



жание лектина пшеницы», характерный, по крайней мере, для одного сорта яровой мягкой пшеницы – Саратовская 29. Целесообразно изучить модификационную изменчивость по этому признаку у пшениц более широко и при высоком ее уровне у других сортов использовать эту особенность пшениц для создания наборов образцов семян, контрастных по содержанию АЗП.

Благодарим доктора сельскохозяйственных наук профессора Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова Ю.В. Лобачева за предоставление семян растений пшеницы сорта Саратовская 29, выращенных в различных условиях.

#### Библиографический список

1. Дорощев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчатинова О.Д., Шитова И.П., Мережеко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л., 1987. 560 с.
2. Конарев В.Г. Белки пшеницы. М., 1980. 351 с.
3. Бебякин В.М., Старичкова Н.И. Диаллельный анализ содержания белка в зерне яровой твердой пшеницы и генетические свойства некоторых сортов // Вестн. с.-х. науки. 1991. №10. С.91–95.
4. Бебякин В.М., Звягина Ю.Ю., Кибкало И.А., Старичкова Н.И. Изменчивость показателей гидрофобных взаимодействий в белковом комплексе клейковины и эффективность отбора по ним в селекционном питомнике // Вестн. СГАУ им. Н.И. Вавилова. 2002. №2. С.51–54.
5. Бебякин В.М., Старичкова Н.И. Фенотипическая стабильность показателей амилотической активности зерна яровой мягкой пшеницы в зависимости от генотипа // Вестн. СГАУ им. Н.И. Вавилова. 2005. №2. С.3–5.
6. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журн. общей биологии. 2007. Т. 68, №2. С.98–114.
7. Peumans W.J. Biochemistry, cell-biology, physiology, biosynthesis and function of gramineae lectins. Leuven, Katholieke Univ. 1984.
8. Smith J.J., Raikhel N.V. Nucleotide sequences of cDNA clones encoding wheat germ agglutinin isolectins A and D // Plant Mol. Biol. 1989. Vol.13, №5. P.601–603.
9. Антонюк Л.П. Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // Молекулярные основы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. М., 2005. С.118–159.
10. Tabe L., Hagan N., Higgins T.J. Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. Vol.5, №3. P.212–217.
11. Колпакова В.В., Молчанова Е.Н., Васильев А.В., Чумкина Л.В. Физико-химические свойства белков пшеницы, выращенной в резко контрастных климатических условиях // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т.43, №3. С.382–390.
12. Бабаша А.В. Изменение содержания агглютинина зародышей пшеницы в растениях, обработанных перекисью водорода // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т.42, №2. С.247–251.
13. Хайруллин Р.М. Роль анионных пероксидаз и агглютинина зародыша в реакциях пшеницы на грибную инфекцию: Дис. ... д-ра биол. наук. Казанский институт биохимии и биофизики РАН. Казань, 2001. 292 с.
14. Антонюк Л.П., Игнатов В.В. О роли агглютинина зародышей пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // Физиология растений. 2001. Т.48, №3. С.427–433.
15. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Canadian Journal of Microbiology. 2004. Vol.50, №8. P.521–577.
16. Антонюк Л.П., Евсеева Н.В. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа // Микробиология. 2006. Т.75, №4. С.544–549.
17. Бебякин В.М., Старичкова Н.И., Дорогобед А.А. Качество зерна пшеницы в зависимости от сорта и условий произрастания // Зерновое хозяйство. 2003. №3. С.22–24.

УДК 579.222.2:579.252.5

## АКТИВНОСТЬ ДЕГИДРОГЕНАЗ В НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ КАК ИНСТРУМЕНТ МОНИТОРИНГА ТЕХНОЛОГИЙ БИОРЕМЕДИАЦИИ

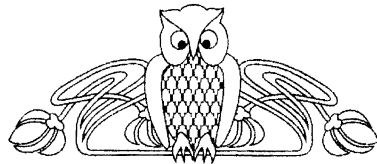
Е.В. Плешакова\*, Е.Г. Кабанцева, В.С. Черновол

Саратовский государственный университет

E-mail: biofac@sgu.ru

\* Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: ecbio@ibppm.sgu.ru



В лабораторных экспериментах изучена динамика активности дегидрогеназ в нефтезагрязненной почве южного чернозема в процессе самоочищения и при использовании двух приемов ремедиации: стимуляции естественной микрофлоры и интродукции активного нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* AM3. Показано, что активность дегидрогеназ целесообразно исполь-

зовать для оценки начальных процессов биостимуляции и для мониторинга хода ремедиации при биоаугментации.

**Ключевые слова:** нефтезагрязненная почва, биоремедиация, стимуляция аборигенной микрофлоры, интродукция штамма *Dietzia maris* AM3, активность дегидрогеназ.



## Dehydrogenase Activity in Oil-Contaminated Soils as a Monitoring Instrument of Bioremediation Technologies

E.V. Pleshakova, E.G. Kabantseva, V.S. Chernovol

The dynamics of dehydrogenase activity in a southern chernozemic oil-contaminated soil during natural attenuation and by using two remediation techniques (stimulation of an indigenous microflora and introduction of active oil-oxidizing *Dietzia maris* strain AM3) was examined in laboratory experiments. It was shown that dehydrogenase activity expediently use to estimate the initial bioremediation processes and for monitoring the remediation process by bioaugmentation.

**Key words:** oil-contaminated soil, bioremediation, stimulation of an indigenous microflora, introduction of *Dietzia maris* strain AM3, dehydrogenase activity.

При использовании технологий биоремедиации нефтезагрязненных почв основным показателем их эффективности нередко служит конечный результат – ускорение процесса очистки почвы от нефтяного загрязнения. Однако уменьшение концентрации загрязнителя в почве, по которой контролируется биоремедиация, не всегда отражает снижение его токсичности для живых организмов [1, 2]. Процесс ремедиации почвы, загрязненной углеводородами, традиционно контролируется с помощью сложных и нередко дорогих химических методов [3]. В последнее время находят широкое применение методы биотестирования с использованием микроорганизмов, микроводорослей, равноресничных инфузорий, низших ракообразных, высших растений, дождевых червей и др. [4–6]. У биотестов, к сожалению, есть ряд недостатков: неразличимость токсичности исходных загрязнителей и их метаболитов; биоиндикаторный ответ не всегда коррелирует с концентрацией загрязнителя; чувствительность тестов во многом зависит от физико-химических свойств почвы (органической составляющей, пористости, pH и др.) и времени контактирования с загрязнителем [3, 7].

В связи с этим поиск показателей для мониторинга процессов биоремедиации нефтезагрязненных почв продолжается, среди них очень перспективными являются активности почвенных ферментов. Почвенные ферменты катализируют важные метаболические процессы, включая разложение органических отходов и детоксикацию ксенобиотиков, их активность определяется с высокой точностью и является устойчивым и чутким

показателем биогенности почв [8, 9]. Известно, что ни один биологический процесс не совершается без участия широко распространенных у почвенных микроорганизмов ферментов дегидрогеназ, которые катализируют реакции дегидрирования органических веществ и выполняют функцию промежуточных переносчиков водорода, таким образом, принимая непосредственное участие в разложении углеводов [10]. Было показано, что уровень их активности в почве является определенным критерием состояния почвы в отношении ее самоочищающей способности от нефтяных ингредиентов [11]. Выявлена также обратная корреляционная зависимость между активностью дегидрогеназ и содержанием нефти в почве [12].

В то же время деструкция нефти в окружающей среде – сложный многофакторный процесс, на который оказывают влияние состав, концентрация и срок действия загрязнителя, тип почвы, многообразие и изменчивость внешних факторов, под воздействием которых находится экосистема: температура, давление, влажность, состояние атмосферы и т.п. В связи с этим при восстановлении почв южного чернозема, которые преимущественно подвергаются загрязнению в Саратовской области, будет наблюдаться определенная специфика как при самоочищении, так и при использовании биотехнологий очистки. Целью наших исследований являлось изучение возможности применения показателей активности дегидрогеназ нефтезагрязненной почвы южного чернозема для контроля процессов биоремедиации.

### Методика

В экспериментах 1 и 2 использовали смешанный образец почвы южного чернозема, отобранной в Саратовской области, которую загрязняли сырой нефтью в концентрации 20 г/кг почвы. Исследования проводили в лабораторных условиях при 25–29°C, регулярной агротехнической обработке: рыхление один раз в неделю и поддержание влажности на уровне ~15%. При этом оценивали способность почвы к самоочищению и ее очистку с помощью приемов ремедиации: стимуляции и аугментации. Стимуляция аобо-



ригенного почвенного сообщества осуществлялась добавлением минерального удобрения отдельно или совместно со структуратором (древесные опилки). При аугментации штамм *Dietzia maris* AM3, выделенный нами из нефтяного шлама и идентифицированный в ВКПМ (г. Москва), интродуцировали в почву в концентрации  $1 \times 10^7$  кл/г одновременно с внесением структуратора и минерального удобрения.

Общую гетеротрофную микрофлору (ОГМ) в ходе ремедиации учитывали общепринятыми методами на МПА [13]. Угледородородокисляющие микроорганизмы (УОМ) выявляли на агаризованной минеральной среде с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии [14]. Динамика численности интродуцированного штамма *D. maris* AM3 изучалась классическим методом подсчета его ярких кораллово-красных колоний на МПА [13], параллельно проводился твердофазный вариант иммуоферментного анализа [15]. Дегидрогеназную активность почвы определяли колориметрически по восстановлению 3,5-трифенилтетразолия хлорида до окрашенного соединения формазана [16]. Содержание углеводов нефти в почве в процессах биоремедиации определяли гравиметрически, в качестве элюента использовали тетра-хлорид углерода. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Microsoft Excel.

#### Результаты и их обсуждение

В эксперименте 1 исследовали самоочищение нефтезагрязненной почвы и ее ремедиацию с помощью стимуляции аборигенного сообщества при внесении минерального удобрения. В качестве контроля использовали чистую почву. После внесения нефти дегидрогеназная активность в почве снизилась в 1.5 раза (рис. 1, а), что связано с ингибированием интенсивности процессов ферментативного дегидрирования нефтяными углеводородами [17]. На всем протяжении эксперимента динамика активности дегидрогеназ в чистой почве и в варианте с самоочищением была сходной. Заметно отличался вариант почвы со стимуляцией естественного сообщ-

ества. Через 14 сут дегидрогеназная активность в этой почве превышала активность в других исследуемых вариантах в 2.4 и 2.7 раза, составляя  $3.254 \text{ Н}_2/\text{г сут}^{-1}$ . Далее во всех вариантах наблюдалось снижение активности дегидрогеназ, однако в почве со стимуляцией через 30 сут все еще сохранялось превышение над активностью в других почвенных образцах.

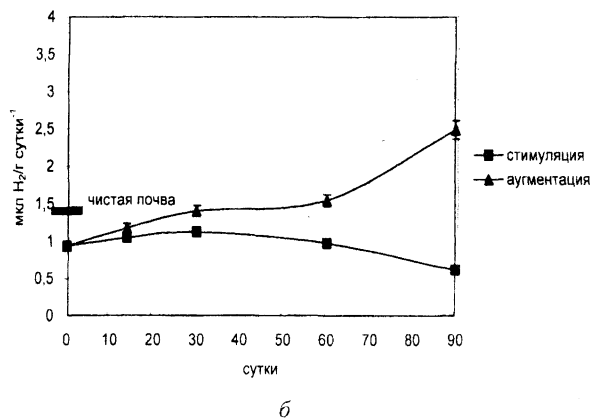
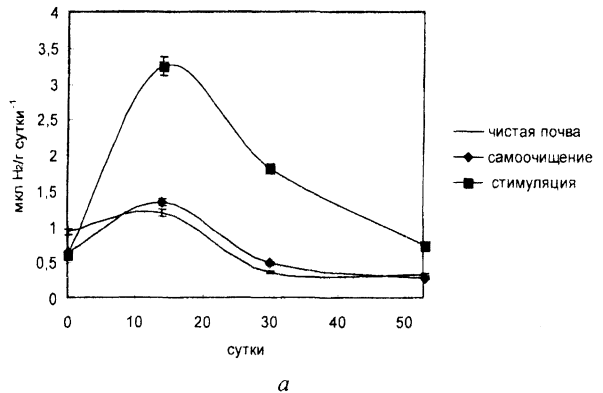


Рис. 1. Динамика активности дегидрогеназ в нефтезагрязненной почве: а – эксперимент 1; б – эксперимент 2

Микроорганизмы – основной источник продуцирования ферментов в почву. Поэтому изменения в их составе и численности, происходящие при загрязнении почвы нефтью и ее очистке, накладывают отпечаток и на активность ферментов. Но не всегда выявляется взаимосвязь, так как почвенные ферменты обладают определенной автономностью и в случае, когда окружающие условия неблагоприятны для жизнедеятельности микроорганизмов, метаболизм почвы может оставаться неизменным благодаря внеклеточной ферментативной активности.



Прием стимуляции аборигенного сообщества в нефтезагрязненной почве способствовал (рис. 2, а) увеличению численности ОГМ через 14 сут в 13 раз, через 30 сут – в 35 раз по сравнению с исходным содержанием ( $4,9 \times 10^6$  кл/г почвы). При самоочищении почвы от нефти численность ОГМ через 14 сут снижалась, вероятно, так проявлялось токсическое действие нефти на почвенный биоценоз. Через 30 сут наблюдались повышенные значения численности ОГМ, но всего лишь в 5 раз по сравнению с исходным содержанием. В контрольной чистой почве агротехнические приемы приводили к небольшому увеличению числа ОГМ на протяжении 30 сут. Далее во всех вариантах почвы численность ОГМ снижалась, достигая в конце эксперимента исходных значений.

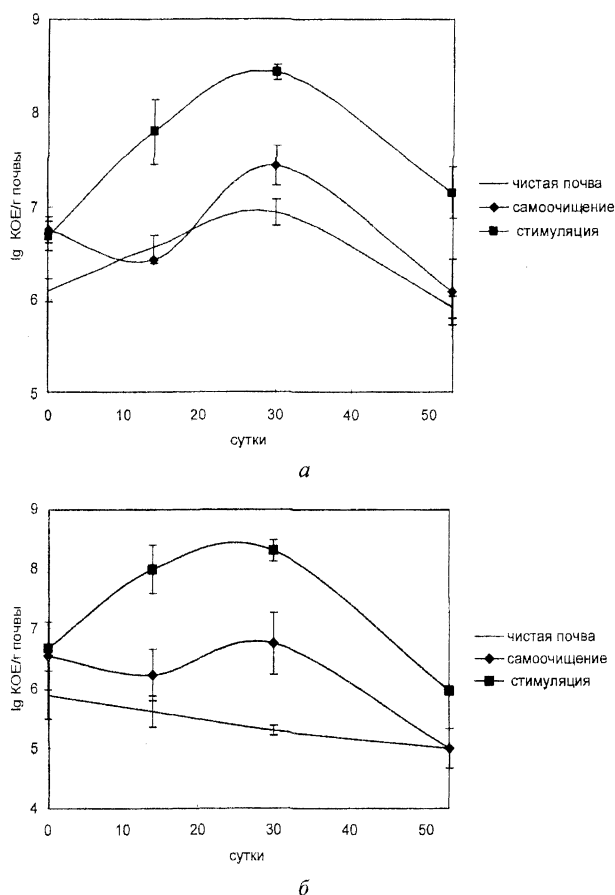


Рис. 2. Изменение численности ОГМ (а) и УОМ (б) в процессе ремедиации в эксперименте 1

Решающее значение для ремедиации почвы с нефтяным загрязнением имеет группа УОМ. Было показано (см. рис. 2, б), что в

почве при использовании технологии стимуляции происходило увеличение численности УОМ: через 14 сут – в 17 раз, через 30 сут – в 35 раз, что сравнимо с увеличением численности ОГМ в этой почве. При самоочищении группа УОМ ингибировалась нефтью через 14 сут, восстанавливала свою численность через 30 сут и после этого опять наблюдалась тенденция к уменьшению численности. В чистой почве интенсификации развития УОМ не происходило. Из приведенных результатов видно, что максимальное проявление активности дегидрогеназ, наблюдаемое через 14 сут ремедиации, коррелировало с интенсивным развитием ОГМ и УОМ в этот период. На протяжении всего этапа наблюдений установлены достоверные корреляционные взаимоотношения между численностью УОМ и активностью дегидрогеназы в варианте со стимуляцией аборигенного почвенного сообщества ( $R^2 = 0.60$ ), что свидетельствовало не только о развитии специализированной микрофлоры, но и повышении ее ферментативной активности.

В эксперименте 2 изучали эффективность применения двух способов ремедиации нефтезагрязненной почвы: стимуляции и аугментации. После внесения нефти в чистую почву дегидрогеназная активность, так же как и в эксперименте 1, снижалась: от 1.409 до 0.940 мкл  $H_2/г\ сут^{-1}$  (см. рис. 1, б). Спустя 30 сут этот показатель в варианте со стимуляцией несколько повысился, но все равно был ниже исходного, в то время как присутствие штамма-интродуцента в почве вернуло дегидрогеназную активность к норме (см. рис. 1, б). Через 90 сут в варианте с интродуцентом она составила 2.490 мкл  $H_2/г\ сут^{-1}$ , что в 4 раза превышало активность в почве при использовании стимуляции и в 2 раза – в исходной чистой почве.

Начало биоремедиационных мероприятий способствовало увеличению численности ОГМ (рис. 3, а). В результате стимулирующих приемов (внесение минерального удобрения совместно со структурактором) содержание ОГМ в почве достигло наивысших значений через 7 сут, увеличение происходило в 63 раза по сравнению с исходным содержанием. При интродукции нефтеокис-



ляющего штамма *D. maris* AM3 количество ОГМ максимально увеличилось через 14 сут в 220 раз по сравнению с начальным уровнем. В этот период наблюдалось также максимальное развитие штамма-интродуцента: до  $3.73 \times 10^9$  кл/г почвы, что примерно в 400 раз больше исходного уровня внесения. Через 14 сут была наиболее заметна разница в численности ОГМ между двумя вариантами очистки. После достижения максимума содержание внесенного штамма в почве к 30 сут заметно уменьшилось, и при дальнейшем постепенном снижении в конце эксперимента его численность достигла исходной концентрации. В то же время следует отметить, что титр штамма *D. maris* AM3 сохранялся на достаточно высоком уровне (около  $10^7$  кл/г почвы) до конца обработки, что свидетельствовало о жизнеспособности данного интродуцента. Количество гетеротрофных микроорганизмов также снижалось, приближаясь к начальному уровню в обоих вариантах, но до конца эксперимента в варианте с интродуцированным штаммом было несколько выше, чем при использовании стимуляции.

При изучении динамики развития УОМ в почве в ходе эксперимента 2 было показано (см. рис. 3, б), что их содержание так же, как и ОГМ, максимально увеличилось через 7 сут в случае стимуляции (на 3 порядка по сравнению с исходной чистой почвой) и через 14 сут при интродукции штамма-деструктора AM3 (на 4 порядка). Такое значительное увеличение этой группы микроорганизмов в данной почве могло быть связано как с действием свежего нефтяного загрязнения, которое, как известно [17], приводит к увеличению численности УОМ, так и с внесением стимулирующих препаратов. В этот период наблюдалась также наиболее заметная разница в содержании УОМ между вариантами обработки. Дальнейшая динамика развития УОМ была аналогична изменениям ОГМ в этих образцах.

Таким образом, присутствие штамма *D. maris* AM3 отчетливо увеличивало интенсивность дегидрогеназной активности в нефтезагрязненной почве. Повышенная активность дегидрогеназ в данной почве через 90 сут на фоне снижения численности мик-

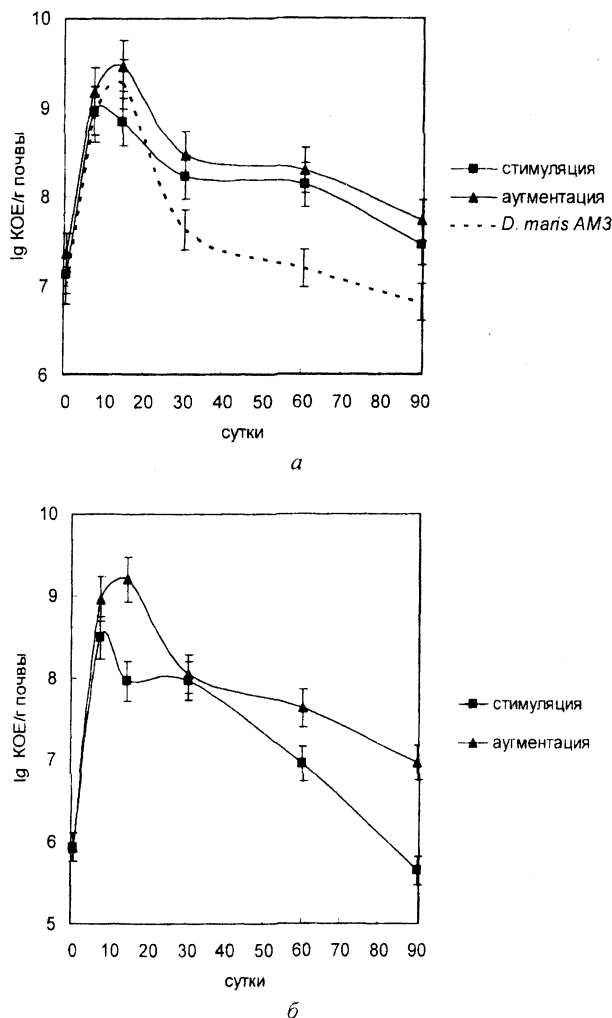


Рис. 3. Изменение численности ОГМ (а) и УОМ (б) в процессе ремедиации в эксперименте 2

роорганизмов (как интродуцента, так и аборигенных) может свидетельствовать об экскреции внутри- и внеклеточных ферментов интродуцированного штамма-деструктора в почву и сохранении в течение длительного времени своей активности.

Одновременно с изучением динамики активности дегидрогеназ в почве и развития микроорганизмов определялась убыль нефтепродуктов (рис. 4). В эксперименте 1 убыль общих нефтепродуктов при стимуляции естественного почвенного сообщества в ходе очистки была выше на 13–15%, чем при самоочищении почвы. Интродукция *D. maris* AM3 во втором эксперименте приводила к снижению содержания общих углеводов в почве на 39% за 30 сут. Стимуляция аборигенного микробного сообщества за тот же

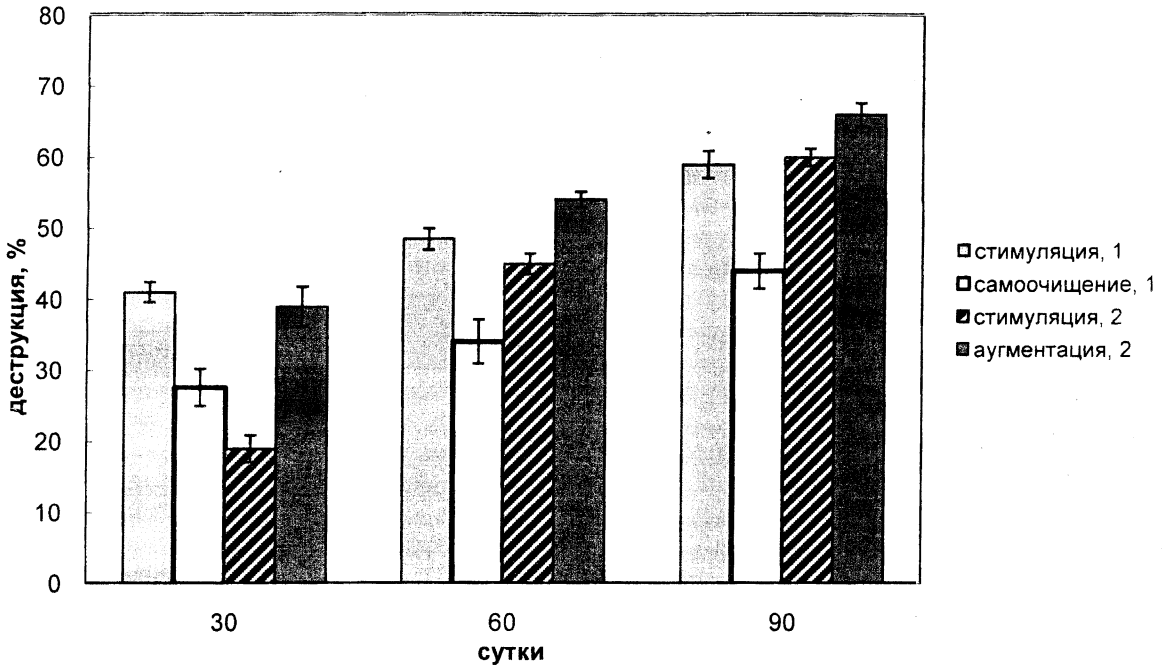


Рис. 4. Изменение содержания общих нефтепродуктов в ходе экспериментов 1 и 2

период привела к снижению содержания углеводов на 19% (см. рис. 4). Значительная разница в убыли нефти свидетельствовала о высокой активности интродуцированного штамма в течение первого месяца очистки. Через 90 сут эта разница исчезала. Разрушение углеводов в почве при внесении штамма *D. maris* AM3 достигало 66, а при стимуляции – 60%.

В эксперименте 2 используемые приемы ремедиации обнаруживали противоположную зависимость дегидрогеназной активности от концентрации общих нефтепродуктов (рис. 5): при стимуляции аборигенных микроорганизмов дегидрогеназная активность плавно снижалась с убылью загрязнителя, при внесении штамма-деструктора ее максимальные показатели соответствовали минимальному содержанию нефтепродуктов. Из-

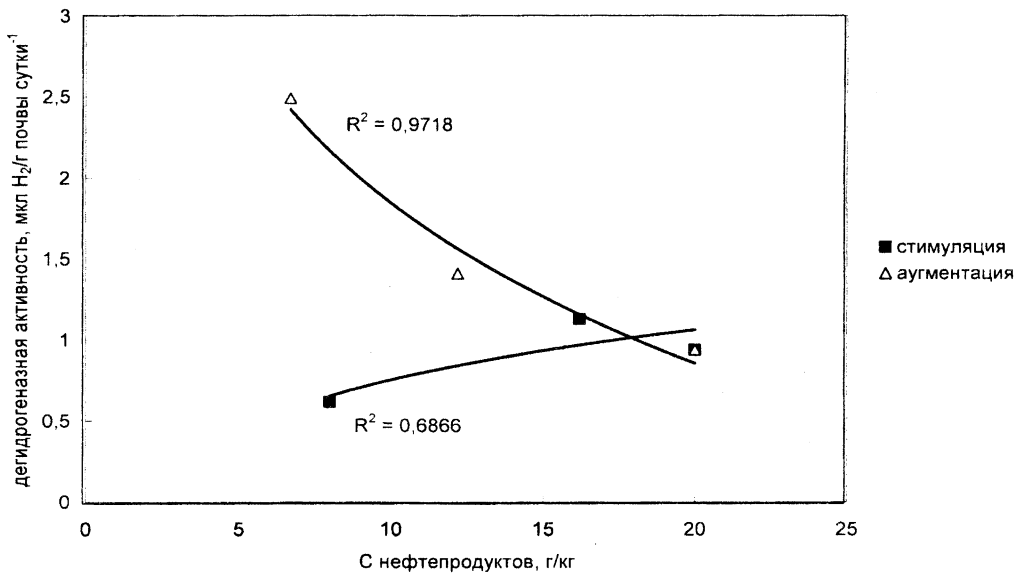


Рис. 5. Зависимость дегидрогеназной активности от концентрации нефтепродуктов в эксперименте 2



вестно, что активность дегидрогеназ может ингибироваться продуктами деградации углеводов, которые накапливаются в почве и оказывают токсическое действие, несмотря на снижение концентрации загрязнителя в почве [18]. Возможно, этим объяснялся характер зависимости, наблюдаемый в варианте со стимуляцией в экспериментах 1 и 2.

Таким образом, проведенные исследования показали, что максимальная дегидрогеназная активность нефтезагрязненной почвы южного чернозема при очистке с помощью приема стимуляции соответствовала максимальному развитию микроорганизмов и скорости биodeградации нефтяных углеводов в первый месяц ремедиации. После того, как уменьшалась скорость биodeградации, активность дегидрогеназ быстро снижалась, поэтому данный показатель можно использовать для установления начальных, наиболее интенсивных этапов биodeградации при стимуляции аборигенной микрофлоры. При интродукции в почву активного нефтеокисляющего штамма *D. maris* AM3 почва через 3 месяца очистки отличалась высокой дегидрогеназной активностью, которая обратно коррелировала с низким остаточным содержанием нефти, что свидетельствовало о восстановлении биологических свойств почвы. В связи с этим активность дегидрогеназ при использовании технологии аугментации целесообразно применять в качестве инструментов мониторинга для оценки начальных и конечных процессов биоремедиации.

#### Библиографический список

1. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Онегова Т.С., Бакаева М.Д. Комплексная биоремедиация нефтезагрязненных почв для снижения токсичности // Биотехнология. 2004. №6. С.63–70.
2. Phillips T.M., Liu D., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests // J. of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2000. Vol.24. P.132–139.
3. Maila M.P., Cloete T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review // International Biodeterioration & Biodegradation. 2005. Vol.55. P.1–8.
4. Dorn P.B., Vipond T.E., Salanitro J.P., Wisniewskie H.L. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants // Chemosphere. 1998. Vol.37. P.845–860.
5. Фомченков В.М., Ирхина И.А., Новиков И.А., Гуров Б.Н., Чугунов В.А., Холоденко В.П. Исследование интегральной токсичности водной среды, загрязненной нефтью и нефтепродуктами, с использованием бактериальных тестов // Прикл. биохим. и микробиол. 2000. Т.36, №6. С.656–660.
6. Терехова В.А., Арчегова И.Б., Хабибуллина Ф.М., Пугачев В.Г., Тулянкин Г.М. Экотоксикологическая оценка биосорбента нефти с целью сертификации // Экология и промышленность России. 2006. №3. С.34–37.
7. DeVlieghe W., Verstraete W. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspective for site remediation // Biodegradation. 1996. Vol.7. P.471–485.
8. Pascual J.A., Garcia C., Hernandez T., Moreno J.L., Ros M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes // Soil Biol. Biochem. 2000. Vol.32. P.1877–1883.
9. Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell'Amico E., Colombo M., Gianfreda L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils // Chemosphere. 2004. Vol.57. P.401–412.
10. Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Онегова Т.С. Активность каталазы и дегидрогеназы в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Агрохимия. 2002. №8. С.64–72.
11. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М., 1988. С.7–22.
12. Skujins J. History of abiotic soil enzyme research // Soil Enzymes / Ed. R.G. Burns. N.Y., 1978. P.1–49.
13. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М., 1976. 307 с.
14. Гузев В.С., Халимов Э.М., Волде М.И., Куличевская И.С. Регуляторное действие глюкозы на активность углеводородокисляющих микроорганизмов в почве // Микробиология. 1997. Т.66, №2. С.154–159.
15. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т.Нго и Г.М.Ленхоффа. М., 1988. 446 с.
16. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М., 2005. 252 с.
17. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа, 2001. 376 с.
18. Margesin R., Walder G., Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil // Acta Biotechnologica. 2000. Vol.20. P.313–333.