

## ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВОГРУНТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОСОРБЕНТА

Н.В. Фомина

ФГБОУ ВО Красноярский государственный аграрный университет,  
РФ, г. Красноярск, пр. Мира, 90  
*E-mail: Natvalf@mail.ru*

Показана возможность использования показателей протеолитической активности нефтезагрязненного почвогрунта, в качестве оценивающего как его исходное состояние, так и эффективность применения сорбента. Определено, что чем выше уровень загрязнения почвогрунта, тем сильнее показатели биологической активности реагируют на применение сорбента и проявляется эффект его положительного действия. Модельные опыты с искусственным загрязнением почвогрунтов позволяют выявить как наиболее адекватные критерии его оценки, так и определить направленность изменений, возникающих в ферментативной системе.

**Ключевые слова:** активность, почвогрунт, фермент, сорбент, микроорганизмы, протеаза.

**Введение.** Загрязнение нефтепродуктами почвы создает новую экологическую обстановку, что приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов или их полной трансформации. Экологическое обследование техногенно загрязненного почвогрунта может быть проведено с использованием методов биодиагностики, которые позволяют получить интегральную и адекватную оценку качества окружающей среды [1–3].

Для испытания экологической безопасности сорбентов и оценки их эффективности необходимы адекватные критерии или показатели, которые позволили бы определять функциональное состояние почвы и уровень токсичности, возникающий в результате действия загрязнителей. В качестве такого критерия может быть использован уровень протеолитической активности почвы. Известно, что протеолиз – это процесс преобразования сложных органических азотсодержащих соединений, являющийся целостным показателем экологического благополучия почвы [4–6]. Дополнительное поступление органических веществ в виде нефтяного загрязнения на первых этапах и при низких концентрациях может даже незначительно усиливать протеолитическую активность. Являясь субстратом для аммонификаторов, нефть активизирует их деятельность.

Цель исследования – изучить протеолитическую активность почвогрунта, загрязненного нефтью до и после применения биологически активного сорбента.

**Материалы и методы.** В процессе работы исследовались экологические показатели, позволяющие провести комплексную оценку состояния загрязненного почвогрунта. Изучали равномерное загрязнение нефтью всего объема почвогрунта. После внесения загрязняющего вещества почвогрунт в сосуде перемешивали и компостировали при комнатной температуре (20–22°C) и оптимальном увлажнении (60% от ПВ) в трехкратной повторности в течение 1 недели, 1 и 2 месяцев. Через указанный период всю массу почвогрунта извлекали из вегетационного сосуда и перемешивали, тем самым получали «средний образец», из которого отбирали пробы на определение показателей протеолитической активности.

В процессе анализа использовался грунт «Универсальный». Торфяной питательный грунт из верхового торфа с добавлением песка, известковых материалов, макро и микроэлементов. Состав: азот ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) – 300 мг/кг;  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 300 мг/кг; калий ( $\text{K}_2\text{O}$ ) – 400 мг/кг. Все образцы были установлены в лаборатории при естественном освещении в вегетационных сосудах массой 1 кг и влажностью грунта 60%. При искусственном

загрязнении использовали нефть, отобранную из магистрального нефтепровода ОАО «Транснефть». Нефть сырья Сургутского месторождения.

Побор концентрации нефти проводили в соответствие с градацией степени загрязнения от легкой до очень высокой.

*Схема опыта:*

Контроль (грунт без обработки).

Грунт+сорбент «Унисорб-био»;

1% загрязнение почвогрунта нефтью;

1% загрязнение

нефтью+сорбент «Унисорб-био»;

5% загрязнение нефтью;

5% загрязнение нефтью+сорбент «Унисорб-био»;

10% загрязнение нефтью;

10% загрязнение нефтью+сорбент «Унисорб-био».

Количество вносимого сорбента рассчитывали в зависимости от уровня загрязнения. Все показатели изучали в динамике через 1, 2 и 3 месяца инкубации грунта.

Сорбционная очистка от нефти является одним из самых эффективных методов. К преимуществам данного метода, относится – возможность удаления любых загрязнений практически до минимальной остаточной концентрации, управляемость процессом и быстрота воздействия. Плюсами использования полимерных сорбентов является их относительная дешевизна в производстве, легкость и безопасность в служебном обращении, а главное экологичность.

Сорбент серии «Унисорб-био» представляет собой мезопористый полимерный материал с открытой ячеистой высокоразвитой структурой и удельной поверхностью и относится к классу сорбентов искусственного происхождения и получен путем иммобилизации ассоциированных нефтеокисляющих микроорганизмов и адаптированных биокультур на полимерный носитель пороаминопласт. Сорбент легко внедряется в толщу нефтяного слоя, существенно снижает продолжительность детоксикации нефти, предотвращает вымывание микроорганизмов из мест обработки, поддерживает водный баланс и улучшает структуру почв.

Активность фермента протеазы определяли по методу Гоффмана и Тей-

хера (1957) при длине волны 650 нм и выражали в мг аминного азота / 10 г почвы за 20 часов. Численность микроорганизмов-аммонификаторов учитывали на среде МПА, стандартным методом разведения почвенной суспензии. Все лабораторно-аналитические исследования выполнены с использованием общепринятых в почвоведении и биологии методов [7].

**Результаты исследования.** Биологические свойства почвы реагируют на нефтяное загрязнение первыми: изменяется общая численность микроорганизмов, их качественный состав, структура микроценозов, интенсивность микробиологических процессов и активность почвенных ферментов, продуктивность почв и т.д., нарушаются экологические и сельскохозяйственные функции почв. При изучении динамики численности определено, что в вариантах с минимальным уровнем загрязнения (1% и 2,5%), происходит постепенное увеличение количества микроорганизмов исследуемой группы за счет собственного самоочищения (рис. 1).

Исследуемый сорбент через месяц инкубации способствовал незначительному увеличению численности микрофлоры, за счет иммобилизованных форм микроорганизмов на полимерный носитель.

Численность микроорганизмов-протеолитиков постепенно стабилизируется в почвогрунте к концу инкубации и при высоком уровне загрязнения (10%), причем в вариантах с применением сорбента количество аммонификаторов уже с первого момента исследования была выше. При разработке приемов микробного восстановления нефтезагрязненных почв, а также при выборе оптимального способа очистки необходим комплексный многоплановый подход. Разносторонний подход к экологической оценке нефтезагрязненных почв и почвогрунтов в дальнейшем, несомненно, будет способствовать отработке и совершенствованию принципов биоремедиации.

В ходе работы была изучена активность фермента протеазы. Установлено, что средняя протеолитическая активность незагрязненного почвогрунта со-

ставляет 0,79 мг аминного азота на 1 г почвогрунта, тогда как при внесении сорбента происходит незначительное

снижение ее активности до 0,63 мг аминного азота на 1 г почвогрунта (рис. 2).

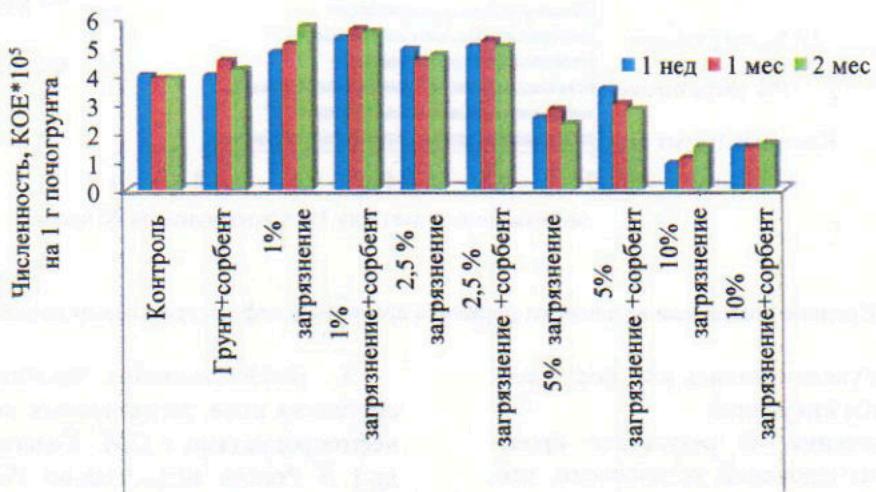


Рис. 1. Средние показатели численности аммонификаторов в исследуемом почвогрунте

Протеолитическая активность почв – один из видов биологической активности, отражающая деятельность почвенных протеаз, катализирующих гидролитическое расщепление белков и полипептидов. Уровень минимального загрязнения (1%) не способствовал снижению активности протеазы, а наоборот привел к незначительному увеличению показателей, причем, в течение периода наблюдения изменялся в пределах от 0,77 до 0,80 мг аминного азота на 1 г почвогрунта, постепенно увеличиваясь к концу инкубации. Применение же сорбента при данной концентрации нефти снизило активность до 0,54 мг аминного азота на 1 г почвогрунта (рис. 2).

Известно, что при нефтяном загрязнении почвогрунта, в связи с гидрофобной способностью нефти ухудшается кислородный режим, что приводит к снижению активности аэробных почвенных микроорганизмов, в частности аммонификаторов, которые являются основными продуцентами фермента протеазы.

При следующем уровне загрязнения (2,5%) по сравнению с контролем происходило снижение активности до 0,67 мг, а в варианте с применением сорбента

до 0,55 мг. Аналогичный уровень активности протеазы отмечался и в почвогрунте, загрязненном нефтью в концентрации 5%, однако, при добавлении сорбента активность увеличилась и достигла значений достоверно не различающихся с контролем – 0,73 мг аминного азота на 1 г почвогрунта.

Действительно, протеолиз служит пусковым механизмом, включающим все последующие этапы преобразования белков, поэтому протеолитическая активность почвы – важнейшее ее свойство, способствующее круговороту иммобилизованного азота. Загрязнение почвы может изменить направление почвенно-биологических процессов, что получает свое отражение и на интенсивности, в том числе направленности разрушения азотистых соединений.

Максимальное же загрязнение почвогрунта (10%) привело к достоверному снижению протеолитической активности до 0,56 мг, тогда как в варианте с сорбентом, наоборот, активность увеличилась до 0,70 мг аминного азота на 1 г почвогрунта.

Определенной тенденции изменения активности протеазы за весь период исследования не установлено, при этом показатели в вариантах с сорбентом в

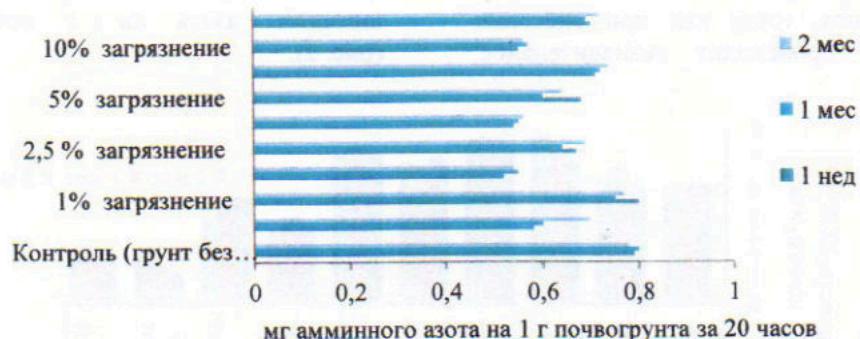


Рис. 2. Средние показатели активности фермента протеазы в нефтезагрязненном почвогрунте

основном увеличивались уже после первого месяца инкубации.

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что, чем выше уровень загрязнения почвогрунта в вариантах с применением сорбента, тем более интенсивно происходит восстановление показателей протеолитической активности. Только при высоких концентрациях нефти проявляется наибольшая эффективность действия сорбента, так как показатели возвращаются к контрольным значениям.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятова Т.А. Биодиагностика техногенного загрязнения почв // Экология и промышленность России, 2006. С. 36–37.
2. Казеев К.Ш., Колесников С.И., Вальков В.Ф. Биологическая диагностика и индикация почв: методология и методы исследований // Ростов н/Д.: Изд-во РГУ, 2003. 216 с.
3. Биодиагностика экологического состояния почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников [и др.] // Ростов н/Д.: Изд-во Ростиздат, 2007. 192 с.
4. Новоселова Е.И. Биодиагностика и мониторинг состояния загрязненных нефтью почв // Матер. междунар. конф. «Экология и биология почв». Ростов-на-Дону, 2004. С. 201.
5. Изменение биологической активности загрязненной углеводородами почвы / Е.В. Плещакова, А.Ю. Муратова, О.В. Турковская // Поволжский экологический журнал. № 4. 2011. С. 482–488.
6. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева [и др.] // М., 2008. 288 с.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 303 с.

#### PROTEOLYTIC ACTIVITY OF SOILS FROM THE USE BIOSORBENTS

N.V. Fomina

Krasnoyarsk State Agrarian University, Russian Federation, Krasnoyarsk, av. Mira, 90

The possibility of use of indicators of proteolytic activity of the petropoluted soil, as estimating both its initial condition, and efficiency of application of a sorbent is shown. It is determined that the soil pollution level is higher, the stronger indicators of biological activity react to application of a sorbent and the effect of its positive action is shown. Model experiences with artificial pollution of soils allow to reveal as the most adequate criteria of its assessment, and to determine an orientation of the changes arising in enzymatic system.

**Keywords:** activity, soils, enzyme, sorbent, microorganisms, protease.