

УДК 631.427. 631.465

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО ЧЕРНОЗЕМА ПРИ МЕЛИОРАЦИИ ГЛАУКОНИТОМ, «DOP-UNI» И ГУМАТОМ КАЛИЯ

© 2017 Т.В. Минникова, Т.В. Денисова, С.И. Колесников, Ю.В. Акименко

Южный федеральный университет. г. Ростов-на-Дону

Статья поступила в редакцию 20.05.2017

В условиях модельного лабораторного эксперимента проведено внесение мелиорантов в нефтезагрязненный чернозем и определение активности ферментов класса оксидоредуктаз: каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы. Для мелиорации использовали три мелиоранта разнонаправленного действия: глауконит, «Dop-Uni» и гумат калия. Установлено, что при нефтезагрязнении чернозема активность каталазы снижалась на 14%. Активность полифенолоксидазы увеличивалась на 10%. Активность пероксидазы достоверно не отличалась от контроля. После внесения только мелиорантов в чернозем активность каталазы была простимулирована комплексом глауконита с «Dop-Uni» и глауконита с гуматом калия. После внесения мелиорантов в нефтезагрязненный чернозем показаны как стимулирующие, так и ингибирующие активность эффекты: стимуляция активности каталазы и пероксидаз при внесении гумата калия и комплекса «Dop-Uni» с гуматом калия на 15 и 13%. Ингибирование активности каталазы и полифенолоксидаз выявлена для глауконита с гуматом калия. Сбалансированные процессы гумификации и минерализации отмечены при внесении глауконита и «Dop-Uni» в нефтезагрязненный чернозем. Тенденции к минерализации (K_r) показаны при внесении гумата калия, глауконита с гуматом калия, «Dop-Uni» с гуматом калия. Гумификация нефтезагрязненных черноземов выявлена при внесении глауконита, «Dop-Uni», комплекса «Dop-Uni» с глауконитом. Для биодиагностики нефтезагрязненных почв после внесения в них мелиорантов предлагается определять активность каталазы и полифенолоксидаз.

Ключевые слова: нефтезагрязнение, чернозем обыкновенный, оксидоредуктаза, каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза, глауконит, бактериальный препарат, гумат калия

Деградация почв юга России приобретает с каждым годом все большие масштабы. На территории Ростовской области не осуществляется добыча нефти, но в области находятся перерабатывающие нефть заводы, через ее территорию осуществляют транспортировку нефти. Зачастую эти пути пролегают через самые плодородные почвы мира – черноземы.

Одним из медиаторов техногенного нарушения биологических свойств почвы при нефтезагрязнении считают биохимическую активность [1]. Окислительно-восстановительные процессы в нефтезагрязненных почвах существенно изменяются и отражаются в изменении активности ферментов класса оксидоредуктаз [2-7]. Для оценки направленности процесса гумусообразования используют показатель степени минерализации чернозема, определяемый по отношению полифенолоксидазы к пероксидазе. При этом исходят из представления, что полифенолоксидаза играет ведущую роль в процессах новообразования гумуса, а пероксидаза – в его минерализации. Пероксидазы почв выполняют окисление органических веществ почв за счет

кислорода воздуха и перекиси водорода. Действие фермента приводит к окислению гумусовых веществ, которые сродни нефти являются углеводородами [8-10]. Полифенолоксидазы – это ферменты, участвующие в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумусового вещества [8, 9].

Снижение содержания нефти в черноземах может быть инициировано применением различных мелиорантов. Среди существующих методов мелиорации нефтезагрязненных почв не показан однозначный способ разложения нефти при надлежащей черноземам биологической активности почв, прямо связанной с плодородием почв. В связи с этим актуально исследование активности оксидоредуктаз нефтезагрязненных почв после внесения мелиорантов различной природы.

Цель работы: оценить изменение активности оксидоредуктаз нефтезагрязненного чернозема при мелиорации глауконитом, «Dop-Uni» и гуматом калия.

Материалы и методики исследования. Объект исследования – чернозем обыкновенный карбонатный южно-европейской фации [11]. Место отбора – Ботанический сад Южного федерального университета (А_{пав}, 0-20). Содержание общего гумуса – 1,3%, реакция почвенной среды (pH) – 7,4. На юге России чаще встречается загрязнение легкой нефтью (плотность 0,818 г/м³). Нефть, вносимая в почву, обладает со следующими характеристиками: массовая доля серы – 0,43%, массовая доля механических

Минникова Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник. E-mail: loko261008@yandex.ru

Денисова Татьяна Викторовна, доктор биологических наук, профессор. E-mail: denisova777@inbox.ru

Колесников Сергей Ильич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой экологии и природопользования. E-mail: kolesnikov@sfedu.ru

Акименко Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, ассистент. E-mail: akimenkojuliya@mail.ru

примесей – 0,0028%, массовая доля воды – 0,03%, концентрации хлористых солей – 40,1 мг/дм³. После внесения в воздушно-сухую почву нефти (5% от массы почвы), в почву вносили мелиоранты. Для изучения процессов ремедиации нефтезагрязненной почвы были выбраны 3 мелиоранта различной природы: глауконит – минеральный (глинистый) адсорбент; «Dop-Uni» – бактериальный препарат, содержащий три штамма нефтеразрушающих бактерий родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и *Candida* и гумат калия – соль гуминовой кислоты. Контролем

служили образцы почвы, не подвергавшиеся загрязнению нефтью и воздействию мелиорантов. Эксперимент ставили в 3-х кратной повторности. Все мелиоранты вносили в почву предварительно смешанную с нефтью в дозах рекомендованных производителями. Глауконит добавляли в соотношении относительно нефти 1:6 (0,8% от массы почвы). Биологический препарат «Dop-Uni» добавляли в почву в концентрации 5 л/м². Гумат калия вносили, исходя из рекомендаций для садовых культур 0,5% растворов. Схема опыта представлена в табл. 1.

Таблица 1. Варианты опыта, используемые в работе

№	Варианты №№ 1-7	№	Варианты №№ 8-14
1	контроль	8	нефть (Н, 5% нефти)
2	глауконит	9	Н+ глауконит
3	«Dop-Uni»	10	Н+ «Dop-Uni»
4	гумат калия	11	Н+ гумат калия
5	глауконит + «Dop-Uni»	12	Н+ глауконит + «Dop-Uni»
6	глауконит+ гумат калия	13	Н+ глауконит+ гумат калия
7	«Dop-Uni»+ гумат калия	14	Н+ «Dop-Uni»+ гумат калия

Активность оксидоредуктаз определяли в воздушно-сухих образцах стандартными в экологии и биологии почв методами [12-14]. Активность каталазы ($H_2O_2:H_2O_2$ – оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6.) определяли газометрическим методом по разложению перекиси водорода при контакте с почвой по А.Ш. Галстяну (1956). Активность пероксидаз (донор: H_2O_2 – оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.7) и полифенолоксидаз (О-дифенол: кислород – оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.1) определяли по Л.А. Карягиной, Н.А. Михайловой (1986) окислением гидрохинона до хинонов, имеющих коричневатую-бурую окраску при экстрагировании спиртом. О степени минерализации почвы судили по отношению между активностью пероксидаз (ПО) и полифенолоксидаз (ПФО), участвующих в процессах окисления продуктов гидролиза органических соединений с образованием предгумусовых веществ. Отношение активностей этих ферментов представляет собой коэффициент гумификации (гумусирования) – Кг. По коэффициенту гумификации оценивают процессы минерализации или гумификации, происходящие в почве. Лабораторно-аналитические исследования выполнены в 9-кратной повторности. При обсуждении результатов учитывали статистически достоверные различия при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили при использовании программы Statistitica 10.0.

Результаты и их обсуждение.

Изменение активности каталазы. При рекультивации нефтезагрязненных почв именно активность каталазы считают наиболее информативной при оценке состояния экосистемы [3, 4]. Активность каталазы нефтезагрязненного чернозема была на 26% ниже контроля (табл. 2). Активность каталазы в нефтезагрязненном черноземе (5% от массы почвы) составила 5,4 мл O_2 /г/мин, что согласуется с

результатами А.В. Шамраева и О.Н. Гончаровой (2011) [4]. При внесении глауконита, гумата калия и «Dop-Uni» активность каталазы слабо изменялась по сравнению с контролем. В то время как при комплексном внесении глауконита с «Dop-Uni» и глауконита с гуматом калия показано увеличение активности каталазы на 17 и 14%. Применение глауконита, гумата калия и комплекса гумата калия + «Dop-Uni» вызвало снижение активности каталазы на 17, 16 и 18% по сравнению с контролем соответственно. Для комплекса глауконит+гумат калия и глауконит+«Dop-Uni» отмечен практически одинаковый стимулирующий эффект – активность фермента выше контроля на 18 и 17% соответственно.

По мнению Т.С. Шориной (2009) [15] процессы окисления нефтезагрязненного чернозема в верхнем слое почвы, через месяц после внесения нефти, связаны с повышенной микробиологической активностью, простимулированной внесением мелиорантов. Похожие результаты были ранее получены при исследовании активности каталазы в нефтезагрязненных почвах юга России [16, 17]. Применение мелиорантов при нефтезагрязнении носило разнонаправленный характер. В вариантах с внесением «Dop-Uni» и глауконит+гумат калия в нефтезагрязненный чернозем наблюдали выраженное подавление активности фермента на 43-60%. Во всех остальных вариантах наблюдали положительный мелиоративный эффект, где активность фермента повышалась по сравнению с нефтезагрязнением и достоверно не отличалась от контроля (Н+гумат калия; Н+глауконит; Н+глауконит+«Dop-Uni»; Н+«Dop-Uni»+гумат калия).

Изменение активности пероксидаз и полифенолоксидаз. Изменение активности пероксидазы и полифенолоксидазы носило противоположный характер (табл. 2). Загрязнение нефтью достоверно не

изменяло активность пероксидазы. Самостоятельное применение мелиорантов в подавляющем большинстве вариантов стимулировало активность пероксидазы на 10-12%. Как известно, пероксидазы катализируют окисление полифенолов в присутствии перекиси водорода или органических перекисей, так как сами перекиси обладают сравнительно слабым окисляющим действием на фенолы. Ее влияние направлено на окисление гумусовых веществ [14]. Некоторые авторы [14] считают, что увеличение активности пероксидаз может быть следствием включения этого фермента в процессы детоксикации загрязняющих веществ.

Активность полифенолоксидаз нефтезагрязненного чернозема до внесения повышалась на 10%. В отдельных случаях (Н+глауконит; Н+«Dop-Uni»+гумат калия) наблюдали снижение активности полифенолоксидазы на 19 и 22% соответственно. В целом по сравнению с незагрязненными образцами активность полифенолоксидаз увеличивалась на

15-20%. Полифенолоксидазы участвуют в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Похожие тенденции, заключающиеся в стимулировании активности полифенолоксидаз внесением нефти, наблюдали в работах Р.Р. Сулейманова с соавторами (2007, 2012) [3, 4]. Авторами было установлено, что активность полифенолоксидаз и эмиссии углекислого газа увеличивалась, что может быть вызвано использованием невысоких доз нефти, как дополнительного источника углерода. При увеличении концентрации нефти выше 5% активность ферментов снижалась [4].

Коэффициент гумификации. Активность полифенолоксидаз идентифицирует процессы гумификации чернозема (синтеза гумусовых веществ), пероксидаз – минерализации (распада гумусовых веществ). В таблице 2 представлены абсолютные значения активности каталазы, пероксидаз и полифенолоксидаз и показан коэффициент гумификации.

Таблица 2. Изменение активности оксидоредуктаз ($M \pm m$) и коэффициента гумификации при внесении мелиорантов в нефтезагрязненный чернозем

№ ва-ри-ан-та	каталаза	полифе-нолокси-дазы	перокси-дазы	K _г
	мл O ₂ /г/мин	мг 1,4 бензохинона/г/30 мин		
1	7,3±0,2	0,77±0,06	0,85±0,01	0,90
2	5,4±0,6*	0,85±0,01*	0,83±0,01	1,02
3	6,3±0,1*	0,62±0,03*	0,77±0,01*	0,81
4	6,7±0,4	0,78±0,02	0,83±0,01	0,94
5	7,0±0,5	0,69±0,02*	0,79±0,01*	0,88
6	2,9±0,2*	0,83±0,01	0,85±0,02	0,97
7	6,4±0,5*	0,66±0,03*	0,74±0,02*	0,89
8	8,1±0,2*	0,76±0,02	0,94±0,02*	0,81
9	8,5±0,5*	0,70±0,01	0,82±0,01	0,85
10	6,6±0,8*	0,79±0,04	0,82±0,03	0,96
11	8,3±0,6	0,67±0,03*	0,83±0,04	0,80
12	4,0±0,5*	0,66±0,03*	1,00±0,03*	0,65
13	6,1±0,5*	0,59±0,01*	0,79±0,03	0,74
14	6,8±0,2	0,75±0,03	0,98±0,04	0,77

Примечание: * достоверные отличия, $p < 0,05$

Коэффициент гумификации или гумусообразования (K_g) демонстрирует отношение между активностью полифенолоксидазы и пероксидазы, позволяющий оценить тенденции процессов гумусообразования: минерализации или гумификации. Если значение коэффициента (K_g) равно 1, то можно утверждать, что процессы синтеза и распада гумусовых веществ находятся в относительном равновесии [18, 19]. Так, в нефтезагрязненном черноземе показан баланс между процессами гумификации и минерализации ($K_g=1$). Внесение нефти по сравнению с контролем усиливает гумификацию чернозема. В контроле показано увеличение процессов минерализации, т.е. распада гумусовых веществ ($K_g=0,90$). При самостоятельном внесении мелиорантов, кроме гумата калия, показана разная интенсивность

процессов минерализации и гумификации. Так, для гумата калия показана тенденция к минерализации ($K_g=0,89$). При внесении гумата калия с другими мелиорантами $K_g = 0,65$ для комплекса гумата калия с глауконитом и 0,77 для комплекса гумата калия с «Dop-Uni».

Увеличение коэффициента гумификации не всегда можно идентифицировать как усиление процессов гумусообразования в сторону новообразования. Также нельзя утверждать, что K_g меньше 1 свидетельствует об усилении процессов минерализации [4]. При ремедиации загрязненных техническим маслом почв и использовании для биоремедиации бактерий рода *Acinetobacter* в показано увеличение коэффициента гумификации через 15 суток после начала опыта [20].

Выводы:

1. При нефтезагрязнении чернозема показано снижение активности каталазы на 14%. Активность полифенолоксидазы увеличивалась на 10%. Активность пероксидазы достоверно не отличалась от контроля.

2. После внесения только мелиорантов в чернозем активность каталазы была простимулирована комплексом глауконита с «Dop-Uni» и глауконита с гуматом калия.

3. После внесения мелиорантов в нефтезагрязненный чернозем показаны как стимулирующие, так и ингибирующие активность эффекты: стимуляция активности каталазы и пероксидаз при внесении гумата калия и комплекса «Dop-Uni»+гумат калия на 15 и 13%. Ингибирование активности каталазы и полифенолоксидаз показана выявлена для глауконита с гуматом калия.

4. Сбалансированные процессы гумификации и минерализации отмечены при внесении глауконита и «Dop-Uni» в нефтезагрязненный чернозем. Тенденции к минерализации (K_r) показаны при внесении гумата калия, глауконита с гуматом калия, «Dop-Uni» с гуматом калия. Гумификация нефтезагрязненных черноземов выявлена при внесении глауконита, «Dop-Uni», комплекса «Dop-Uni» с глауконитом.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (5.5735.2017/8.9) и Президента Российской Федерации (НШ-9072.2016.11, МК-326.2017.11)

Авторы благодарны ООО «Лаборатория микробных технологий» г. Москва за предоставление бактериального препарата «Dop-Uni» и фирму ООО «Глауконит» г. Челябинск за предоставление глауконита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Габбасова, И.М. Оценка степени восстановления нефтезагрязненных почв с давними сроками загрязнения после биологической рекультивации / И.М. Габбасова, Ф.Х. Хазиев, Р.Р. Сулейманов // Почвоведение. 20026. №10. С. 1259-1273.
- Шамраев, А.В. Влияние биопрепарата «Ленойл» на активность каталазы нефтезагрязненных почв / А.В. Шамраев, О.Н. Гончарова // Вестник ОГУ. 2011. №12. С. 447-449.
- Сулейманов, Р.Р. Ферментативная активность и агрохимические свойства лугово-аллювиальной почвы в условиях нефтяного загрязнения / Р.Р. Сулейманов, Т.А. Абдрахманов, З.А. Жаббаров, Л.Т. Турсунов // Самарская Лука. 2007. Т.16. № 3 (21). С. 575-580.
- Сулейманов, Р.Р. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного (Оренбургская область) / Р.Р. Сулейманов, Т.С. Шорина // Известия Самарского научного центра РАН. 2012. Т. 14, № 1. С. 240-243.
- Руденко, Е.Ю. Биологическая рекультивация нефтезагрязненной почвы отработанным кизельгуром / Е.Ю. Руденко, В.В. Бахарев // Экологические системы и приборы. 2013. № 5. С. 22-27.
- Bachmann, R.Th. 2014. Biotechnology in the petroleum industry: an overview / R.Th. Bachmann, A.C. Johnson, R.G.J. Edyvean // International Biodeterioration & Biodegradation.2014. V. 86. P. 225-237.
- Chen, M. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs / M. Chen, P. Xua, G. Zeng et al. // Biotechnology Advances.2015. V. 33. P. 745-755.
- Зенова, Г.М. Практикум по биологии почв: учебное пособие / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, А.А. Лихачева, Н.А. Манучарова. – М.: МГУ, 2002. 170 с.
- Русанов, А.М. Динамика биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении / А.М. Русанов, Т.С. Шорина // Вестник ОГУ. 2009. №10. 2009. С. 600-603.
- Шорина, Т.С. Влияние нефтяного загрязнения на свойства черноземов Оренбургского Предуралья и пути их восстановления / Дис. ... к.б.н. – Оренбург, 2011. 171 с.
- Безуглова, О.С. Почвы Ростовской области: учебное пособие / О.С. Безуглова, М.М. Хырхырова. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮФУ, 2008, 352 с.
- Казеев, К.Ш. Биодиагностика почв: методология и методы исследований / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. 260 с.
- Казеев, К.Ш. Методы биодиагностики наземных экосистем / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, Ю.В. Акименко, Е.В. Даденко. – Ростов-на-Дону: Издательство ЮФУ, 2016. 356 с.
- Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. Ин-т биологии Уфим. НЦ РАН. – М : Наука, 2005. 252 с.
- Шорина, Т.С. Влияние нефтяного загрязнения на биологическую активность черноземов Оренбургской области // Вестник Оренбургского государственного университета . 2009. № 6. С. 651-653.
- Колесников, С.И. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическое состояние чернозема обыкновенного / С.И. Колесников, К.Ш. Казеев, М.Л. Татосян, В.Ф. Вальков // Почвоведение. 2006. № 5. С. 616-620.
- Колесников, С.И. Биодиагностика устойчивости предгорных и горных почв Западного Кавказа к загрязнению нефтью и нефтепродуктами / С.И. Колесников, Р.К. Татлок, З.Р. Тлехас и др. // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2013. № 1. С. 30-34.
- Дырин, В.А. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в торфе целинного и культивируемого участков болотной экосистемы низинного типа // Вестник ТГПУ. 2015. №2(155). С. 164-170.
- Хасанова, Р.Ф. Оптимизация гумусного состояния почв степных агроэкосистем / Р.Ф. Хасанова, Я.Т. Суюндуков, Э.Ф. Сальманова // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 10 (185). С. 195-198.
- Логина, О.О. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области / О.О. Логина, Т.Т. Данг, Е.В. Белоусова, М.Ю. Грабович // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация, 2011. № 2. С. 127-133.

ASSESSMENT THE ACTIVITY OF PETROPOLLUTED CHERNOZEM OXIDOREDUCTASES AT MELIORATION BY GLAUKONITE, “DOP-UNI” AND HUMATE POTASSIUM

© 2017 T.V. Minnikova, T.V. Denisova, S. I. Kolesnikov

Southern Federal University

In the conditions of a model laboratory experiment, the introduction of ameliorates to the petrol polluted chernozem and definition the enzymes activity of oxidoreductases class: catalases, peroxidases, polyphenoloxidases is carried out. For melioration used three ameliorates of multidirectional action: glauconite, “Dop-Uni” and humate potassium. It is established that at petrol polluted chernozem activity of catalase decreased by 14%. The activity of a polyphenoloxidase increased by 10%. The activity of peroxidase authentically did not differ from control. After the introduction only ameliorates to the chernozem it is shown, that activity of catalase was stimulated by a complex of glauconite with “Dop-Uni” and glauconite with a potassium humate. However, after the introduction the ameliorates to the petrol polluted chernozem are shown, the effects both stimulating, and inhibiting activity: stimulation of the activity of catalase and peroxidases at the introduction of humate potassium and “Dop-Uni” complex with a potassium humate for 15 and 13%. Inhibition the activity of catalase and polyphenoloxidases are improved for glauconite with potassium humate. The balanced processes of humification and a mineralisation are noted at the introduction of glauconite and “Dop-Uni” to the petrol polluted chernozem. Tendencies to mineralisation (Kg) at introduction of humate potassium, glauconite with humate potassium, “Dop-Uni” with potassium humate are shown. Humification of the petrol polluted chernozems at introduction of glauconite, “Dop-Uni”, the “Dop-Uni” complex with glauconite is revealed. For diagnostics of the petrol polluted soils after the introduction of ameliorates in them, it is offered to define the activity of catalase and polyphenoloxidases.

Key words: petrol pollution, chernozem ordinary, oxidoreductase, catalase, peroxidases, polyphenoloxidase, glauconite, bacterial preparation, humate potassium

Tatiana Minnikova, Minor Research Fellow.

E-mail: loko261008@yandex.ru

Tatiana Denisova, Doctor of Biology, Professor.

E-mail: denisova777@inbox.ru

Sergey Kolesnikov, Doctor of Agriculture,

Head of the Ecology and Nature Management

Department. E-mail: kolesnikov@sfsu.ru

Yulia Akimenko, CandidateA of Biology,

Assistant. E-mail: akimenkojuliya@mail.ru