

УДК 624.131.4:577.151.45

## ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕССОВЫХ ПОРОД ПРИ УГЛЕВОДОРОДНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ

© 2016 г. И. Ю. Григорьева\*, Д. П. Припачкина\*, М. А. Gladченко\*\*

\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
геологический факультет, кафедра инженерной и экологической геологии,  
Ленинские горы, Москва ГСП-1, 119991 Россия.

E-mail: ikagrign@inbox.ru; dasha.pripachkina@yandex.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,  
кафедра химической энзимологии, Ленинские горы, д. 1, стр. 3,  
Москва, ГСП-1, 119991 Россия. E-mail: gladmarina@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.09.2015 г.

Рассмотрено одно из малоизученных биотических свойств грунтов – ферментативная активность. Показано, что это свойство может быть использовано для оценки уровня техногенного воздействия на грунт, в том числе и при углеводородном загрязнении. Исследования проведены на образцах лессовидной супеси, в качестве загрязнителя использовано дизельное топливо. Экспериментально оценены активность ферментов: дегидрогеназы, пероксидазы и уреазы и их реакция на углеводородное загрязнение. В результате экспериментальных исследований определены наиболее информативные показатели ферментативной активности лессовидной супеси; выявлено, что характер ответных реакций на загрязнение определяется типом анализируемого фермента. Скорость восстановления уровня ферментативной активности в загрязненных грунтах свидетельствует о том, что лессовые породы имеют высокий потенциал к самоочищению.

**Ключевые слова:** фермент, молекулярная активность фермента, оптическая плотность, лессовидная супесь, дегидрогеназа, пероксидаза, уреазы.

### ВВЕДЕНИЕ

Ферментативная активность – один из критериев, используемых для оценки состояния окружающей среды. В настоящее время наблюдается усиление воздействия на компоненты окружающей среды предприятий нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности: участились случаи аварийных разливов жидких углеводородов, и достаточно остро встал вопрос о реабилитации нефтезагрязненных территорий, способности природных систем, в том числе и эколого-геологических систем, к саморегулированию под действием внешних факторов. Ферментативная активность является косвенной характеристикой биотических свойств грунтов и тесно связана с их способностью к самовосстановлению, что и определяет актуальность рассматриваемого вопроса. Традиционно этот показатель используется для оценки антропогенного воздействия на почвенный горизонт [8, 13]. Преимущество использования показателей ферментативной активности с позиций почвоведения заключается не

только в осуществимости быстрого определения изменений в экосистемах на ранних стадиях, но и возможности прогнозирования степени и направленности изменений, происходящих в них. Тем не менее многими исследователями отмечается, что имеющиеся в настоящее время сведения об изменении ферментативной активности при различных антропогенных воздействиях даже в отношении почв недостаточны. В связи с этим была поставлена цель оценки уровня ферментативной активности лессовых пород и изучения характера ее изменения при загрязнении жидкими углеводородами. Следует отметить, что использование показателя ферментативной активности в отношении лессовых пород носит во многом пионерный характер [4].

### ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Ферменты – это белки либо рибонуклеиновые кислоты (РНК), образующиеся, соответственно, в лизосомах и рибосомах клеток, но способные функционировать и вне живых организмов. Они

ускоряют реакции в миллионы раз. Например, оротидин-5-фосфат-декарбоксилаза в  $10^{17}$  раз ускоряет реакцию, которая без ее участия протекает с периодом полуреакции в 78 млн лет [1]. Ферменты способствуют разрушению одних и синтезу других химических связей между компонентами субстрата. При этом действует следующий принцип: один тип реакции – один фермент. В 1964 г. в литературе было описано только 800, хотя есть предположение, что в природе существует около 25 000 ферментов [2]. На сегодняшний день описано свыше 3000 различных ферментов. Благодаря белковой природе эти вещества обладают свойством лабильности, в силу чего их ферментативная активность зависит от многих факторов: pH, температуры, концентрации субстрата, ионной активности среды. Поэтому работать с чистыми ферментами рекомендуется при определенных условиях, а хранить при отрицательных температурах.

Ферменты поступают в грунт с прижизненными выделениями растений и животных, а также после их отмирания. Они значительное время сохраняют свою активность благодаря фиксации (иммобилизации) глинистой и пылевой фракциями грунтов, а также органическим веществом, содержащимся в них. Именно поэтому для изучения ферментативной активности авторами выбраны лессы – грунты со значительным количеством пылевой фракции. Бактерии, грибы, корневые системы растений с помощью ферментативного аппарата внутри или внеклеточным способом совершают огромную работу по превращению веществ, а поскольку в грунтовом агрегате таких организмов миллиарды, ферментативную активность, на взгляд авторов, целесообразнее рассматривать как функцию самого грунта.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЙ

*Исследуемый грунт* – лессовидная супесь, отобранная на территории Волгоградской обл. В Нижнем Поволжье лессовидные супеси представлены верхнечетвертичными континентальными отложениями ательской свиты (QШat) [7]. На территории региона выделяют три нефтегазодобывающих района: Арчединский, Жирновский и Коробковский. С 1976 г. проводятся гидролокационные и геофизические исследования, которые показали, что добыча углеводородов и их трубопроводная и надземная транспортировка негативно повлияли на состояние окружающей среды [6]. На территории области выявлено существенное загрязнение грунтов нефтью и нефтепродуктами. Образец исследуемого грунта был отобран в виде монолита (30 × 34 × 38 см) с глубины 2.8 м из расчистки в борту оврага, расположенного в районе 4 км шоссе “Москва – Волгоград”.

По морфологии это осадочные слабо сцементированные породы палево-светло-желтого цвета. Грунт прочный в воздушно-сухом состоянии, но поддается разрушению при приложении силы (при этом ломается с треском и распылением пылевой фракции). Текстура массивная. Характерно наличие макропористости. Макропоры преимущественно изометричной формы, размером 1 – 5 мм. Оценка показателей состава и свойств исследуемого грунта проводилась на основе стандартных методик, принятых в лабораторной практике грунтоведения [11]. В минеральном составе исследуемых грунтов, по данным рентгенодифракционного количественного анализа, проводимого при помощи рентгеновского дифрактометра Ultima-IV фирмы Rigaku (приобретенного за счет средств Программы развития Московского уни-

**Таблица 1.** Дисперсность исследуемых грунтов и ее изменение при углеводородном загрязнении

Образец грунта	Содержание фракции, %			Коэффициент агрегированности для фракции размером < 0.001 мм, $K_a$	Тип структурных связей (по классификации И.М. Горьковой)
	песчаной (0.25–0.05 мм)	пылевой (0.05–0.001 мм)	глинистой (<0.001 мм)		
Исходный	49	24	27	1.0	стабилизационный
Загрязненный	20	54	26	4.3	коагуляционный
	49	24	27		
	22	72	6		

Примечание. Содержание фракций при подготовке грунта к анализу по методике: над чертой – С.С. Морозова (обработка NaCl), под чертой – Н.А. Качинского (микроагрегатный).

верситета) 99% грунта представлено кварцем, и лишь 1% приходится на аксессуарные минералы. В связи с незначительным содержанием количественного анализа глинистой составляющей грунтов не проводилось, качественно же она представлена каолинитом, гидрослюдой, хлоритом и смешанослойными минералами. Плотность твердой фазы определялась пикнометрическим методом и составила 2.65 г/см<sup>3</sup>. Гигроскопическая влажность, характеризующая общее количество прочно связанной воды, определена весовым способом и составила 2%. Дисперсность оценивалась по гранулометрическому и микроагрегатному составу (табл. 1). Согласно проведенным анализам, исходный грунт, по классификации С.С. Морозова, – лессовидная супесь.

Следует отметить, что согласно приведенным в табл. 1 данным, углеводороды в грунте связывают мелкую пылеватую и глинистую фракции в микроагрегаты. Соответственно, аналогичному связыванию подвергаются и ферменты, сорбируемые на поверхности пылеватых и глинистых частиц. Исследуемые лессовидные супеси незасоленные, поскольку содержание легкорастворимых солей в них составило 0.005%. Значения рН в исходных грунтах – 7.38 (рН-метр “Сескер”: диапазон измерений 1–14, калибровка проводилась по двум буферам с рН 7.01 и 4.01, погрешность измерений 0.2). Таким образом, реакция среды в исходных грунтах близка к нейтральной. Оценка рН загрязненного грунта показала, что реакция среды незначительно изменилась в кислую сторону и составила 7.2. Следовательно наблюдаемое изменение рН не должно существенно сказываться на получаемых значениях ферментативной активности.

Лессовидные супеси, отобранные для исследования, непосредственно подстилают каштановые почвы, поэтому они богаты продуктами жизнедеятельности микроорганизмов и должны обладать значительными величинами ферментативной активности.

В качестве *загрязнителя* использовалось дизельное топливо летней марки (ДТЛ). Дизельное топливо (ДТ) – сложная смесь по химическому составу: алканы (10–40%), циклоалканы (20–60%), ароматические соединения (14–30%) и их производных [3]. С повышением температуры кипения содержание ароматических углеводородов может увеличиваться до 40–47%. Средняя молекулярная масса ДТ находится в пределах от 110 до 230. Непредельных углеводородов в дизельных топливах практически нет. Для улучшения качества дизельных топлив с целью повышения цетанового числа

на нефтеперерабатывающих заводах добавляют присадки: перекиси углеводородов, нитросоединения, изопропилнитрат и циклогексилнитрат. Экологически чистые дизельные топлива производят из гидроочищенных газойлевых фракций прямой гонки и вторичных процессов. Они не имеют антиокислительных присадок и содержат в себе общей серы не более 0.05%. Такие топлива без антиокислительных присадок имеют низкую химическую стабильность и непригодны для длительного хранения. ДТ обладает повышенной гигроскопичностью. В применяемом загрязнителе с помощью рентгеноспектрального анализа энергодисперсионного спектра найдено количественное содержание примесей (с точностью 3–4%). В соответствии с этими определениями в применяемом нефтепродукте содержится (ppm): Cu – 61; P – 1214; S – 5203; Al – 5000.

*Исследуемые ферменты* – представители групп оксидоредуктаз и гидролаз (табл. 2).

*Оксидоредуктазы* характерны для биологической составляющей всех грунтов, поскольку являются неотъемлемой частью такого важного процесса, как дыхание. Ферменты, относящиеся к классу оксидоредуктаз, катализируют окислительно-восстановительные реакции, играющие ведущую роль в биохимических процессах в клетках живых организмов и в грунтах. Активность окислительно-восстановительных ферментов находится в прямой корреляционной зависимости с основными физико-химическими свойствами грунтов, микробиологическими процессами в них: нитрификацией, сульфификацией. Из оксидоредуктаз были исследованы дегидрогеназы и пероксидазы.

*Дегидрогеназы* – ферменты, участвующие в процессе дыхания. Они отщепляют водород от окисляемых субстратов и переносят его либо непосредственно на кислород, либо на иные акцепторы (хиноны). В грунтах они катализируют дегидрирование органических веществ. Субстратами при этом являются углеводы, органические кислоты, аминокислоты, гуминовые кислоты [2]. Для грунтов в качестве субстратов дегидрогеназ более характерны углеводы и органические кислоты. Отщепляемый в процессе дегидрирования водород может передаваться кислороду воздуха (аэробные дегидрогеназы) или органическим веществам типа хенонов (анаэробные дегидрогеназы). Активность дегидрогеназ – показатель жизнедеятельности микроорганизмов и количества гумуса, поддающегося разложению микробами.

**Таблица 2.** Примеры действия исследованных классов ферментов в грунтах (на основе работ Х. Биссвангера [2], Л.И. Инишевой и др. [5], В.А. Кретовича [9])

Группа ферментов	Характерная реакция	Примеры действия
1. Оксидоредуктазы	окислительно-восстановительная	<i>Дегидрогеназа.</i> Катализирует реакцию дегидрирования органических веществ (углеводов, спиртов, органических кислот и др.), поступающих с растительными остатками, и участвует в микробиологическом разложении углеводов нефти и газового конденсата. <i>Каталаза.</i> Входит в состав дыхательных ферментов. В результате ее активирующего действия в живой клетке происходит расщепление перекиси водорода (ядовитой для живого организма) на воду и свободный кислород. <i>Ферриредуктаза.</i> Использует кислород оксида железа в качестве акцептора электронов в окислительно-восстановительных процессах. При этом окисные формы железа восстанавливаются в закисные. Имея данные об активности ферриредуктазы, можно судить о доступности железа растениям. <i>Глютаматдегидрогеназа.</i> Контролирует поступление азота в растения из почв.
2. Гидролазы	гидролитическая	<i>Уреаза.</i> Участвует в разложении мочевины в процессе гидролиза, образуя аммиак и углекислый газ. Аммиак служит непосредственным источником азотного питания для высших растений. <i>Фосфатаза.</i> Катализирует гидролиз ряда фосфорорганических соединений с образованием ортофосфата. Активность фосфатазы тем выше, чем меньше подвижных форм фосфора, в силу чего она может быть использована как дополнительный показатель при установлении потребности внесения фосфорных удобрений.

*Пероксидаза* ( $H_2O_2$  – оксидоредуктаза) катализирует окисление органических веществ почв (фенолов, аминов) за счет кислорода, выделяющегося при разложении перекиси водорода и других перекисей. Пероксидаза участвует в реакции конденсации веществ при образовании гуминовых кислот, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах в грунтах. Этот фермент катализирует окисление полифинолов в присутствии перекиси водорода (других перекисей), так как сами перекиси обладают сравнительно слабым окисляющим действием на фенолы. В итоге, например, фенолы переходят в хиноны. Также перекиси действуют на ароматические соединения.

*Гидролазы* образуют большую группу ферментов. Участвуя в реакциях гидролитического распада высокомолекулярных органических соединений, они играют важную роль в обогащении грунтов подвижными и доступными растениям и микроорганизмам питательными веществами. С действием *уреазы* (мочевина – амидогидролаза) связаны процессы гидролиза и превращения в доступную форму азота мочевины. Конечными продуктами являются аммиак и углекислый газ.

Таким образом, уреазы, как частный случай гидролаз, перерабатывает мочевину.

#### МЕТОДИКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

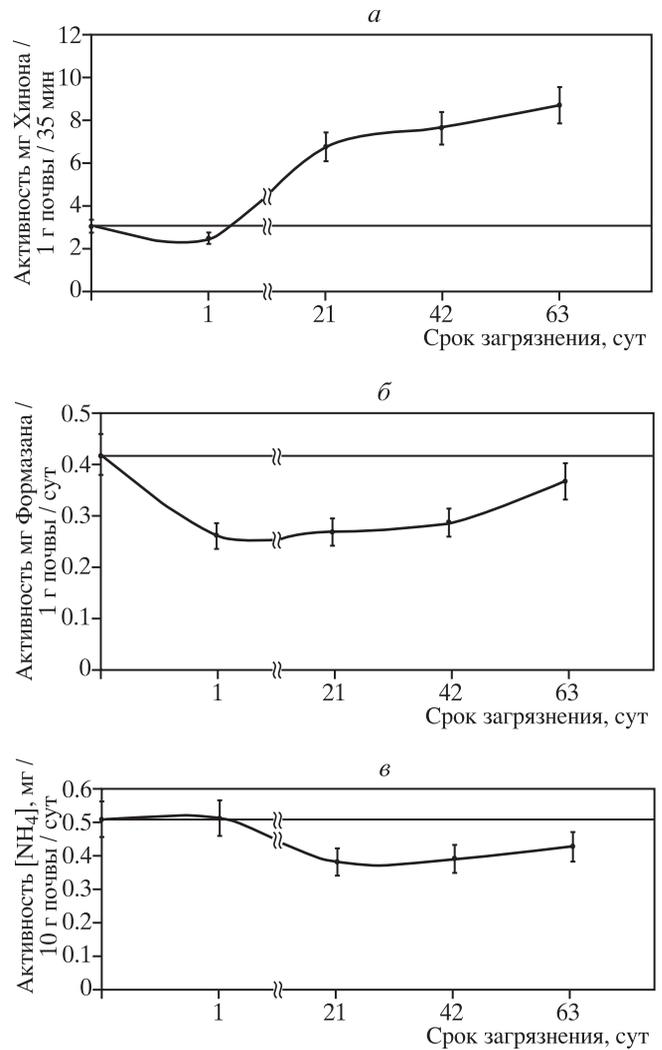
Определение активности ферментов проводится в сухих образцах, для чего грунты высушивают до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре. До начала проведения специальной части экспериментальных исследований высушенный грунт был диспергирован (растерт в фарфоровой ступке), просеян через сито с диаметром отверстий 0.25 мм. Из растертого и просеянного грунта отбирали пять навесок по 100 г и помещали их в отдельные чашки Петри. В четыре из пяти навесок вносили по 30 капель загрязнителя, что соответствует уровню загрязнения в 1.5% от веса сухого грунта. Одну навеску оставляли незагрязненной, т.е. контрольной. Незагрязненный образец и одну загрязненную навеску в течение первых суток помещали в холодильник и хранили при температуре не более +4°C. Остальные навески хранили на воздухе при комнатной температуре (+ 22°C). По истечении 3, 6 и 9 недель (со-

ответственно, 21, 42 и 63 сут) одну из оставшихся на воздухе навесок помещали в холодильник.

Выбор периода взаимодействия лессовидной супеси с загрязнителем сделан, исходя из следующих соображений. Сроки проведения наблюдений за изменением ферментативной активности в грунтах при углеводородном загрязнении не оговорены в методической литературе [9, 10, 12]. Анализ литературных данных [2, 8] показал, что сроки наблюдения за уровнем ферментативной активности могут быть различными и зависят от цели экспериментального исследования. Например, период замеров величин ферментативных активностей при рекультивации нефтезагрязненных почв биологическими мелиорантами составляет 10 сут, а при исследовании влияния на ферментативную активность минеральных удобрений – до 4-х месяцев (и зависит от вегетационного периода выращиваемых растений) [10]. Известно, что нефтеокисляющие бактерии активизируются уже в течение 24 час [1, 3], однако их наличие не является единственным фактором, влияющим на изменение ферментативной активности. Таким образом, при выборе периода замеров ферментативной активности было бы нецелесообразно руководствоваться лишь скоростью развития нефтеокисляющих микроорганизмов и производить измерения через короткие промежутки времени.

Кроме того, величина ферментативной активности зависит от гранулометрического состава грунтов [5]. Поскольку в работе не производилось изучение влияния углеводов на биопродуктивность грунта, период замеров ферментативной активности был выбран исходя из гранулометрического типа грунта – лессовидной супеси. Для этого были учтены данные по экспериментальным исследованиям почв, формирующихся на супесях, которые наиболее близки по составу и свойствам к объекту исследований. Так, при изучении инвертазной активности почв, относящихся к оподзоленным супесям, период измерения ферментативной активности составлял 3 недели. Таким образом, этот временной диапазон и был выбран периодом замеров ферментативной активности лессовидной супеси.

За сутки до начала эксперимента образцы помещали на отдельные листы фольги (во избежание впитывания дизельного топлива использование бумаги исключено) и сушили при комнатной температуре. В день эксперимента образцы лессовидной супеси подвергали термической обработке при температуре +35–36°C и воздействию буфера с целью достижения оптимальных условий для



Изменение ферментативной активности: а – пероксидазной, б – дегидрогеназной, в – уреазной в загрязненной лессовидной супеси во времени.

функционирования анализируемого фермента. Затем из исследуемых образцов готовили водную вытяжку [12].

Определение ферментативной активности проводили спектрофотометрическим методом, основанном на измерении оптической плотности вещества (способности пропускать свет заданной длины волны) на спектрофотометре “UV mini-1240 Shimadzu”. Затем, используя полученные значения оптической плотности, по калибровочной кривой оценивали концентрацию продуктов реакции, катализируемой исследуемым ферментом. Величина концентрации позволяет вычислить ферментативную активность по определенным для данного фермента зависимостям [12]. Экспериментальные исследования проводили в двух параллелях. В день проведения эксперимен-

та осуществляли контрольные измерения оптических плотностей незагрязненной лессовидной супеси и используемых реактивов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента выявлено, что *пероксидазная активность* для лессовидной супеси лесостепной зоны Волгоградской обл. составляет 3.02 мг Хинона на 1 г почвы за 35 мин. При наблюдении за пероксидазной активностью обнаружено, что она несколько снижается в первый день, после внесения загрязнителя, однако разница между ферментативной активностью чистого грунта и грунта в момент загрязнения незначительна (не превышает величину погрешности измерений) (рис. 1а). Через 21 сут ферментативная активность лессовидной супеси увеличилась более чем в 2.5 раза, что свидетельствует о высокой степени адаптации микроорганизмов, обладающих пероксидазной активностью к неспецифическому субстрату – дизельному топливу. Согласно существующим представлениям [12], пероксидазная активность действует на фенолы, ароматические амины. В свою очередь циклические соединения входят в состав примесей жидких углеводородов, в том числе и дизельного топлива, используемого в качестве загрязнителя, где их содержание составляет 30%. Если принять верным предположение об увеличении численности микроорганизмов в период роста ферментативной активности, то наблюдаемый рост можно связать с поступлением в грунт субстрата, подходящего для питания микроорганизмов, обладающих пероксидазной ферментативной активностью. В дальнейшем наблюдался рост ферментативной активности примерно на 1 мг Хинона на 1 г почвы за 35 мин через каждый 21-суточный период (от 21 до 42 и от 42 до 63 сут), что соответствует увеличению ферментативной активности в 1.1 раза. Столь незначительное увеличение может быть обусловлено тем, что по прошествии 21 сут (наблюдаемый быстрый рост активности) легко потребляемые (легкие фракции) компоненты дизельного топлива израсходовались, и в дальнейшем микроорганизмы были вынуждены потреблять более сложные углеводороды, что привело к замедлению роста их численности и, как следствие, к замедлению роста ферментативной активности. При завершении эксперимента значение ферментативной активности в незагрязненной лессовидной супеси было в 3 раза ниже, чем в загрязненном образце (по истечении 9 недель с момента загрязнения). Однако в виду того, что по прошествии 6 недель наметилась тенден-

ция выравнивания величины ферментативной активности и верно предположение об уменьшении количества субстрата в грунте, можно заключить, что при дальнейших измерениях было бы зафиксировано уменьшение ферментативной активности до ее первоначального уровня.

Таким образом, изменение пероксидазной активности при загрязнении грунта ДТ (1.5%) описывается кривой роста с последующим насыщением и тенденцией к возврату к исходным значениям (см. рис. 1а). При этом значения пероксидазной активности увеличиваются в 2.5 раза, что свидетельствует о ее высокой чувствительности и эффективности ее использования как показателя состояния данной лессовидной супеси при углеводородном загрязнении.

*Дегидрогеназная активность* составляет 0.42 мг формазана на 1 г грунта в сутки. Изменение дегидрогеназной активности отлично от пероксидазной. За первые сутки после загрязнения зафиксирован резкий спад ферментативной активности (рис. 1б). Величина данного показателя снизилась примерно в 2 раза. Этот факт позволяет предположить, что микроорганизмы в грунте среагировали на изменение внешних условий спадом жизнедеятельности или частично погибли. В данном случае нужно полагать, что причина изменения внешних условий – внесение дизельного топлива. Согласно существующим представлениям [12], известно, что основная функция дегидрогеназа – обеспечение процесса дыхания (см. табл. 2). Вероятно дизельное топливо препятствует этому процессу. Как и все углеводороды, дизельное топливо относится к одному из классов поверхностно-активных веществ (ПАВ). Одно из свойств этих веществ – адсорбция на поверхности минеральной компоненты грунта. Молекулы ПАВ располагаются своими гидрофобными частями в виде разветвленных углеводородных цепей на поверхности твердых частиц, образуя пленки и способствуя их агрегированию (см. табл. 1). Можно предположить, что наличие таких пленок препятствует доступу кислорода, что в свою очередь и затрудняет протекание реакции дыхания. По истечении 21 сут наблюдалось завершение спада дегидрогеназной активности, что может свидетельствовать о том, что микроорганизмы претерпели селективный период жизнедеятельности. Селективный период – это некоторый промежуток времени, в течение которого организмы адаптируются к нехарактерным для них условиям жизнедеятельности. На 42 и 63 сут наблюдалось увеличение ферментативной активности (см. рис. 1б), разница между уровнями дегидрогеназной активности – первоначальным и

на момент завершения эксперимента – составила 0.05 мг формазана на 1 г почвы в сутки. Предположительно это обстоятельство может быть связано с тем, что по прошествии 21 сут после момента загрязнения легкая фракция дизельного топлива, которая составляет около 40%, испарилась. Это могло способствовать разрушению части пленок, доступу кислорода к поверхности минеральных частиц и возобновлению процессов дыхания. Такая тенденция изменения ферментативной активности позволяет полагать, что при дальнейших исследованиях в некоторый момент времени была бы зафиксирована ферментативная активность, соответствующая первоначальному уровню.

Таким образом, изменение дегидрогеназной активности при загрязнении грунта ДТ (1.5%) описывается вогнутой кривой, включающей периоды ее резкого спада (в течение первых суток после внесения ДТ), стабильности (в течение последующих 21 сут) и постепенного роста к исходным значениям (начиная с 42-х сут после начала эксперимента). Ее величина выражено изменяется после внесения ДТ, что говорит о возможности ее дальнейшего использования при оценке состояния лессовидной супеси.

Уреазная активность составляет 0.51 мг  $\text{NH}_4$  на 10 г грунта в сутки. Экспериментальные исследования (рис. 1в) показали, что уреазная активность менее подвержена воздействию дизельного топлива в течение всего периода эксперимента (63 сут). Вероятно, это связано с тем, что для используемой в эксперименте лессовидной супеси не характерно наличие множественных растительных остатков, гумуса, навоза, азотных удобрений, являющихся источником мочевины – прямого субстрата для микроорганизмов с уреазной активностью, т.е. в грунте содержалось малое количество мочевины, ответственное за начальный уровень уреазной активности. В первые сутки загрязнения последняя не изменялась. Однако дальнейшие исследования показали, что для уреазной активности, как и для дегидрогеназной, характерно наличие селективного периода. В данном эксперименте его длительность составила 42 сут и включала 2 периода: снижение в 1.3 раза, что, вероятно, было связано с частичной гибелью микроорганизмов (в течение 21 сут), и относительной стабильности, когда уреазная активность не изменялась, что можно объяснить временным отсутствием жизнедеятельности микроорганизмов (с 21 по 42 сут). После 42-х суток с момента загрязнения лессовидной супеси отмечен незначительно рост уреазной активности в 1.1 раза. Это связано с тем, что к этому времени наблюдений селективный период жизнедеятельно-

сти организмов был завершен, а также улетучилась легкая фракция дизельного топлива, что способствовало поступлению кислорода и высвобождению органических веществ, являющихся субстратами для уреазной активности. Тенденция к увеличению ферментативной активности позволяет предполагать, что в ходе дальнейших исследований в некоторый момент времени был бы зафиксирован уровень уреазной ферментативной активности, соответствующий уровню незагрязненной лессовидной супеси. Однако подобные предположения весьма условны и для их утверждения или опровержения необходимы дальнейшие экспериментальные исследования с увеличением времени наблюдений.

## ВЫВОДЫ

При анализе полученных экспериментальных данных по оценке ферментативной активности лессовидных супесей ательской свиты (QIIIat) территории Нижнего Поволжья можно сделать следующие выводы:

- для исходных (незагрязненных) грунтов характерны оксидоредуктазные активности, и не характерны гидролазные активности;

- в целом ферментативная активность (*пероксидазная, дегидрогеназная, уреазная*) изменяется после внесения загрязнителя (дизельного топлива),

- в течение периода наблюдений отмечена тенденция ферментативной активности грунта к восстановлению после воздействия жидких углеводородов и достижению уровня активности, характерного для незагрязненного грунта, что указывает на высокий потенциал исследуемых грунтов к самоочищению;

- ферментативная активность может использоваться для оценки состояния лессовидных супесей при углеводородном загрязнении.

Таким образом, экспериментально подтверждена возможность индикации воздействия на грунт антропогенных факторов с помощью показателей ферментативной активности и определены наиболее информативные показатели ферментативной активности лессовидной супеси территории Волгоградской обл.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бах А.Н. К вопросу о цепном характере реакции под действием пероксидазы и каталазы // Избранные труды по химии и энзимологии. М.: Наука, 2007. 298 с.

2. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. 328 с.
3. Гольдберг В.М. Техногенное загрязнение природных вод углеводородами и его экологические последствия. М.: Наука, 2001. 125 с.
4. Григорьева И.Ю., Мартынов Д.В. Возможности и перспективы использования показателя ферментативной активности грунтов при оценке геоэкологического состояния территорий //Сергеевские чтения. Инженерно-экологические изыскания в строительстве: теоретические основы, методика, методы и практика. Вып. 8. М.: ГЕОС, 2006. С. 98–102.
5. Инисьева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. Томск: Изд-во Томского ун-та, 2002. 119 с.
6. Камнева О.В., Харланов В.А. Геоэкологические проблемы, обусловленные добычей углеводородов и солей на территории Волгоградской области // Сергеевские чтения. Вып. 5. М.: ГЕОС, 2003. С. 262–266.
7. Коломийцев Н.В. Условия формирования просадочных свойств ательских пород Нижнего Поволжья // Инж. геология. 1985. № 2. С. 26–34.
8. Крамарева Т.Н. Ферментативная активность почв при различных антропогенных воздействиях. Автореф. дис. ... уч. ст. канд. биол. наук. Воронеж: ВГУ, 2003. 120 с.
9. Кретович В.А. Введение в энзимологию. М.: Изд-во МГУ, 2000. 264 с.
10. Купревич В.Ф., Щербакова Т.А. Почвенная энзимология. М.: Наука и техника, 1966. 276 с.
11. Лабораторные работы по грунтоведению / Под ред. В.Т. Трофимова, В.А. Королева. М.: Высшая школа, 2008. 519 с.
12. Практикум по агрохимии: Учеб. пособие / Под ред. В.Г. Минеева. М.: Изд-во МГУ, 2001. 689 с.
13. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 203 с.
4. Grigor'eva, I.U., Martynov, D.V. *Vozmozhnosti i perspektivy ispol'zovaniya pokazatelya fermentativnoi aktivnosti gruntov pri otsenke geoekologicheskogo sostoyaniya territoriy* [Opportunities and prospects of using the index of enzymatic activity of soils in the assessment of geoecological state of the area]. *Materialy konf. Sergeevskiyeh chteniya, vyp. 8*. [Proc. Sci. Conf. in Commemoration of acad. E.M. Sergeev, issue 8], Moscow, GEOS, 2006, pp. 98–102 (in Russian).
5. Inisheva, L.I., Ivleva, S.N., Sherbakova, T.A. *Rukovodstvo po opredeleniyu fermentativnoi aktivnosti torfyanykh pochv i torfov* [Guide on the determination of enzymatic activity of peat soils and peat]. Tomsk. Izd. Tomskogo Univ., 2002, 119 p. (in Russian).
6. Kamneva, O.V., Kharlanov, V.A. *Geoekologicheskie problemy, obuslovlennyye dobychei uglevodorodov i solei na territorii Volgogradskoi oblasti* [Environmental problems caused by the production of hydrocarbons and salts in Volgograd region] // *Sergeevskiyeh chteniya. Molodezhnaya sessiya. Vyp 5* [Proc. Sci. Conf. in Commemoration of acad. E.M. Sergeev, Young Professional Conference, issue 5]. Moscow, GEOS, 2003, pp. 262–266 (in Russian).
7. Kolomiytsev, N.V. *Usloviya formirovaniya prosadochnykh svoystv atelskikh porod Nizhnego Povolzh'ya* [The conditions of formation of subsidence properties of soils in atel'skii series in the Lower Volga region]. *Inzhenernaya Geologiya*, 1985, no. 2, pp. 26–34 (in Russian).
8. Kramareva, T.N. *Fermentativnaya aktivnost pochv pri razlichnykh antropogennykh vozdeystviyakh* [The enzyme activity of soils under different anthropogenic impacts]. Doctoral Sci. Diss. (Techn.), Voronezh, VGU Publ., 2003, 120 p. (in Russian).
9. Kretovich, V.A. *Vvedenie v enzimologiyu* [Introduction to Enzymology]. Moscow, MGU Publ., 2000, 264 p. (in Russian).
10. Kuprevich, V.F. *Pochvennaya enzimologiya* [Soil Enzymology]. Moscow, Nauka i Tekhnika, 1966, 276 p. (in Russian).
11. *Laboratornye raboty po gruntovedeniyu* [Laboratory practice in soil and rock engineering]. Trofimov, V.T., Korolev, V.A., Eds. Moscow, Vysshaya shkola, 2008, 519 p. (in Russian).
12. *Praktikum po agrokhimii* [Practical works in agricultural chemistry]. Mineev, V.G., Ed., Moscow, MGU Publ., 2001, 629 p. (in Russian).
13. Khaziev, F.Kh. *Sistemno-ekologicheskii analiz fermentativnoi aktivnosti pochv* [System and ecological analysis of the enzymatic activity of soils]. Moscow, Nauka, 1982, 203 p. (in Russian).

## REFERENCES

## CHANGE IN ENZYMATIC ACTIVITY OF LOESS UPON HYDROCARBON CONTAMINATION

I.Yu. Grigorieva\*, D. P. Pripachkina\*, M.A. Gladchenko\*\*

\**Geological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, bld. 1, Moscow, 119992 Russia.*

*E-mail: ikagrig@inbox.ru; dasha.pripachkina@yandex.ru*

\*\**Chemistry Faculty, Dept. of Chemical Enzymology, Moscow State University, Leninskie gory, bld. 3, Moscow, 119991 Russia. E-mail: gladmarina@yandex.ru*

The enzymatic activity is an indirect characterization of the biotic properties of soils. Its study allows you to gain an objective view of the processes occurring in soils. Indicators of enzymatic activity are closely related to the ability of soils to regenerate after anthropogenic influence. Evaluation of the enzymatic activity of loess and the nature of its changes in hydrocarbon contamination remains an unstudied problem today, which determines the relevance of this article.

Enzymes are proteins or ribonucleic acid (RNA) that originate in the lysosomes and the ribosomes of cells but being able to function outside of living organisms. They accelerate reactions in millions of times. Enzymes enter the soil with vital excrements of plants and animals, as well as after their death (lysis). Enzymes keep activity for a significant time due to the fixation (immobilization) of clay and silt soil fractions and soil organic matter. Therefore, loess, a soil with a high content of silt fraction, was taken to study the enzymatic activity.

A summer brand of diesel fuel was used as a contaminant. According to its chemical composition, the diesel fuel is a complex mixture of alkanes (10–40%), cycloalkanes (20–60%) and aromatic compounds (14–30%) and their derivatives. Enzyme activity was analyzed in air-dry samples of sandy loamy loess. The enzyme activity was studied using the spectrophotometry based on measuring the optical density of substance. Two parallel measurements were performed at UV mini-1240 Shimadzu spectrophotometer. Representatives of oxidoreductases (dehydrogenase and peroxidase) and hydrolases (urease) were chosen as the studied enzymes.

As a result of experimental research, we have obtained the kinetics of enzymatic activity in loess, resulting from the diesel fuel contamination at concentrations of 1.5% by weight of dry soil. The change in peroxidase activity in contaminated soil is described by a growing curve showing a tendency to return to original values after reaching the saturation. The change in dehydrogenase activity is described by a concave curve that shows a section of sharp decline in enzymatic activity (during the first day after the pollutant introduction), a lac period (stable enzymatic activity for 21 days) and a tendency to return to original values. An increase in the urease activity was negligible and was observed only after 42 and 63 days since the pollution of sandy loamy loess.

The following conclusions were made from the results obtained.

- original (uncontaminated) soils manifest oxidoreductase rather than hydrolase activity;
- the enzymatic activity changes after the pollutant (diesel fuel) introduction showing a tendency to reach the activity typical to non-polluted soil, i.e., the enzymatic activity of soil tends to restore after the impact of liquid hydrocarbons;
- the enzymatic activity can be used to assess the condition of sandy loamy loess upon hydrocarbon contamination.

Thus, the enzymatic activity indices may be used as indicators of anthropogenic impact on soils, which is experimentally proved, and the most informative indicators of enzyme activity typical for sandy loam loess are defined.

**Keywords:** *enzyme, molecular enzymatic activity, optical density, loessial loam, dehydrogenase, peroxidase, urease.*