержащихся в загрязненных почвах // *Технология нефти и газа*. 2005. № 4. С. 39 – 49.
- РД 52.18.647-2003. Методические указания определения массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом. / Разр. «Тайфун». Утв. Росгидрометом 18.03.2003. Введен 01.06.2003. М., 2003. 16 с.
- Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М. : Наука, 2005. 252 с.
- Banks M. K., Kulakow P., Schwab A. P., Chen Z., Rathbone K. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor* // *Intern. J. Phytoremediation*. 2003. Vol. 5, № 3. P. 225 – 234.
- Cunningham S. D., Berti W. R., Huang J. W. Phytoremediation of contaminated soils // *Trends Biotechnol.* 1995. Vol. 13. P. 393 – 397.
- Gramms G., Voigt K. D., Kirsche B. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material // *Chemosphere*. 1999. Vol. 38, № 7. P. 1481 – 1494.
- Kraus J. J., Munir I. Z., McEldoon J. P., Clark D. S., Dordick J. S. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons catalyzed by soybean peroxidase // *Appl. Biochemistry and Biotechnology*. 1999. Vol. 80, № 3. P. 221 – 230.
- Muratova A., Pozdnyakova N., Golubev S., Wittenmayer L., Makarov O., Merbach W., Turkovskaya O. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment // *Chemosphere*. 2009. Vol. 74, № 8. P. 1031 – 1036.
- Pascual J. A., Garcia C., Hernandez T., Moreno J. L., Ros M. Soil microbial activity as a bio-marker of degradation and remediation processes // *Soil Biol. Biochem.* 2000. Vol. 32. P. 1877 – 1883.
- Schnoor J. L., Licht L. A., McCutcheon S. C., Wolfe N. L., Carreira L. H. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants // *Environ. Sci. Technol.* 1995. Vol. 29, № 7. P. 318 – 323.
- Wang J., Zhang Z., Su Y., He W., He F., Song H. Phytoremediation of petroleum polluted soil // *Petroleum Science*. 2008. Vol. 5, № 2. P. 167 – 171.
- Wilse C. C., Rooney W. L., Chen Z., Schwab A. P., Banks M. K. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes // *J. Environ. Qual.* 1998. Vol. 27. P. 169 – 173.