

УДК 57.044

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МНОГОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО

© 2010 Н.И. Косолапова, С.Ю. Миронов, А.Ю. Лепина, С.Г. Кобыльской

Курский государственный университет

Поступила в редакцию 01.10.2010

В работе представлены результаты исследования влияния различных доз углеродного наноструктурного материала «Таунит» на ферментативную активность чернозема типичного. Высказано предположение о возможности закрепления наноуглеродного материала в почвенном комплексе.

Ключевые слова: *наноматериалы, ферментативная активность, чернозем*

Наноматериалы все более широко входят в повседневную жизнь людей. Все чаще ученые всего мира стали обращать внимание на возможные эффекты воздействия как свободных наночастиц, так и материалов на их основе на окружающую природную среду и человека. В центре внимания специалистов стоят такие вопросы, как: как и в каких количествах свободные наночастицы и наночастицы из «нанопродуктов» попадают в окружающую среду; какой будет уровень загрязнений воздуха, природных вод, почв и как это повлияет на природные экосистемы, а через них и на человека; какие аналитические методы могут быть эффективно использованы при изучении подобных воздействий? В России необходимость развертывания работ по проблеме оценки безопасности наноматериалов обосновывается в Постановлении Главного государственного санитарного врача РФ № 54 от 23.07.2007. Исследования данного рода предусматриваются рядом направлений развития наноиндустрии, декларируемых в «Программе развития наноиндустрии в Российской Федерации до 2015 года».

Одними из наиболее широко распространенных в настоящее время видов наночастиц являются углеродные нанотрубки (УНТ). Спектр их применения чрезвычайно широк, а значит и разнообразен список источников поступления УНТ в окружающую среду. Анализируя пути попадания углеродных наночастиц

и нанопродуктов их содержащих в природные объекты, а это, прежде всего потери при производстве УНТ, истирание в процессе использования и утилизация продуктов содержащих УНТ потерявших свои потребительские свойства, а так же принимая во внимание некоторые уникальные свойства УНТ и их способность, как и любых других наноразмерных частиц к самоорганизации, можно сделать вывод о том, что основным объектом природной среды, аккумулирующим на себе наибольшие количества углеродных наноматериалов, выступает и будет выступать почва. Авторы работы [1] констатировали факт полного отсутствия экотоксикологических исследований влияния УНТ на почвенные системы, в то время как работа по изучению воздействия наноматериалов на другие природные объекты успешно начата. Отсутствие достоверной информации делает невозможным проведение моделирования миграции УНТ в окружающей среде, затрудняет оценку риска, связанного с их транспортом.

Известно, что некоторые показатели биологической активности при возникновении в почве стрессовой ситуации (например, при вступлении в контакт с чужеродными компонентами) изменяются раньше, чем другие почвенные характеристики, например, агрохимические. Ферментативная активность почвы является одним из таких показателей. Ферменты в почве – это продукты метаболизма почвенного биоценоза. Большинство авторов считают, что ферментативный пул в почве состоит преимущественно из внутриклеточных и внеклеточных ферментов, в основном микробного происхождения [2]. Широкий спектр эколого-биологических функций почвенных ферментов определяет важность рассмотрения вопроса

*Косолапова Наталья Игоревна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии. E-mail: Nataliko7@yandex.ru*

*Миронов Сергей Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры общей биологии и экологии*

*Лепина Анастасия Валентиновна, студентка*

*Кобыльской Сергей Георгиевич, студент*

изменения ферментативной активности почвы, находящейся в продолжительном контакте с потенциальными токсикантами. С точки зрения нанозотоксикологии наибольший интерес представляют активность оксидоредуктаз (например, каталазная и аскорбинатоксидазная активность), характеризующая окислительно-восстановительные условия почвы и активность гидролаз (например, протеазная и уреазная активность), характеризующая интенсивность процессов минерализации органических веществ, в состав которых входят важнейшие питательные элементы – азот, фосфор и др [3].

**Цель работы:** исследование влияния углеродного наноструктурного материала «Таунит» производства ООО «НаноТехЦентр» на ферментативную активность чернозема типичного.

Материал «Таунит» представляет собой одномерные наномасштабные нитевидные образования поликристаллического графита в виде сыпучего порошка черного цвета. Гранулы УНМ микрометрических размеров имеют структуру спутанных пучков многостенных трубок. Пробы почв для постановки лабораторного эксперимента были отобраны по ГОСТ 28168-89 [4] в зоне, удаленной от г. Курска и других населенных пунктов более, чем на 10 км. Точечные пробы отбирали методом конверта. Объединенную пробу готовили из точечных проб.

Рассмотрение вопроса влияния УНМ на ферментативную активность почв имеет два аспекта. Прежде всего, это выявление зависимости уровня ферментативной активности от вносимых доз УНМ, а так же выявление зависимости уровня ферментативной активности почвы от времени контакта ее с УНМ. С учетом данного обстоятельства, постановка лабораторного эксперимента осуществлялась в 3-кратной повторности, как описано ниже.

Из объединенной пробы отбирали навески чернозема типичного в состоянии естественной влажности, вносили в них различные дозы материала «Таунит» так, чтобы содержание УНМ в каждом почвенном образце составляло 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0% соответственно, тщательно перемешивали. Приготовленные таким образом образцы помещали в промаркированные пластиковые контейнеры, которые закрывали пластиковыми крышками с большим количеством заранее пробитых отверстий небольшого диаметра (около 1 мм) и оставляли стоять на 3 месяца, периодически осуществляя полив почвенных образцов одинаковыми объемами дистиллированной воды. Выбор указанного диапазона вносимых доз

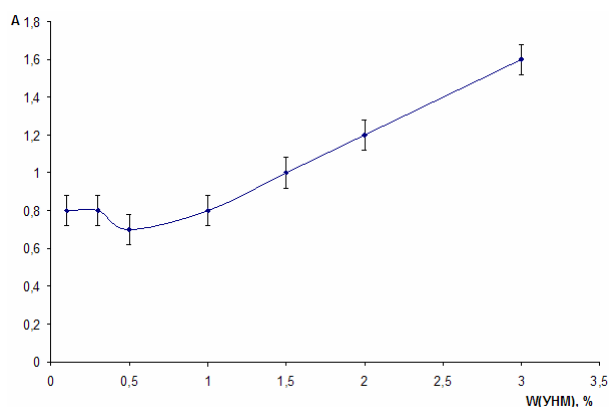
УНМ обусловлен прогнозируемым уровнем содержания углеродных наночастиц в почве в условиях их максимального поступления из различных источников [1]. Отбор проб из каждого модельного образца для определения каталазной, аскорбинатоксидазной, протеазной и уреазной активности осуществляли через 4, 10, 17, 30, 60 и 90 дней после внесения УНМ. Определение указанных видов ферментативной активности проводили по наиболее широко применяемым для этих целей методикам [3]. Анализ полученных результатов осуществляли по значениям параметра А, который определяли как отношение полученного значения ферментативной активности почв модельных образцов, загрязненных УНМ к значению ферментативной активности контрольного почвенного образца.

Показано, что в начальный момент времени (спустя 4 дня) происходит значительное снижение протеазной активности (в среднем на 80%), при этом доза УНМ в исследуемом диапазоне концентраций практически не влияет на интенсивность снижения. С течением времени происходит не только восстановление интенсивности работы почвенной протеазы (параметр А приближается к 1 спустя 10-17 дней), но и ее стимуляция (параметр А приближается к 2). Ближе к концу эксперимента произошло выравнивание уровня протеазной активности в модельных образцах с уровнем активности в контрольном образце (параметр А приблизился к 1). Следует отметить, что с увеличением внесенной дозы УНМ стимулирующий эффект становится менее выраженным.

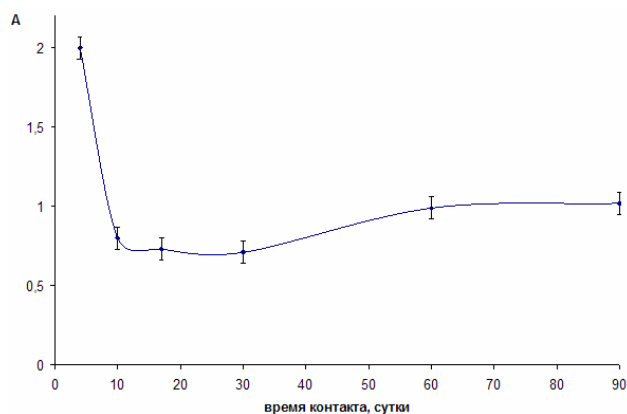
Характер изменения уреазной активности отличается от характера изменения протеазной. В начальный момент времени (спустя 4 дня) наблюдается стимуляция работы уреазы (в среднем на 30%), а затем (спустя 10 дней) падение уреазной активности (параметр А приближается к 0,7). При этом с увеличением концентрации УНМ в образце стимулирующий эффект более выражен. К концу эксперимента так же, как в случае с протеазной активностью, происходит приближение уровня уреазной активности в модельных образцах к уровню активности в контрольном образце.

Характер изменения исследованной оксидоредуктазной активности во времени напоминает изменение активности уреазы. Также в начальный момент времени (спустя 4 дня) наблюдается стимуляция работы оксидоредуктаз, при этом указанный эффект более выражен для каталазы (параметр А приближается к 3), в то время как для аскорбинатоксидазы параметр А колеблется в пределах от 0,9 до 1,4. Следует отметить, что с ростом концентрации УНМ

активность обеих оксидоредуктаз снижается. На 10-17 день наблюдается падение оксидоредуктазной активности с последующим восстановлением (спустя 60-90 дней) до уровня, зафиксированного в контрольном образце. При этом угнетение работы оксидоредуктаз более выражено в образцах с меньшим содержанием УНМ. На рис.1 в качестве примера представлена зависимость параметра А от вносимой дозы УНМ для каталазы чернозема типичного после десятидневного контакта. На рис. 2 – зависимость параметра А от времени для каталазы чернозема типичного при концентрации УНМ в 0,3%.



**Рис. 1.** Зависимость параметра А от вносимой дозы УНМ для каталазы чернозема типичного после десятидневного контакта



**Рис. 2.** Зависимость параметра А от времени для каталазы чернозема типичного при концентрации УНМ в 0,3%.

Таким образом, несмотря на внесение различных доз УНМ в модельные образцы чернозема типичного и различный характер изменений исследуемых видов ферментативной активности во время проведения эксперимента, во всех образцах происходит постепенное приближение параметра А к 1. Следовательно, можно предположить, что с течением времени (спустя 60-90 дней) происходит закрепление наноглеродного материала в почвенном комплексе, что снимает проявление стимулирующих и угнетающих эффектов.

Для подтверждения данного предположения было проведено изучение токсичности водных растворов материала «Таунит» и водных вытяжек из экспериментальных почвенных образцов с использованием лабораторной культуры инфузорий *Paramecium caudatum*, рекомендованной для применения в методиках, используемых для целей государственного экологического контроля [5]. При исследовании токсичности водных растворов в качестве исходного брали насыщенный раствор УНМ, приготовленный следующим образом: 0,001 г наноматериала помещали в 500 мл бидистиллированной воды, тщательно перемешивали и оставляли стоять в течение часа при температуре  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Затем после осаждения не растворившейся части навески при помощи пипетки отбирали аликвоту раствора из центральной части склянки. Содержание наночастиц в полученном растворе составляло менее  $2 \cdot 10^{-4}\%$ . Растворы с меньшей концентрацией УНМ готовили разбавлением исходного раствора в соотношениях 1:100, 1:1000, 1:10000 [5].

Исходный раствор и раствор, приготовленный разбавлением исходного 1:100 оказывали острое токсичное действие на инфузорий (смертность составила 100%). Более разбавленные растворы не были токсичны для *Paramecium caudatum* (смертность составила  $4,76 \pm 1,43\%$  и  $3,57 \pm 1,07\%$  соответственно). Почвенные вытяжки не оказывали токсичного воздействия на инфузорий как после 2-х часового контакта образцов с УНМ, так и после многодневного присутствия УНМ в почве. Смертность инфузорий в водных почвенных вытяжках (1:4) составляла от 0 до 8,70%, не зависимо от концентрации наноматериала в исследуемых почвенных образцах. Полученные результаты указывают на крайне низкую способность к миграции исследуемых УНМ по направлению почва → вода, а, следовательно, подтверждают предположение о возможности вхождения исследуемого УНМ в состав почвенного комплекса.

Следует отметить, что данный факт не только дает возможность высказать предположения о причинах постепенного выравнивания ферментативной активности в лабораторных образцах и контроле, но позволяет отметить отсутствие мешающего влияния УНМ на этапах проведения аналитических работ по определению каталазной, аскорбинатоксидазной, протеазной и уреазной активности, что делает правомерным применение отработанных методик и для целей эколого-гигиенических исследований наноматериалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Mueller, N.C.* Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment / *N.C. Mueller, B. Nowack* // *Environ. Sci. Technol.* 2008. 42(12). P. 4447-4453.
2. *Хазиев, Ф.Х.* Концептуальная модель формирования ферментативной активности почв. – М. Наука, 1979. С. 125-130.
3. Практикум по агрохимии. Учебное пособие / Под ред. академика РАСХН *В.Г. Минеева*. – М.: Изд-во МГУ, 2001. С. 323-342.
4. ГОСТ 28168-89 Почвы. Отбор проб. М.: Изд-во стандартов, 1989. 6 с.
5. ПНД Ф 14.1:2:3.13-06 Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* – М.: Изд-во МГУ, 2008. 34 с.

**RESEARCH OF INFLUENCE THE MULTILAYERED CARBON NANOTUBES ON FERMENTATION ACTIVITY OF TYPICAL BLACK SOIL**

© 2010 N.I. Kosolapova, S.Yu. Mironov, A.Yu. Lepina, S.G. Kobylskoy

Kursk State University

In work results of research the influence of various dozes of carbon nanostructural material «Таунит» on fermentation activity of typical black soil are presented. It is come out with the assumption of an opportunity of fastening nanocarbon material in an edaphic complex.

Key words: *nanomaterials, fermentation activity, black soil*

---

*Nataliya Kosolapova, Candidate of Chemistry, Associate Professor at the Chemistry Department. E-mail: Nataliko7@yandex.ru*  
*Sergey Mironov, Candidate of Biology, Associate Professor at the Common Biology and Ecology Department*  
*Anastasiya Lepina, Student*  
*Sergey Kobylskoy, Student*