

УДК 631.461

А. Ю. ТАРАСЕВИЧ

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ ДИЗЕЛЬНЫМ ТОПЛИВОМ, ПРИ ВНЕСЕНИИ БИОМЕЛИОРАНТОВ

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: arlif@mail.ru*

Статья посвящена изучению изменения активности почвенных ферментов в почве, загрязненной дизельным топливом. Дегидрогеназная и инвертазная активность измерялась 4 раза на протяжении 3 мес. Анализ полученных данных свидетельствует об изменении активности почвенных ферментов в зависимости от состава грунта и внешних условий проведения эксперимента.

Ключевые слова: загрязнение почвы, дизельное топливо, дождевые черви, биоремедиация.

A. Ju. TARASEVICH

ENZYMATIC ACTIVITY IN THE DIESEL FUEL CONTAMINATED SOIL WITH BIOAMELIOTANTS

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: arlif@mail.ru*

The article is dedicated to changes of soil enzymes' activity in the soils, contaminated with diesel fuel. The dehydrogenase' and invertase' activities were measured four times during 3 month experiment. The data obtained indicates changes of the soil enzymatic activity depending on the composition of the soil and environmental conditions of the experiment.

Keywords: soil pollution, diesel fuel, earthworms, bioremediation.

Введение. Определение ферментативной активности включает комплекс биологических показателей, которые могут быть использованы в качестве биоиндикаторов экологического состояния почв [1–3]. Диагностику рекультивации почвы, загрязненной углеводородами, можно осуществлять посредством измерения в ней активности таких ферментов, как дегидрогеназа и инвертаза.

Дегидрогеназа является внутриклеточным ферментом, который характерен для всех почвенных микроорганизмов, получающих энергию за счет окисления разнообразных субстратов почвы [4], и активность которого отражает функциональное состояние почвенной микрофлоры. При определении активности дегидрогеназы в почве анализируется соответствующая активность микрофлоры, ферменты которой воздействуют на субстрат. Дегидрогеназа причислена к основным деструкторам углеводов, и уровень ее активности является критерием микробиологического самоочищения от этих веществ [5].

Инвертаза гидролизует сахарозу на глюкозу и фруктозу. Она широко распространена в природе и встречается почти во всех типах почв. Активность инвертазы является характерным показателем типов почв и их биологической активности [4]. По ней можно оценить степень окультуренности почвы, процент содержания гумуса, хотя повышение плодородия дерново-подзолистых почв сопровождается повышением уровня рН, что снижает активность инвертазы [6].

Цель настоящей работы – проследить изменения активности дегидрогеназы и инвертазы в почве, загрязненной дизельным топливом, в присутствии микробного препарата «Экобел», навоза крупного рогатого скота и культивируемой популяции навозного червя *Eisenia foetida* (Savigny, 1826).

Материалы и методы исследования. Эксперимент по рекультивации почвы после загрязнения ее дизельным топливом (доза внесения 2,5 г/кг) проведен на базе Промышленно-торгового унитарного предприятия «ПромХимЭлектро» (г. Червень) в период с 05.01.2012 по 22.05.2012. Указанная концентрация загрязнителя выбрана по результатам лабораторных тестов на острую летальность [7]. Для Беларуси это сильная степень загрязнения, которое естественное микробное сообщество быстро переработать не в состоянии. В то же время концентрация загрязнителя недостаточно высокая для экскавации и сжигания загрязненного грунта.

Определение выживаемости культуры навозных червей в субстрате проведено по методике, разработанной на основе стандартных методик [8, 9]. В отапливаемом помещении фермы на бетонном полу 05.01.2012 было заложено 28 гряд площадью по 0,25 м², высотой 10 см, огороженных досками. Среднесуточные температуры воздуха в помещении составляли от 8 ± 2 °С в начале эксперимента до 18 ± 2 °С – в конце.

В эксперименте использованы микробный препарат «Экобел» (предоставлен лабораторией деградации ксенобиотиков и биоремедиации природных и производственных сред «Института микробиологии НАН Беларуси») и маточная популяция навозных червей *E. foetida* (предоставлена ПТУП «ПромХимЭлектро»).

Опыт запущен 19.02.2012. Для сравнения эффективности рекультивации загрязненной нефтепродуктами почвы микробиологическим препаратом, культурой дождевых червей, микробным препаратом и червями получено 7 вариантов заполнения гряд:

- 1) естественная почва с дизельным топливом, микробным препаратом «Экобел»;
- 2) естественная почва с дизельным топливом;
- 3) естественная почва с навозом крупного рогатого скота (КРС), микробным препаратом;
- 4) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом;
- 5) естественная почва с навозом КРС, червями;
- 6) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом, червями;
- 7) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом, микробным препаратом, червями.

Гряды № 2 и 3, 4, 5 являются контролем для № 1 и 6, 7 соответственно.

Отбор почвенных образцов с площади гряд для проведения анализов производили 19.02.2012, 19.03.2012, 19.04.2012 и 22.05.2012 из слоя 0–10 см методом «конверта». Из отдельных проб составляли усредненные образцы. Почву высушивали, измельчали и просеивали через сито с диаметром ячеек 1–2 мм.

Для количественного определения дегидрогеназной активности в качестве субстрата использовали бесцветные соли 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого, который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназный водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан, имеющий красную окраску. Использованы реактивы: 0,1 М раствор глюкозы, 1 %-ный раствор ТТХ, этанол (ректификат), фосфатный буфер, pH = 7,2 (раствор NaH₂PO₄·12H₂O + KH₂PO₄).

Фотоколориметрическое определение активности инвертазы основано на учете восстанавливающих сахаров, образующихся при расщеплении сахарозы. Для определения инвертазной активности почвы использованы реактивы: 20 %-ная сахароза, толуол, 2 М ацетатный буфер (pH = 5,5), CH₃COONa; CuSO₄·5H₂O, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, толуол, 0,2 М NaHPO₄·12H₂O, H₂SO₄конц, (NH₄)₂MoO₄.

Измерение активности почвы проводили на базе сектора вермитехнологий ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» на фотометре КФК-3 согласно методикам [4, 10, 11].

Анализ образцов на основные химические почвенные показатели проведен лабораторией агроэкологии «Института природопользования НАН Беларуси» согласно методикам (ГОСТ 26714-85, ГОСТ 27979-88, ГОСТ 26715-85, ГОСТ 26717-85, ГОСТ 26718-85, ГОСТ 26716-85).

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 приведены результаты трехмесячного исследования выживаемости навозных червей в субстрате, загрязненном дизельным топливом.

В конце опыта в грядах № 5 выявлены взрослые особи (в среднем по 36 особей) и коконы навозных червей, что свидетельствует об адаптации животных к субстрату и о достижении субстратом температурного оптимума для размножения червей. В грядах № 6 обнаружены по 2 особи животных (в среднем по 4 повторностям). Коконов не найдено. В грядах № 7 в конце эксперимента выявлено в среднем по 4 особи, которые имели здоровый внешний вид и отличались по-

движностью. Кроме того, наличие в субстрате коконов свидетельствовало о благоприятных для размножения червей условиях.

Т а б л и ц а 1. **Выживаемость навозных червей в субстрате, загрязненном дизельным топливом, %**

Показатель выживаемости	Вариант опыта		
	5 ($n = 50$)	6 ($n = 50$)	7 ($n = 50$)
Через 2 недели	$90,0 \pm 3,7$	$48,0 \pm 10,7$	$56,0 \pm 14,0$
Через 4 недели	$80,0 \pm 9,4$	$40,0 \pm 8,2$	$42,0 \pm 6,7$
Через 8 недель	$78,0 \pm 9,9$	$16,0 \pm 10,6$	$26,0 \pm 4,3$
Через 12 недель	$72,0 \pm 8,5$	$4,0 \pm 1,6$	$8,0 \pm 2,8$

П р и м е ч а н и е. n – количество животных в гряде при запуске.

Часть популяции червей в начале опыта во всех вариантах наполнения гряд, в том числе в контроле, естественно, погибает, а количество погибших червей определяется факторами окружающей среды. Почва и навоз, использованные в опыте, не были загрязнены пестицидами и тяжелыми металлами, содержали достаточное количество биогенных элементов, кислотность субстрата – нейтральная. Влажность субстратов поддерживалась на оптимальном для популяции навозных червей и микробного препарата уровне (70 %) на протяжении всего опыта. Таким образом, не исключено, что гибель части популяции червей в экспериментальных грядах и в контроле в начале опыта определялась разницей температур исходного субстрата, в котором обитала популяция, и гряд ($\Delta = 6\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Дегидрогеназная активность субстратов измерена согласно методике [10]. Результаты представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. **Активность дегидрогеназы в образцах, мг ТФФ/1 г почвы за 24 часа**

Месяц	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Февраль	$0,177 \pm 0,009$	$0,177 \pm 0,009$	$0,162 \pm 0,008$	$0,153 \pm 0,008$	$0,162 \pm 0,008$	$0,153 \pm 0,008$	$0,153 \pm 0,008$
Март	$0,143 \pm 0,007$	$0,091 \pm 0,005$	$0,174 \pm 0,009$	$0,155 \pm 0,008$	$0,172 \pm 0,009$	$0,204 \pm 0,010$	$0,183 \pm 0,009$
Апрель	$0,128 \pm 0,006$	$0,144 \pm 0,006$	$0,153 \pm 0,008$	$0,116 \pm 0,006$	$0,096 \pm 0,005$	$0,090 \pm 0,004$	$0,095 \pm 0,005$
Май	$0,136 \pm 0,007$	$0,127 \pm 0,006$	$0,116 \pm 0,006$	$0,123 \pm 0,006$	$0,147 \pm 0,007$	$0,094 \pm 0,005$	$0,190 \pm 0,009$

По результатам анализов, самые высокие концентрации дегидрогеназы в субстрате наблюдались в начале эксперимента в вариантах № 1, 2 – в грядах, содержащих почву, загрязненную дизельным топливом (0,25 %). Они в 1,3 раза превышали концентрации данного фермента в исходной (незагрязненной) почве. Дегидрогеназная активность субстрата, содержавшего загрязненную почву и навоз КРС (20 % от массы субстрата), была выше, чем в чистой почве, но ниже, чем в почве, содержавшей дизель.

Через месяц после запуска в гряды микробного препарата и червей самая высокая дегидрогеназная активность зарегистрирована в загрязненном субстрате с червями (вариант 6). Не исключено, что такой результат дала массовая гибель животных в субстрате. Дегидрогеназная активность загрязненной дизельным топливом почвы (вариант 1) к третьей декаде марта несколько снизилась, что может свидетельствовать о частичной утилизации загрязнителя микробным препаратом. Самую низкую дегидрогеназную активность в марте регистрировали в субстрате, содержавшем только загрязненную дизелем (2,5 г/кг) почву (вариант 2). Это может свидетельствовать об отрицательном воздействии нефтепродуктов на почвенную микрофлору.

К третьей декаде апреля дегидрогеназная активность в субстратах, содержавших популяции навозных червей, снизилась. В вариантах 5, 6, 7 зарегистрированы одинаково низкие концентрации фермента. Это может быть связано со снижением активности животных в результате прекращения отопления помещений.

К концу эксперимента дегидрогеназная активность в 7-м варианте (загрязненная почва, навоз КРС, микробный препарат, черви) возросла по сравнению с таковой в апреле в 2 раза. Тем не менее,

говорить о восстановлении субстрата после загрязнения сложно, поскольку концентрации дегидрогеназы в 1,5 раза выше, чем в исходной чистой почве (0,124 мг ТФФ/1 г почвы за 24 ч).

Инвертазную активность определяли по методу Гофмана и Паллауфа [4]. Результаты представлены в табл. 3. Согласно полученным данным, инвертазная активность образца незагрязненной почвы без навоза, отобранного в начале опыта, равнялась таковой незагрязненной почвы с навозом (1,43 мг/10 г почвы за 3 ч). Активность субстратов, загрязненных дизельным топливом (№ 1, 2, 4, 6, 7), была незначительно выше, чем субстратов незагрязненных (варианты 3, 5, почва без добавок), перед обработкой их микробным препаратом и запуском в них навозных червей, что свидетельствует об активизации фермента в почве под действием загрязнителя.

Т а б л и ц а 3. Концентрация инвертазы в почве, мг/10 г почвы за 3 ч

Месяц	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Февраль	1,53 ± 0,08	1,53 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,52 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,52 ± 0,08	1,52 ± 0,08
Март	1,45 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,48 ± 0,07	1,59 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,48 ± 0,07	1,50 ± 0,07
Апрель	1,22 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,24 ± 0,06	1,07 ± 0,05	1,21 ± 0,06
Май	1,23 ± 0,06	1,49 ± 0,07	1,50 ± 0,07	1,35 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,29 ± 0,06	1,30 ± 0,06

Через месяц после внесения в субстраты бактериального препарата и червей самую высокую инвертазную активность регистрировали в субстрате, содержавшем почву, навоз КРС и дизельное топливо (вариант 4); несколько меньшую – в почве, загрязненной дизельным топливом (вариант 2); самую низкую – в незагрязненном субстрате, содержавшем навозных червей (вариант 5).

Инвертазная активность отобранных в апреле почвенных образцов несколько ниже, чем у зарегистрированных в другие месяцы во всех вариантах опыта. Поскольку подобная картина наблюдалась и с дегидрогеназной активностью, можно предположить, что на субстраты повлияло отсутствие отопления помещений в апреле, и, как следствие, низкие среднесуточные температуры (6 ± 2 °C). Самая высокая инвертазная активность зарегистрирована в субстрате с червями, без загрязнителя (вариант 5).

В конце опыта самая высокая инвертазная активность субстрата наблюдалась в незагрязненном субстрате с червями (вариант 5). Она была выше, чем в загрязненном субстрате с червями и бактериями (вариант 7). В варианте 7 это может свидетельствовать либо о более полной переработке органического вещества, либо о снижении активности фермента в результате гибели червей.

Из всех вариантов в конце опыта инвертазная активность субстрата была равна активности незагрязненной почвы (1,25 мг/10 грамм почвы за 3 ч) только в грядах № 1, что может свидетельствовать об очистке субстрата микробным препаратом от 0,25 % загрязнения дизельным топливом за 3 мес. Концентрации инвертазы в субстратах № 6 и 7 были ниже, чем в варианте 5 (незагрязненная почва + навоз), но приблизительно равны концентрациям в незагрязненной почве без навоза и червей (контроль) и в загрязненной почве с микробным препаратом (вариант 1). Это может свидетельствовать как о восстановлении почвы после загрязнения (в варианте 7), так и о снижении концентрации фермента в результате гибели червей (вариант 6).

Данные анализа почвенных образцов приведены в табл. 4.

Нитрифицирующие микроорганизмы очень чувствительны к загрязнению почв нефтью и нефтепродуктами. Самое высокое содержание нитратного азота в конце опыта зафиксировано в образце субстрата № 5, самое низкое – в образце субстрата № 2 (в почве, загрязненной дизельным топливом). Высокое содержание нитратного азота в варианте 1 в конце опыта может свидетельствовать о восстановлении субстрата после загрязнения дизельным топливом.

Небольшие массы как нитратного, так и аммиачного азота в субстратах № 6 и 7, по-видимому, явились результатом взаимодействия почвенной микрофлоры, микробной фауны желудочно-кишечного тракта навозных червей и КРС, дизельного топлива, а в варианте 7 – микроорганизмов препарата «Экобел».

Т а б л и ц а 4. Характеристики почвенных проб

Показатель	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Массовая доля золы, %	87,2	90,9	91,7	90,4	88,3	87,8	90,5
pH	7,10	7,20	7,10	7,30	7,30	7,40	7,50
Массовая доля общего фосфора, %	0,45	0,25	0,34	0,46	0,59	0,38	0,41
Массовая доля общего калия, %	0,58	0,37	0,44	0,66	0,86	0,59	0,58
Массовая доля общего азота, %	0,75	0,39	0,43	0,58	0,63	0,57	0,55
Масса аммиачного азота, мг/100 г сухого вещества (для органических удобрений)	6,50	4,00	3,50	4,50	6,20	5,30	5,20
Масса нитратного азота, мг/100 г сухого вещества	14,40	2,40	16,60	8,70	23,70	8,30	6,00

Согласно табл. 4, больше всего аммиачного азота зарегистрировано в загрязненном субстрате с микробным препаратом (вариант 1). Согласно полученным данным, содержание аммиачного азота в загрязненной почве без микробного препарата (вариант 2) было ниже, чем в почве с микробным препаратом.

Анализ полученных в эксперименте данных выявил обратную корреляцию между инвертазной активностью и массовой долей общего азота в образцах субстратов ($r = -0,61$). Хотя максимальное количество нитратного азота зафиксировано в образце с самой высокой инвертазной активностью (вариант 5), корреляционная зависимость между данными показателями довольно слабая ($r = 0,35$). Самое высокое содержание общего и аммиачного азота зафиксировано в субстрате № 1 (загрязненная дизелем почва с микробным препаратом).

Корреляционной зависимости между содержанием в субстратах калия, фосфора и дегидрогеназы не обнаружено. Также не выявлено связи между содержанием данного фермента и кислотностью субстратов. Тем не менее, максимальное содержание и калия, и фосфора зарегистрировано в конце опыта в незагрязненном субстрате с навозными червями. В этом же 5-м варианте зарегистрированы самые высокие концентрации инвертазы. Загрязненная дизельным топливом почва (вариант 2) характеризовалась самыми низкими значениями массовой доли фосфора и калия.

Заключение. После загрязнения почвы дизельным топливом ее дегидрогеназная активность повысилась в 1,28 раза, инвертазная – в 1,07 раза. По результатам измерений можно заключить, что ферментативная активность в почве, загрязненной дизельным топливом, без добавок, за месяц вернулась к исходному уровню под воздействием микробиологического препарата «Экобел». Можно предположить, что в варианте 6 под воздействием культуры дождевых червей загрязнение почвы снизилось: данный субстрат характеризовался невысокой как дегидрогеназной, так и инвертазной активностью.

Одновременное внесение в загрязненный субстрат микробного препарата и подкормки для дождевых червей (навоз КРС) обеспечивает организмы-нефтедеструкторы дополнительными легкоусвояемыми источниками энергии. Микробы создают пищевую конкуренцию культивируемым популяциям дождевых червей, что снижает эффективность внесения последних в загрязненный субстрат и сокращает их численность. В грядах с микробным препаратом и навозом дегидрогеназная активность выше, чем в незагрязненной почве и в загрязненной, но без навоза.

По результатам проведенного опыта и последующих анализов сложно говорить о полной очистке или восстановлении почвы за 3 мес., поскольку внесение в субстрат дополнительного органического вещества полностью меняет состав субстрата и его микробные характеристики.

Список использованной литературы

1. Павлова, Н. Н. Пространственно-временные изменения биологической активности городских почв: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16; 03.00.07 / Н. Н. Павлова. – М., 2008. – 21 с.
2. Габбасова, И. М. Оценка состояния почв с давними сроками загрязнения сырой нефтью после биологической рекультивации / И. М. Габбасова, Ф. Х. Хазиев, Р. Р. Сулейманов // Почвоведение. – 2002. – № 10. – С. 1259–1273.
3. Сулейманов, Р. Р. Изменение свойств нефтезагрязненной серой лесной почвы в процессе биологической рекультивации / Р. Р. Сулейманов, И. М. Габбасова, Р. И. Ситдинов // Изв. РАН. Сер. биол. – 2005. – № 1. – С. 109–115.

4. *Хазиев, Ф. Х.* Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев // Ин-т биологии Уфим. НЦ. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
5. *Хазиев, Ф. Х.* Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти / Ф. Х. Хазиев, Ф. Ф. Фатхиев // Агрохимия. – 1981. – № 10. – С. 102–111.
6. *Миненко, А. К.* Изменение биологической активности дерново-подзолистых почв при их окультуривании / А. К. Миненко; ВНИИ «Агроэкоинформ», 2009. – 16 с.
7. *Тарасевич, А. Ю.* Влияние загрязнения почв нефтью и дизельным топливом на культивируемые популяции навозных червей, их репродуктивную способность / А. Ю. Тарасевич // Земляробства і ахова раслін. – 2012. – № 2. – С. 25–27.
8. Environment Canada (EC). 2004. Biological Test Method: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*) // Report EPS. – Ottawa, Ontario, 2004. – 184 p.
9. International Standard ISO 11268-3 (1999): Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). – Part 3: Determination of effects in field situations. International Organization for Standardization, Genf.
10. *Галицкая, П. Ю.* Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем: учеб.-метод. пособие / П. Ю. Галицкая, С. Ю. Селивановская, Р. Х. Гумерова. – Казань, 2011. – 47 с.
11. Фотометры фотоэлектрические КФК-3: руководство по эксплуатации. – М., 2004. – 42 с.

Поступила в редакцию 21.03.2016