

УДК 635.926(470.44)

ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕКОТОРЫХ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ ВОДОЁМОВ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю. А. Пайдулова, О. В. Турковская

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13
E-mail: jtumaykina@gmail.com*

Поступила в редакцию 08.08.13 г.

Фиторемедиационный потенциал некоторых высших водных растений водоёмов Саратовской области. – Пайдулова Ю. А., Турковская О. В. – Проведен сравнительный анализ численности микробного планктона, бентоса и перифитона ряда растений рек Волга и Латрык Саратовской области. Показано, что наибольшей микробной плотностью характеризуется поверхность растений в обоих водоёмах. Из перифитона высших водных растений выделено 4 штамма, обладающих высокой деструктивной активностью в отношении фенола (95 – 99%). В изученных растениях выявлена активность ферментов, способность окислять фенольные соединения. По изученным характеристикам наибольшим потенциалом для ремедиации водоёмов, загрязнённых фенольными соединениями, обладают рдест гребенчатый (*Potamogeton pectinatus* L., 1753), роголистник темно-зеленый (*Ceratophyllum demersum* L., 1753) и уруть колосистая (*Myriophyllum spicatum* L., 1753).

Ключевые слова: высшие водные растения, перифитон, углеводородокисляющие микроорганизмы, фенолоокисляющие микроорганизмы, окислительные ферменты растений.

Phytoremediation potential of some higher aquatic plants in Saratov Region water bodies. – Paydulova J. A. and Turkovskaya O. V. – A comparative analysis was made of the numbers of microbial plankton, benthos and periphyton in several plants growing in the Volga and Latryk rivers (the Saratov region). The highest microbial density was found on the surface of plants in both water bodies. Four strains were isolated from the periphyton of higher aquatic plants, which were highly degradative to phenol (95 – 99%). The activity of some enzymes able to oxidize phenolic compounds was revealed in the examined plants. On the basis of the characteristics studied, the highest potential for use in the remediation of water bodies polluted with phenolic compounds was shown by fennel-leaved pondweed (*Potamogeton pectinatus*), hornwort (*Ceratophyllum demersum*), and mealein (*Myriophyllum spicatum*).

Key words: higher aquatic plants, periphyton, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, phenol-oxidizing microorganisms, plant oxidative enzymes.

ВВЕДЕНИЕ

Водоёмы представляют собой сложные экосистемы, в которых постоянно идут процессы адаптации биоценоза к изменяющимся условиям существования, направленные на достижения равновесия в экосистеме. Состояние равновесия может быть нарушено вследствие многих причин, в первую очередь в результате сброса хозяйственно-бытовых, промышленных и сельскохозяйственных сточных вод.

Актуальным направлением очистки природных и сточных вод является фиторемедиация, основанная на использовании высших водных растений (ВВР), или макрофитов, и ассоциированных с ними микроорганизмов. В этой высокоэффективной технологии используются природные процессы, с помощью которых рас-

тения и микроорганизмы накапливают и разрушают различные поллютанты. Растения, обладающие фиторемедиационным потенциалом, имеют устойчивость к токсическому действию повышенных концентраций загрязнителя, принимают участие в его поглощении или разрушении и быстро воспроизводят свою биомассу. Кроме того, макрофиты секретируют экссудаты, которые поддерживают рост и метаболическую активность перифитонных бактерий – деструкторов ксенобиотиков. Высшие водные растения успешно используются в практике очистки вод от биогенных элементов, фенолов, ароматических углеводов, микроэлементов, нефтепродуктов, тяжелых металлов, в обеззараживании и доочистке стоков и т.д. (Магометов, 1986; Новосадова, 1987; Васюков, 2003; Gersberg et al., 1986; Dunbabin, Bowner, 1992; Gleichman-Verheyc et al., 1992; Loyd et al., 2001).

Ранее на примере элодеи канадской (*Elodea canadensis*) нами исследована способность высших водных растений разрушать такие токсичные органические соединения, как фенол, толуол, бензол и нафталин (Тумайкина и др., 2008). Эта способность обусловлена не только присутствием перифитонных микроорганизмов-деструкторов отдельных соединений, но и наличием в элодее таких окислительных ферментов, как фенолоксидазы и пероксидазы.

Пероксидазы – широко распространенная группа ферментов, принимающих участие во многих физиологических и детоксикационных процессах. Растительные пероксидазы способны окислять моно- и полициклические ароматические соединения, такие как фенол, гидрокситолуол, бенз[а]пирен, диметиланин и др. (Заалишвили и др., 2000; Квеситадзе и др., 2005). Фенолоксидазы также вносят значительный вклад в процесс деградации ароматических углеводов. Эта группа медьсодержащих ферментов включает в себя фенолоксидазы тирозиназного и лакказного типа. Широкий ряд ароматических веществ фенольной природы может являться субстратом этих ферментов (Квеситадзе и др., 2005).

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось сравнительное исследование фиторемедиационного потенциала высших водных растений, собранных в реках Латрык и Волга Саратовской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись высшие водные растения 5 семейств и 6 видов: уруть колосистая (*Myriophyllum spicatum* L., 1753) семейства сланоягодниковые (Haloragaceae); роголистник темно-зеленый (*Ceratophyllum demersum* L., 1753) семейства роголистниковые (Ceratophyllaceae); элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx., 1803) семейства водокрасовые (Hydrocharitaceae); сусак зонтичный (*Butomus umbellatus* L., 1753) семейства сусаковые (Butomaceae); рдесты пронзеннолистный (*Potamogeton perfoliatus* L., 1753) и гребенчатый (*Potamogeton pectinatus* L., 1753) семейства рдестовые (Potamogetonaceae). Растения были собраны в июле 2009 г. на территории Саратовской области на удаленном от населенных пунктов участках рек Латрык и Волга в районе пос. Увек.

Отбор проб планктона, перифитона и бентоса для бактериологических исследований проводили по стандартным методикам (Родина, 1965).

Общую численность гетеротрофных микроорганизмов определяли на МПА методом серийных разведений. Для выявления углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) использовали метод мембранных фильтров (А.с. 1629318). Фенолоокисляющие микроорганизмы выделяли на чашках с селективной средой следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.65; KH_2PO_4 – 0.19; NaNO_3 – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.00556; $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – 0.5; фенол – 0.5.

Содержание углеводов в воде определяли гравиметрическим методом (Метод определения..., 1990).

Для получения буферных экстрактов, представляющих собой грубый ферментный препарат, 0.5 г побегов растений измельчали и гомогенизировали в охлажденной керамической ступке с 2 мл 50 мМ ацетатного (pH 5.0) буфера. Гомогенат сливали в мерную колбу и доводили объем тем же буфером до 25 мл. Неразрушенные клетки и их фрагменты осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 5000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве буферных экстрактов.

Определение ферментной активности экстрактов водных растений проводили с помощью спектрофотометра СФ-26 в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата или образование 1 мкмоль продукта в мин, и рассчитывали как единицы (Ед.) на мл вытяжки. Удельную активность определяли как мкмоль/мин/мг белка.

Активность тирозиназы выявляли по образованию продукта окисления из L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА) при 475 нм (Pomerantz, Myrthy, 1974). Активность лакказы оценивали по образованию продуктов окисления сиригальдазина при 525 нм (Leonowicz, Crzywnowicz, 1981), диаммонийной соли 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС) (Niku-Paavola et al., 1988) и пирокатехина при 410 нм (Королева и др., 2001). Активность пероксидазы выявляли при 436 нм по образованию продукта окисления АБТС в присутствии H_2O_2 и рассчитывали как разницу между активностью фермента в присутствии H_2O_2 и без нее.

Концентрацию белка определяли по методу М. М. Брефорда (Bradford, 1976).

Все эксперименты проводили в трех повторах. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel Office XP, а также общепринятым методом с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание нефтепродуктов в р. Волга составило в среднем 7.5 мг/л, что в 15 раз превышает ПДК (Обобщенный перечень..., 1990). В пробах воды р. Латрык нефтепродукты обнаружены не были.

На первом этапе исследования были получены сведения об особенностях количественного и качественного состава основных групп водных микроорганизмов: планктонных, бентосных и перифитонных. Определяли общую численность гетеротрофных микроорганизмов, а также специализированных – УОМ и фенолоокисляющих. Общая численность гетеротрофных микроорганизмов варьировала от

ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

1.6×10^5 до 6.1×10^7 КОЕ/г (табл. 1). Показано, что максимально плотное «микробное население» находится на поверхности растений – в перифитоне, причем в условиях нефтяного загрязнения их численность была на порядок выше.

Таблица 1

Группы микроорганизмов	Численность водной микрофлоры					
	Гетеротрофы, растущие на МПА					
	Общая численность		Угледородоокисляющие		Фенолоксиляющие	
	Волга	Латрык	Волга	Латрык	Волга	Латрык
Планктон, КОЕ/мл	1.6×10^5	3.1×10^5	1.2×10^4	1.7×10^3	1.1×10^2	2.5×10^4
Перифитон, КОЕ/г сырого веса (среднее по всем растениям)	6.1×10^7	9.7×10^6	1.12×10^4	2.7×10^6	2.2×10^5	1.6×10^5
Бентос, КОЕ/г грунта	2.3×10^5	5.2×10^5	8.2×10^5	1.0×10^4	1.2×10^3	2.0×10^5

Примечание. Ошибка всех результатов не превышала 10%.

УОМ являются важной экологической группой микроорганизмов, вовлекающих нефтяные углеводороды в круговорот веществ в различных биотопах. Они обнаруживались во всех пробах как р. Латрык, так и р. Волги. В микробном бентосе р. Волга группа УОМ преобладала над всеми остальными и превышала общую численность гетеротрофов в 3.6 раз (см. табл. 1). Возможно, это связано с покоящимися формами бактерий, которые активизируются под воздействием углеводов нефти (Дорошенко, 2002).

Отсутствие нефтепродуктов в воде р. Латрык отражается на пространственном распределении микроорганизмов этой группы. Большая часть УОМ этого водоёма была сосредоточена в перифитоне высших водных растений (ВВР) и составила 2.7×10^6 КОЕ/г сырого веса, в то время как в бентосе и планктоне – всего 1.0×10^4 и 1.7×10^3 КОЕ/мл соответственно. В отличие от этого в загрязненном нефтепродуктами биотопе р. Волги УОМ численно доминируют в планктоне и бентосе, где для них есть питательный субстрат.

Фенолоксиляющие микроорганизмы численно доминировали в перифитоне ВВР в обоих водоёмах. Причина этого, возможно, в том, что в состав растительных экссудатов входит большое количество соединений фенольной природы. Обращает на себя внимание тот факт, что в бентосе р. Латрык обнаружена высокая численность микроорганизмов этой группы (2.0×10^5 КОЕ/г грунта). На наш взгляд, это может быть связано с тем, что в иле во время отбора проб было обнаружено большое количество растительных остатков, что также приводит к обогащению среды фенольными соединениями и размножению бактерий, их потребляющих.

Анализ бактериального населения шести исследованных растений показал (табл. 2), что рдест пронзеннолистный имеет перифитон, превосходящий по общей численности, а также по количеству УОМ и фенолоксиляющих микроорганизмов другие растения как в р. Волге, так и в р. Латрык. Хотя и все другие растения обладали достаточно плотным бактериальным перифитоном, максимальные значения численности УОМ зафиксированы для рдеста пронзеннолистного, урути колосистой и сусака зонтичного (1.62 , 2.7 и 4.3×10^6 КОЕ/г сырого веса соответственно).

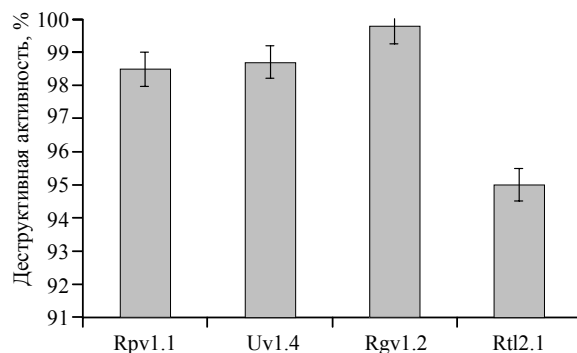
Таблица 2

Численность перифитонных микроорганизмов (КОЕ/ г сырого веса) водных растений

Растения	Гетеротрофы, растущие на МПА					
	Общая численность		Угледородородокисляющие		Фенолоксиляющие	
	Волга	Латрык	Волга	Латрык	Волга	Латрык
Уруть колосистая	4.7×10^7	–	2.4×10^5	–	2.7×10^6	–
Роголистник темно-зеленый	6.3×10^6	3.4×10^6	1.95×10^5	8.02×10^5	5.3×10^5	2.6×10^4
Рдест пронзеннолистный	2.1×10^8	7.85×10^6	4.9×10^5	6.45×10^6	1.62×10^6	4.2×10^5
Рдест гребенчатый	1.78×10^7	2.88×10^7	2.5×10^5	2.7×10^5	5.1×10^5	1.0×10^4
Элодея канадская	2.6×10^7	6.17×10^5	3.5×10^5	1.5×10^6	5.05×10^5	3.1×10^3
Сусак зонтичный	–	–	–	4.3×10^6	–	0

Примечание. Ошибка всех результатов не превышала 10%.

В связи с высокой токсичностью и экологической опасностью фенольных соединений группа фенолоксиляющих микроорганизмов была исследована более детально. Из перифитона исследованных ВВР нами было выделено 17 штаммов фенолоксиляющих микроорганизмов и изучена их деструктивная активность по отношению к фенолу (100 мг/л) за 5 сут. Большинство штаммов проявили невысокую активность – не выше 18%. Три штамма, Rpv1.1, Uv1.4 и Rgv1.2 (рисунок), выделенные из перифитона волжских растений – рдеста пронзеннолистного, урути



Деструктивная активность перифитонных штаммов

(95%). Таким образом, из перифитона ВВР выделены штаммы, обладающие высокой деструктивной активностью в отношении фенола, которые могут выполнять защитную функцию от токсических веществ для растений, а также могут явиться основой для разработки экологических биотехнологий. Таксономические характеристики штаммов изучаются.

В предыдущих работах нами было доказано, что в деструкции поллютантов принимают участие не только микробный компонент водоёмов, но и ВВР, поглощая, накапливая и разрушая токсичные соединения (Тумайкина и др., 2008; Трегуб и др., 2009). Как видно из табл. 3, активность окислительных ферментов, способных принимать участие в детоксикации поллютантов, выявлена у всех исследованных растений. Она существенно различалась как у растений различных видов,

ФИТОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

так и у одного вида в различных водоёмах. Это может быть связано с физиологическим состоянием самого макрофита, его возраста и фазы роста, а также с окружающей его средой. Максимальная активность ферментов выявлена у таких растений, как уруть колосистая, роголистник темно-зеленый, рдесты пронзеннолистный и гребенчатый. Наибольшую активность лакказы проявлял рдест гребенчатый, собранный как на р. Латрык, так и на р. Волга (0.04 и 0.053 мкМ/мин/мг белка соответственно). Активность тирозиназы была максимальной у роголистника темно-зеленого и урути колосистой (27.36 и 20 мкМ/мин/мг белка соответственно). Пероксидаза проявила наибольшую активность в растениях из р. Латрык (у роголистника темно-зеленого – 109.45 мкМ/мин/мг белка).

Таблица 3

Активность ферментов водных растений, собранных в реках Волга и Латрык, мкМ/мин/мг белка

Растения	Тирозиназа		Оксидаза		Пероксидаза		Лакказа	
	Волга	Латрык	Волга	Латрык	Волга	Латрык	Волга	Латрык
Уруть колосистая	20.00	–	2.37	–	9.95	–	0	–
Роголистник темно-зеленый	3.3	27.36	0.05	1.131	13.54	109.45	0.001	0
Рдест пронзеннолистный	2.4	7	1.66	0	17.89	86.97	0.015	0.02
Рдест гребенчатый	1.63	16.39	0.88	0.53	8.43	43.16	0.053	0.04
Элодея канадская	1.97	2.06	0.13	0.36	6.02	2.95	0.003	0.003
Сусак зонтичный	–	4.77	–	0.83	–	15.44	–	0.010

Примечание. Ошибка всех результатов не превышала 5%; «–» – определение не проводилось.

Таким образом, показано, что исследованные ВВР обладают фиторемедиационным потенциалом, который проявляется в поддержании высокой численности перифитонных фенол- и углеводородокисляющих бактерий, наличии растительных окислительных ферментов, способных принимать участие в деструкции органических соединений. Наибольшим потенциалом для ремедиации водоёмов, загрязненных фенольными соединениями, обладали рдест гребенчатый, роголистник темно-зеленый и уруть колосистая. Это позволяет рассматривать названные растения как потенциальные агенты для систем очистки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

А.с. 1629318 СССР, МКИ С 12 Q 1/06, С12 N 1/20. Способ определения численности углеводородокисляющих бактерий / Чекалов В. П. ; заявитель Днепропетровский государственный университет им. 300-летия воссоединения Украины с Россией. № 4609215/13 ; заявл. 23.11.1988 ; опубл. 23.02.1991. Бюл. 7. 3 с.

Васюков А. Е. Аккумуляция металлов макрофитами в водоёмах зоны Запорожской АЭС // Гидробиол. журн. 2003. № 3. С. 94 – 104.

Дорошенко Е. В. Биоразнообразие покоящихся форм микроорганизмов : дис. ... канд. биол. наук. М., 2002. 161 с.

Заалишвили Г. В., Хатисашвили Г. А., Угрехелидзе Д. Ш., Гордзениани М. Ш., Квеситадзе Г. И. Детоксикационный потенциал растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 5. С. 515 – 524.

Квеситадзе Г. И., Хатисаишвили Г. А., Садунишвили Т. А., Евстигнеева В. Г. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях. М. : Наука, 2005. 199 с.

Королева О. В., Явметдинов И. С., Шлеев С. В., Степанова С. В., Гаврилова В. П. Выделение и изучение некоторых свойств лакказы из базидиального гриба *Cerrena taxima* // Биохимия. 2001. Т. 66, вып. 6. С. 762 – 767.

Литвинова М. Ю., Ильинский В. В., Семененко М. Н., Перетрухина И. В. Распределение и потенциальная активность углеводородоксилирующих бактерий в воде среднего и северного колен Кольского залива // Вестн. Мурман. гос. техн. ун-та. 2012. Т. 15, № 3. С. 533 – 540.

Магомедов В. Г. Эффективность инфильтрационного биоплато как водоохранного сооружения многоцелевого назначения // Водные ресурсы. 1986. № 6. С. 93 – 100.

Метод определения нефти и нефтепродуктов. Инструкция по контролю за состоянием почв на объектах предприятий миннефтегазпрома. РД 39-0147098-015-90 / Мин-во нефтяной и газовой промышленности. М., 1990.

Новосадова Т. Г. К вопросу о биотестировании сточных и оборотных вод // Вопросы сравнительной физиологии и водной токсикологии. Ярославль : Изд-во Ярослав. гос. ун-та, 1987. С. 42 – 47.

Родина А. Г. Методы водной микробиологии. М. : Наука, 1965. 347 с.

Обобщенный перечень предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воде рыбохозяйственных водоемов. М. : Минрыбхоз СССР, 1990. 49 с.

Трегуб А. С., Тумайкина Ю. А., Гольдфейн М. Д. Исследование детоксикации толуола под воздействием водной растительно-микробной ассоциации // Проблемы региональной экологии. 2009. № 5. С. 75 – 80.

Тумайкина Ю. А., Турковская О. В., Игнатов В. В. Деструкция углеводов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе элодеи канадской // Прикладная биохимия и микробиология 2008. Т. 44, № 4. С. 422 – 429.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72, № 1 – 2. P. 248 – 254.

Dunbabin J. S., Bowner K. H. Potential use of constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters containing metals // Science of the Total Environment. 1992. Vol. 111, № 2/3. P. 151 – 168.

Gersberg R. M., Elkins B. V., Lyon S. R., Goldman C. R. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands // Water Research. 1986. Vol. 20, № 3. P. 363 – 368.

Gleichman-Verheyc E. G., Putten W. H., Vander L. Alvalwaterzuivering met helofytenfilters, een haalbaarheidsstudie // H₂O : Tijdschrift voor Watervoorziening en Afvalwaterbehandeling. 1992. Jr. 25, № 3. S. 56 – 60.

Leonowicz A., Grzywnowicz K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate // Enzyme and Microbial Technology. 1981. Vol. 3, iss. 1. P. 55 – 58.

Loyd S. D., Fletcher T. D., Wong T. H. F., Wootton R. M. Assessment of pollutant removal performance in a bio-filtration system : preliminary results // Rain the Forgotten Resource : 2nd South Pacific Stormwater conf. Auckland, New Zealand, 2001. P. 20 – 30.

Niku-Paavola M.-L., Karhunen E., Salola P., Paunio V. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata* // Biochem. J. 1988. Vol. 254, № 3. P. 877 – 883.

Pomerantz S. H., Murthy V. V. Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus* // Archives Biochemistry and Biophysics. 1974. Vol. 160, № 1. P. 73 – 82.