

ВЛИЯНИЕ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЧЕРНОЗЕМА ВЫЩЕЛОЧЕННОГО

Для оценки изменений, происходящих в почвенной среде под влиянием 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ), была определена численность основных эколого-трофических групп микроорганизмов почвы, а также основные ферментативные активности. Показано, что при низких концентрациях поллютанта (20 и 50 мг/кг почвы) многие эколого-трофические группы и ферментативные активности относительно толерантны к ксенобиоту.

Ключевые слова: 2,4,6-тринитротолуол, биологическая активность почвы, эколого-трофические группы микроорганизмов.

Обширное применение взрывчатых веществ на протяжении мировых войн и после них, их хранение и демилитаризация привели к хроническому загрязнению почв отдельных локальных территорий. Впоследствии способность взрывчатых веществ растворяться в грунтовых водах привела не только к загрязнению последних, но и к значительному расширению ареала распространения этих высоко токсичных ксенобиотиков. В их числе и ТНТ, наиболее широко использующийся по настоящее время. Масштаб и глубину проблемы даже в Европе начали осознавать лишь в последние полтора – два десятилетия [1].

Вызываемое ксенобиотиком нарушение общей экологической ситуации проявляется, в частности, в изменении биологической активности почвы. Так обнаружено, что в высоких концентрациях ТНТ проявляет токсичность по отношению к широкому спектру почвенных организмов, в том числе к грибам и бактериям, а также угнетает ферментативные активности почвы [2, 3]. Необходима глубокая экологическая оценка существующей проблемы, выявляющая взаимосвязь между степенью изменений биологической активности почвы и концентрацией ТНТ в среде, которая даст теоретическое и прикладное обоснование приемов ремедиации.

В связи с этим целью настоящей работы было оценить влияние различных концентраций 2,4,6-тринитротолуола на численность основных эколого-трофических групп почвенного сообщества и ферментативные активности почвы, а также дать общую оценку возможных подходов для ремедиации почв, загрязненных ксенобиотиком.

Пахотный слой выщелоченного чернозема имел близкую к нейтральной реакцию среды

(рН 7,3), содержание гумуса 5,2%, содержание С и N – 2,4 и 0,425%.

В ходе эксперимента первоначально готовили загрязненный образец в 1/5 части почвенного образца внесением в него концентрированного раствора ТНТ и последующим перемешиванием с оставшейся интактной частью почвы. Далее в течение 30 дней проводили инкубацию при 28 °С и влажности 60% от полной влагоемкости (ПВ), производя через определенные промежутки времени отбор образцов.

Численность микроорганизмов определяли на твердых питательных средах: бактерий, использующих органические формы азота, – на мясо-пептонном агаре (МПА); микроорганизмов, утилизирующих минеральные формы азота, и актинобактерий – на среде Гаузе; бактерий, образующих эндогенные споры, – на МПА с суслом. Нитрифицирующие бактерии учитывали на жидкой среде Виноградского для первой фазы нитрификации; денитрифицирующие бактерии – на среде Гильтая [4]. Ферментативную активность почвы определяли по Галстяну [5]. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения для трех повторностей каждого образца.

Влияние тринитротолуола на бактерии носило волнообразный характер. Отмеченный характер влияния вещества на бактерии объясняется динамикой отдельных популяций, спецификой их роста и развития, а также сменой популяций, отличающихся друг от друга по устойчивости к ТНТ и продуктам его разложения [6]. В почвах, содержащих определенную концентрацию ксенобиотика, динамика роста не совпадает с динамикой роста в незагрязненной почве (рис. 1). Характер изменений кривой зависит от величины концентрации и от

личается при высоких и низких дозах поллютанта.

За весь период исследований – 30 суток – количество микроорганизмов, выросших на МПА, в вариантах, загрязненных 100 и 200 мг/кг тротила, было меньше соответствующего количества в варианте без ТНТ в среднем на 41 и 47% соответственно. Концентрации ТНТ 20 и 50 мг/кг почвы оказывали на численность гетеротрофов менее значительное ингибирующее влияние. На 5-е сутки в варианте с 20 мг тротила зарегистрировано превышение количества микроорганизмов над их количеством в образце, не содержащем ТНТ. Emma R. Travis с коллегами при низких концентрациях ТНТ также наблюдали увеличение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в загрязненной почве по сравнению с незагрязненной [7]. Поскольку

в нашем случае максимальная численность в этом образце почвы не превышает среднюю численность бактерий в контрольной почве, мы трактуем данный факт не стимуляцией данной группы бактерий. Из-за изменения характера динамики развития популяции рост гетеротрофных бактерий в почве, загрязненной ксенобиотиком (20 мг/кг), пришелся на момент времени, когда в нативной почве начался спад численности данной группы бактерий.

На бактерии, образующие эндогенные споры, ТНТ в концентрациях 50, 100 и 200 мг/кг оказывал стойкое отрицательное действие на протяжении всего опыта (рис. 2). В варианте, содержащем 20 мг/кг ТНТ, за весь период исследований численность спорообразующих бактерий превысила уровень контроля только на 21-е сутки и всего на 26%. Воздействуя по пути подавления процесса спорообразования, тринитротолуол препятствует, таким образом, выживанию популяции.

Как видно из рис. 3, внесение в почву ТНТ в концентрациях, равных 100 и 200 мг/кг почвы, вызвало на 1-е сутки увеличение численности бактерий, потребляющих минеральный азот. Превышение численности этой группы бактерий в случае невысоких доз поллютанта оказалось недостоверным. Бурное развитие бактерий, растущих на среде Гаузе, объясняется массовой гибелью в соответствующие сроки наблюдения грибов, отмерший мицелий которых в дальнейшем утилизировался данной группой микроорганизмов (данные не приведены).

Известно, что нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии играют ведущую роль в процессах метаболизма азотсодержащих органических соединений, а также играют важную роль в формировании и поддержании азотного режима почв.

Нитрифицирующие бактерии (рис. 4) оказались очень чувствительными к токсическому действию загрязнителя. Их количество при высоких дозах ксенобиотика (100 и 200 мг/кг) снизилось в первую половину опыта более чем вдвое, к окончанию опыта негативный эффект ТНТ ослаблялся. Т. е. для высоких концентраций ТНТ воздействие ксенобиотика на нитрифицирующие бактерии оказалось не только более сильным, но и более продолжительным.

Сукцессионные изменения численности денитрифицирующих бактерий (рис. 5) в образцах,

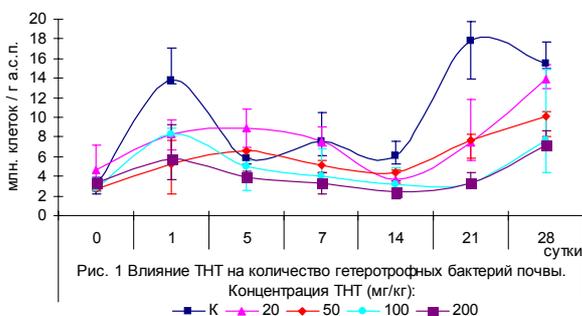


Рисунок 1.

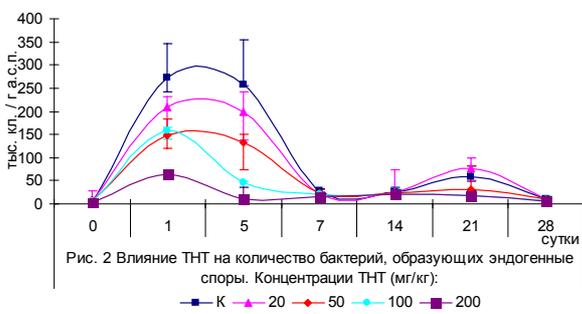


Рисунок 2.

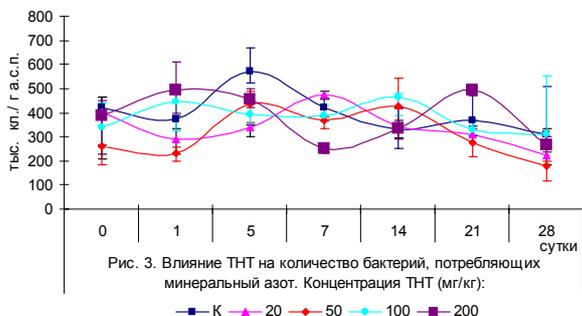


Рисунок 3.

обработанных высокими концентрациями ТНТ (100 и 200 мг/кг), не совпадали с сукцессией в образцах, содержащих меньшие дозы поллютанта. Подъем первой сукцессионной волны кривой, отражающей динамику в образцах, содержащих 100 и 200 мг/кг поллютанта, начинается только к 5-м суткам. Поэтому на 7-е сутки при этих концентрациях был отмечен пик численности денитрификаторов, который совпал со снижением этой группы бактерий в почве, не содержащей ТНТ. Численность бактерий ни в одном из этих образцов не достигла максимума первой волны сукцессии в незагрязненной почве. Подобное явление расценивается как одно из проявлений негативных воздействий на почву.

Известно, что количественные изменения, происходящие в микробном ценозе загрязненных почв, не всегда отражают изменения ее биологической активности [8]. Часть исследователей считает, что для биомониторинга почв гораздо целесообразнее использовать ферментативные активности [9].

В гидролитической ферментной системе почвы важным диагностическим показателем может служить активность ферментов азотного цикла – протеазы и уреазы.

Внесение самой маленькой из испытанных концентраций поллютанта – 20 мг/кг – угнетало активность протеазы лишь на момент 1-х суток (рис. 6). Уже к 5-м суткам протеазная активность в этом варианте на 50% превышала активность в образце почвы без ТНТ, а наивысшая активность была зарегистрирована на 21-е сутки – 0,18 мг глицина/24 часа, что превысило активность фермента в незагрязненной почве на 71%. При загрязнении почвы более высокой дозой тротила – 50 мг/кг – восстановление активности происходило лишь к 14-м суткам от момента внесения поллютанта. Активность протеазы в образцах, отобранных из почв, содержащих 100 и 200 мг/кг ТНТ, до 5-х суток колебалась на уровне незагрязненной почвы. К 5-м суткам активность фермента снизилась и стала на 47,3 и 61% соответственно ниже активности фермента в варианте без внесения загрязнителя.

При загрязнении чернозема выщелоченного тринитротолуолом ингибирование активности уреазы наблюдалось при всех испытанных концентрациях (рис. 7). Начиная с 7-х суток во всех образцах почв, содержащих тринитротолуол, отмечается незначительное кратковре-

менное повышение уреазной активности. Пик активности в варианте с внесением 20 мг/кг ТНТ пришелся на 21-е сутки эксперимента, к концу эксперимента активность фермента снова снизилась до уровня незагрязненной почвы.

Таким образом, протеазная активность ингибируется высокими концентрациями ТНТ, тогда как уреазная активность – всеми испытанными концентрациями ксенобиотика.

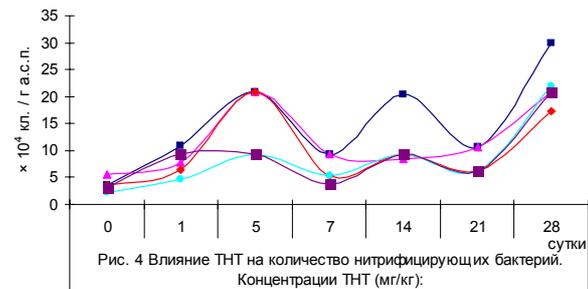


Рисунок 4.

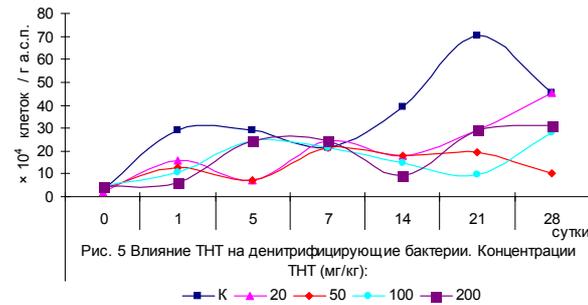


Рисунок 5.

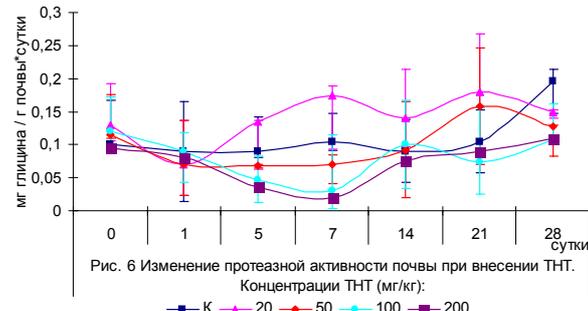


Рисунок 6.

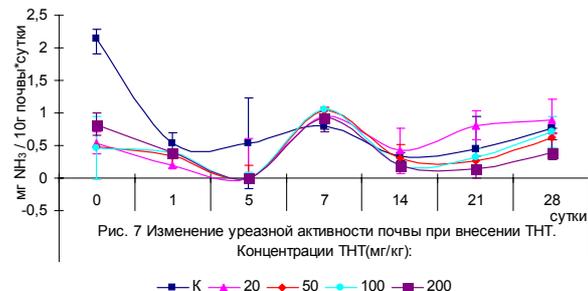


Рисунок 7.

Особенно сильно эти эффекты проявляются в первую неделю эксперимента. На 21-е сутки опыта при концентрации поллютанта 20 мг/кг почвы отмечается наивысшая активность и уреазы, и протеазы.

Интенсивность окислительно-восстановительных процессов, происходящих в почвах, хорошо иллюстрирует активность дегидрогеназы и каталазы.

До 5-х суток включительно разложение перекиси водорода в вариантах опыта, содержащих 20 и 200 мг/кг ТНТ, превышает каталазную активность в варианте без ТНТ, однако превышение находится в пределах ошибки опыта (рис. 8). К 7-м суткам все варианты опыта, за исключением загрязненного ТНТ в концентрации 20 мг/кг почвы, показали падение каталазной активности от 17,2 до 25,3% в зависимости от количества внесенного ксенобиотика. Начиная с 14-х суток до конца эксперимента наблюдается обратная динамика: каталазная активность растет во всех исследуемых образцах. К окончанию опыта каталазная активность в варианте опыта с внесением 20 мг/кг ТНТ достигла уровня активности в незагрязненном образце. Это свидетельствует о нормализации окислительно-восстановительных процессов в исследуемой почве. В почве, загрязненной 200 мг/кг тротила, каталазная активность оказалась достоверно ниже.

Данные по дегидрогеназной активности

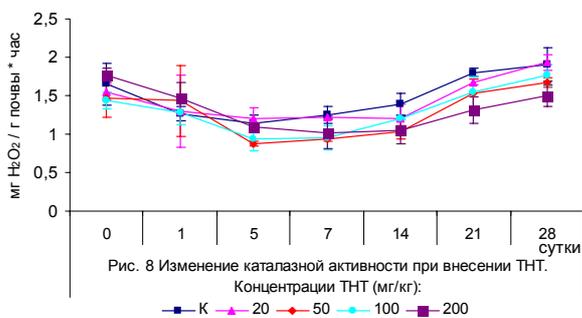


Рисунок 8.

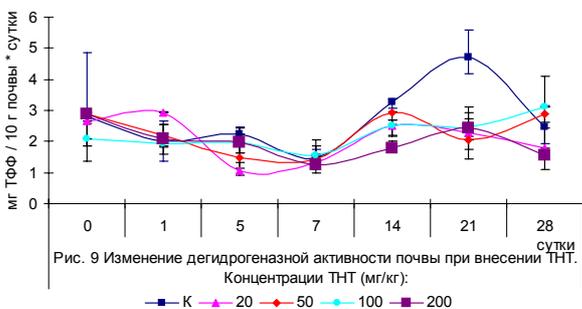


Рисунок 9.

представлены на рис. 9. После 7-х суток в незагрязненной почве наблюдается рост ферментативной активности. В отличие от контроля, дегидрогеназная активность при всех испытанных концентрациях ТНТ к 21-м суткам значительно снизилась.

В целом, как следует из анализа каталазной и дегидрогеназной активностей, в диапазоне концентраций до 200 мг/кг почвы ксенобиотик не создает в почве условий, радикально препятствующих работе окислительно-восстановительной ферментной системы. Максимальное ингибирование активности ферментов составило 15–28% в случае каталазы и 50–56% в случае дегидрогеназы. Более выраженное токсическое действие тринитротолуол оказал на гидролазы, в особенности уреазу: активность фермента снизилась на момент 0–1-х суток в среднем на 75–78%. Это способствовало уменьшению и без того невысокой обеспеченности данного типа почвы минеральными соединениями азота. Для протеазы такой же уровень ингибирования был достигнут при внесении высоких доз поллютанта.

Анализ влияния ТНТ на эколого-трофические группы микроорганизмов показал, что для всех исследованных групп высокие концентрации (100 и 200 мг/кг) оказались более токсичными. Исключение составили актинобактерии и денитрифицирующие бактерии. Для популяций этих групп микроорганизмов токсичность проявилась в изменении скорости прохождения отдельных этапов сукцессии.

Реалистичная оценка негативного влияния ТНТ на экологию невозможна без учета свойств ТНТ, а также тех специфических особенностей загрязнения почвы ТНТ *in situ*, которые зависят от характера применения и (или) уничтожения взрывчатых веществ. При взрыве на поверхность почвы попадает 1–3% от исходной массы заряда ТНТ [10], что неизбежно приводит к значительному его накоплению, причем главным образом в форме частиц диаметром более 3 мм [11, 12]. Ввиду низкой растворимости ТНТ (0,013 г/100 г Н₂О при 20 °С) твердые частицы взрывчатых смесей будут главным источником растворенного ТНТ в поровой воде в течение длительного периода времени. Область, в которой ТНТ находится в виде твердой фазы взрывчатого компонента, моделирует почвенный реактор непрерывного действия, открытый для постоянного поступления в жид-

кую фазу новых молекул ТНТ. По мере растворения массы ТНТ и адсорбции ее части на сорбционных структурах почвы растворенная масса будет переноситься почвенными водами на территорию, не содержащую твердой фазы. Эта территория будет постоянно расширяться до тех пор, пока будет действовать почвенный реактор ТНТ, время жизни которого может исчисляться десятками лет. После заполнения сорбционных центров почвы концентрация ТНТ в водной фазе будет находиться в условиях, близких к стационарным, также до тех пор, пока будет существовать почвенный реактор [13].

Очевидно, что в области почвенного реактора ТНТ и насыщающих концентраций ксенобиотика едва ли возможно создать и сохранить условия, способствующие эффективной работе сообщества микроорганизмов-деструкторов, чтобы можно было говорить только о микробных технологиях ремедиации. Следовательно, практическое значение имеет микробная биодegradация ТНТ только в области, содержащей растворимый ксенобиотик, при условии ликвидации почвенного реактора, поддерживающего высокие концентрации ТНТ в водной фазе. Данные по оценке биологической активности почвы, представленные нами, получены с использованием экспериментально подготовленных образцов с широким спектром заданных концентраций ТНТ, которые адекватно моделируют именно эту область почвенного пространства. Интерпретация этих данных позволяет сделать вывод о том, что концентрации ТНТ менее 100 мг/кг почвы либо не оказывают

негативного влияния на некоторые показатели биологической активности почвы (протеолитическая и каталазная активности), либо это влияние не превышает 50% (уреазная и дегидрогеназная активности, численность нитрификаторов, актинобактерий и бактерий, образующих эндогенные споры). Выраженный токсический эффект на показатели биологической активности почвы отмечен только для высоких концентраций, превышающих 100 мг/кг почвы. Таким образом, представленные нами данные, с учетом вышеобсуждавшихся особенностей загрязнения почвы и низкой растворимости ТНТ, позволяют сделать вывод о том, что ремедиация территорий, загрязненных ТНТ, представляет собой комплексную проблему. На первом этапе ее решения необходима ликвидация твердой фазы ксенобиотика инженерно-экологическими методами. Это предотвратит поддержание стационарно высоких концентраций ТНТ в растворимой фазе, а следовательно, и расширение территорий, пораженных высокими концентрациями растворимой фазы ксенобиотика. На втором этапе возможна «зачистка» загрязненных территорий биологическими методами. Для этой цели возможно использование самых различных организмов – растительного, животного происхождения или микроорганизмов. В последнем случае это могут быть как аборигенные, так и интродуцируемые штаммы-деструкторы, устойчивые к токсическому действию ТНТ. Однако для разработки технологии «зачистки» необходимы дополнительные исследования.

Список использованной литературы:

1. Toxicological Profile for 2,4,6-Trinitrotoluene. Atlanta, GA: US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service. ATSDR, June 1995.
2. Gong, P. Effects and bioavailability of 2,4,6-trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous microorganisms [Text] / P. Gong, S.D. Siciliano, C.W. Greer, L. Paquet, J. Hawari, G.I. Sunahara // Environmental Toxicology and Chemistry. – 1999. – №18. P. 2681-2688.
3. Siciliano, S.D. Assessment of 2,4,6-trinitrotoluene toxicity in field soils by pollution-induced community tolerance, denaturing gradient gel electrophoresis and seed germination assay [Text] / S.D. Siciliano, P. Gong, G.I. Sunahara, C.W. Greer // Environmental Toxicology and Chemistry. - 2000. – V. 19. P. 2154–2160.
4. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии: учебное пособие для вузов [Текст] / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева; под ред. В.К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2004. 256 с.
5. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии [Текст] / Ф.Х. Хазиев; Ин-т биологии Уфим. НЦ. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
6. Иутинская, Г.А. Устойчивость микробных сообществ почвы под озимой пшеницей при разных агротехнологиях ее выращивания [Текст] / Г.А. Иутинская, А.Д. Остапенко, Е.И. Андreyuk // Микробиол. журн. – 1990. – Т. 55, №2. – С. 3-5.
7. Travis, E.R. Short term exposure to elevated trinitrotoluene concentrations induced structural and functional changes in the soil bacterial community [Text] / E.R. Travis, Neil C. Bruce, Susan J. Rosser // Environmental Pollution. – 2008. – 153, №2. – P. 432-439.
8. Шамраев, А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды [Текст] / А.В. Шамраев, Т.С. Шорина // Вестник ОГУ. – 2009. – №6. – С. 642-645.
9. Барайщук, Г.В. Влияние экологически безопасных биологически активных препаратов на биологическую активность почвы при выращивании черенковых саженцев [Текст] / Г.В. Барайщук, О.Ф. Хамова // Агрохимия. – 2008. – №10. – С. 40-47.
10. Taylor, S. TNT particle size distributions from detonated 155-mm howitzer rounds [Text] / S. Taylor, A. Hewitt, J. Lever, C. Hayes, L. Perovich, P. Thorne, C. Daghlian // Chemosphere. – 2004. – №55. – P. 357–367.

11. Radtke, C.W. Field demonstration of acetone pretreatment and composting of particulate-TNT-contaminated soil [Text] / C.W. Radtke, D.M. Smith, G.S. Owen, F.F. Roberto // *Bioremediat. J.* - 2002. - V. 6, №2. - P. 191-204.
12. Radtke, C.W. Effect of particulate explosives on estimation contamination at a historical explosives testing areas [Text] / C.W. Radtke, D. Gianotto, F.F. Roberto // *Chemosphere.* - 2002. - №46. -P. 3-9.
13. Adrian, N.R. Stimulating the anaerobic biodegradation of explosives by the addition of hydrogen or electron donors that produce hydrogen [Text] / N.R. Adrian, C.M. Arnetta, R.F. Hickey // *Water Research.* - №37. - 2003. - P. 3499-3507.

Сведения об авторах:

Кормильцева Инна Петровна, аспирант кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета, e-mail: idemidova2006@yandex.ru

Яковлева Галина Юрьевна, доцент кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета, кандидат биологических наук, e-mail: Yakovleva_Galina@mail.ru

Гарусов Александр Васильевич, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета, e-mail: algar@ksu.ru

Захарова Наталия Георгиевна, доцент кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета, кандидат биологических наук.

Куриненко Борис Михайлович, профессор кафедры микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета, доктор биологических наук, тел. (843) 2315257, e-mail: Boris.Kurinenko@ksu.ru.

Kormilzeva I.P., Yakovleva G.Yu., Garusov A.V., Zakharova N.G., Kurinenko B.M.

Influence of 2,4,6- trinitrotoluene upon biological activity of leached chernozem
To evaluate changes in soil under the influence of 2,4,6- trinitrotoluene (TNT) there have been determined quantity of primary ecologo-trophic groups of soil microorganisms, as well as primary fermentation activities. It is shown that under sparse distribution of pollutant (20 and 50 mg/kg of soil) many of the ecologo-trophic groups and fermentation activities are relatively tolerant to xenobiotic.

Key words: 2,4,6- trinitrotoluene, biological activity of soil, ecologo-trophic groups of microorganisms.

Bibliography:

1. Toxicological Profile for 2,4,6-Trinitrotoluene. Atlanta, GA: US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service. ATSDR, June 1995.
2. Gong, P. Effects and bioavailability of 2,4,6-trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous microorganisms [Text] / P. Gong, S.D. Siciliano, C.W. Greer, L. Paquet, J. Hawari, G.I. Sunahara // *Environmental Toxicology and Chemistry.* - 1999. - № 18. R. 2681-2688.
3. Siciliano, S.D. Assessment of 2,4,6-trinitrotoluene toxicity in field soils by pollution-induced community tolerance, denaturing gradient gel electrophoresis and seed germination assay [Text] / SD Siciliano, P. Gong, G.I. Sunahara, C.W. Greer // *Environmental Toxicology and Chemistry.* - 2000. - V. 19. P. 2154-2160.
4. Tepper, EZ Workshop on Microbiology: a training manual for high schools [Text] / EZ Tepper, VK Shilnikova, GI Pereverzev, ed. VK Shilnikova. - 5 th ed., Pererab. and added. - M.: Bustard, 2004. 256 pp.
5. Khaziyev, FH Methods of Soil Enzymology [Text] / FH Khaziyev; Institute of Biology Ufim. SC. - M.: Nauka, 2005. - 252 pp.
6. Iutinskaya, GA Stability of microbial communities of soil under winter wheat at different agrotechnology its cultivation [Text] / GA Iutinskaya, AD Ostapenko, EI Andreyuk / *Microbiology. Zh.* - 1990. - T. 55, № 2. - S. 3-5.
7. Travis, E.R. Short term exposure to elevated trinitrotoluene concentrations induced structural and functional changes in the soil bacterial community [Text] / ER Travis, Neil C. Bruce, Susan J. Rosser // *Environmental Pollution.* - 2008. - 153, № 2. - P. 432-439.
8. SHAMRAEV, AV Effect of oil and petroleum products to various parts of the environment [Text] / AV SHAMRAEV, TS Shorin // *Bulletin of OSU.* - 2009. - № 6. - S. 642-645.
9. Barayschuk, GV Effect of environmentally sound biologically active preparations on the biological activity of soil for growing plants Cherenkov [Text] / GV Barayschuk, GG Cads / *chemistry.* - 2008. - № 10. - S. 40-47.
10. Taylor, S. TNT particle size distributions from detonated 155-mm howitzer rounds [Text] / S. Taylor, A. Hewitt, J. Lever, C. Hayes, L. Perovich, P. Thorne, C. Daghljan // *Chemosphere.* - 2004. - № 55. - P. 357-367.
11. Radtke, C.W. Field demonstration of acetone pretreatment and composting of particulate-TNT-contaminated soil [Text] / CW Radtke, D.M. Smith, G.S. Owen, F.F. Roberto // *Bioremediat. J.* -2002. - V. 6, № 2. - P. 191-204.
12. Radtke, C.W. Effect of particulate explosives on estimation contamination at a historical explosives testing areas [Text] / CW Radtke, D. Gianotto, F.F. Roberto // *Chemosphere.* - 2002. - № 46. -P. 3-9.
13. Adrian, N.R. Stimulating the anaerobic biodegradation of explosives by the addition of hydrogen or electron donors that produce hydrogen [Text] / NR Adrian, C.M. Arnetta, R.F. Hickey // *Water Research.* - № 37. - 2003. - P. 3499-3507.