

## ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ КЛАССОВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И ГИДРОЛАЗ

**Сергатенко Светлана Николаевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биология, химия, технология хранения и переработки продукции растениеводства»,

**Федорова Ирина Леонидовна**, кандидат химических наук, доцент кафедры «Биология, химия, технология хранения и переработки продукции растениеводства»,

**Игнатова Татьяна Дмитриевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биология, химия, технология хранения и переработки продукции растениеводства»,

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1,

E-mail: tatyaignatova@yandex.ru

**Ключевые слова:** нефть, нефтяное загрязнение, ферментативная активность почвы, биогумус, цеолит, диатомит.

Ферментативная активность почвы является важнейшим биохимическим показателем плодородия и определяется химическим составом, видовым и количественным разнообразием почвенной микробиоты и растений, набором и степенью активности почвенных ферментов. В статье показана динамика ферментативной активности почвы, подвергшейся загрязнению нефтью месторождения «Вишенское» Мелекесского района Ульяновской области до и после возделывания яровой пшеницы, а также с использованием сорбентов биогумуса, цеолита и диатомита. Для оценки биологического состояния почвы, загрязненной нефтепродуктами, определялась активность основных ферментов почвенного пула класса оксидоредуктаз (полифенолоксидазы), пероксидазы, каталазы) и класса гидролаз (фосфатазы, инвертазы). В результате проведенных исследований было установлено, что нефтяное загрязнение снижает активность оксидоредуктазных и части гидролитических ферментов. Степень ингибирования коррелирует с концентрацией нефти в почве. Обнаружена прямая зависимость степени ингибирования полифенолоксидазы, каталазы, фосфатазы и инвертазы от концентрации нефти. Установлено, что внесение диатомита повышало активность пероксидазы и инвертазы, цеолита и биогумуса – фосфатазы. Для оценки состояния плодородия почвы используется коэффициент накопления гумуса (коэффициент гумификации), определяемый как отношение активности полифенолоксидазы к активности пероксидазы. Данный коэффициент позволяет оценить тенденции процессов гумусообразования: гумификации или минерализации. Определено, что внесение низких доз нефти (2-3%) повышает коэффициент гумификации, а высоких концентраций (8%) - снижает. Для диагностики состояния нефтезагрязненных почв целесообразно определять активность базовых ферментов: полифенолоксидазы, пероксидазы, каталазы, фосфатазы и инвертазы.

### Введение

В современных условиях к распространенным факторам антропогенного воздействия относится нефтяное загрязнение почвы. Изучение динамики восстановления почвенного плодородия и нормального функционирования почвенной экосистемы является перспективным и требует дальнейшей детализации.

К важнейшим биологическим критериям, оценивающим степень нефтяного загрязнения, относят изменение биохимических показателей ферментной активности почвы. Почвенные ферменты катализируют синтез и разложение органических веществ, образование гумуса, нитрификацию и ряд других процессов. Ферментный состав зависит от химического состава и типа почв, от степени и характера экзогенного воздействия [1]. Сведений о ферментативной активности разных типов почв накоплено недостаточно, поэтому проведенное исследование

весьма актуально в теоретическом и практическом планах.

### Материалы и методы исследований

Объектом исследования являлась почва - чернозем выщелоченный среднемошной среднесуглинистый. В почву вносили нефть месторождения «Вишенское» Мелекесского района Ульяновской области, групповой состав которой представлен парафинами (3,73%), асфальтенами (10,23%), смолами силикагелевыми (26,26%), серой (3%).

Лабораторный эксперимент проводили с семенами яровой пшеницы сорта Землячка по схеме: 1) контроль; 2) 2% нефти; 3) 3% нефти; 4) 4% нефти; 5) 8% нефти; 6) 3% нефти + биогумус; 7) 3% нефти + цеолит; 8) 3% нефти + диатомит. В качестве сорбентов использовали диатомит Инзенского месторождения Ульяновской области, цеолит (кремнеземистый мергель Сиуч-Юшанского месторождения).

Ферментативную активность почвы определяли: активность каталазы по методу Джонса и Темпле, пероксидазы и полифенолоксидазы - по методам К.А.Козлова, инвертазу- методом И.И. Ромейко и С.М. Малинской, фосфатазы- методом А.Ш. Галстяна и Э.А. Арутюнян [2]. Повторность определения- трехкратная.

### Результаты исследований

Ферментативная активность почвы является важнейшим биохимическим показателем плодородия и определяется химическим составом, видовым и количественным разнообразием почвенной микробиоты и растений, набором и степенью активности почвенных ферментов, а также комплексом взаимодействующих экологических факторов [1].

Для оценки биологического состояния почвы, загрязненной нефтепродуктами, определялась активность основных ферментов почвенного пула класса оксидоредуктаз (полифенолоксидаза (ПФО), пероксидаза (ПО), каталаза) и класса гидролаз (фосфатаза, инвертаза). Активность большинства ферментов, содержащихся в почве загрязненной нефтепродуктами, снижалась с повышением концентрации нефти. Наиболее выраженному угнетению подвергалась полифенолоксидаза (рис.1). В почвах с низкими концентрациями нефти (2-4%) активность фермента уменьшалась на 64-71%.

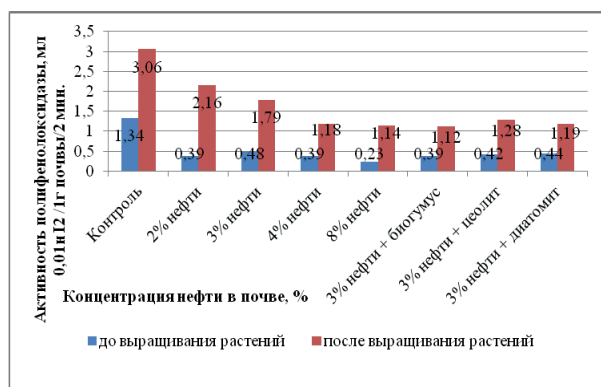


Рис. 1 - Влияние различных доз нефти на активность полифенолоксидазы

Высокие дозы нефтяного загрязнения (8%) приводили к шестикратному ингибированию ПФО. Добавление цеолита, диатомита или биогумуса как адсорбирующих и ионообменных агентов незначительно увеличивало активность полифенолоксидазы по сравнению с 3-% нефтяным загрязнением. Сходное изменение активности ПФО наблюдалось в образцах почв, полученных после выращивания яровой пшени-

цы, только численные значения троекратно превышали аналогичные показатели первой серии опытов (рис. 1).

Активность второго фермента класса оксидоредуктаз – пероксидазы в зависимости от концентрации нефтяного загрязнения изменялась неоднозначно. Низкая доза нефтяного загрязнения (2%) вызвала резкое ингибирование фермента на 82,5% по сравнению с контролем (рис. 2).

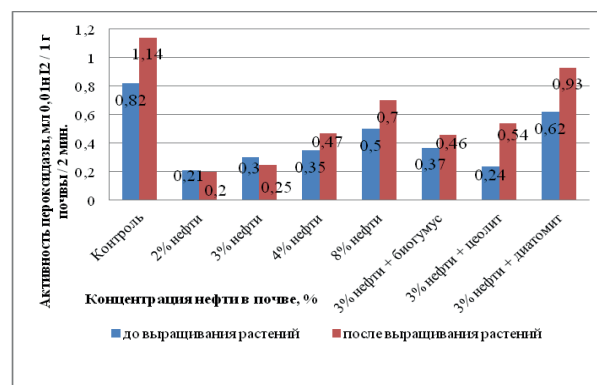


Рис. 2 - Влияние различных доз нефти на активность пероксидазы

При увеличении концентрации нефти от 3 до 8% наблюдалась частичная активизация пероксидазы, уровень ее активности составил половину от контрольного значения. Добавление диатомита и цеолита дополнительно повышало степень активности данного фермента в серии почвенных образцов после выращивания пшеницы.

Для оценки состояния плодородия почвы используют коэффициент накопления гумуса (коэффициент гумификации), определяемый как отношение активности полифенолоксидазы к активности пероксидазы. Данный коэффициент позволяет оценить тенденции процессов гумусообразования: гумификации или минерализации [3]. В наших экспериментах наибольший коэффициент гумификации в почвенных образцах 2 и 3% нефтяного загрязнения (табл.1).

Если значение данного показателя больше единицы, то процессы синтеза гуминовых веществ преобладают над их минерализацией, что наблюдалось в большинстве вариантов. Наименьшее значение коэффициента гумификации было получено в почве с высоким нефтяным загрязнением (8%) и при добавлении диатомита. В данных вариантах преобладает процесс разложения гуминовых соединений.

Важным ферментом, участвующим в про-

## Коэффициент накопления гумуса в почве

Вариант	Контроль	2% нефти	3% нефти	4% нефти	8% нефти	3% нефти + биогумус	3% нефти + цеолит	3% нефти + диатомит
До выращивания растений	1,63	1,68	1,6	1,11	0,46	1,05	1,75	0,71
После выращивания растений	1,63	10,8	7,16	2,51	1,63	2,43	2,37	1,28

цессах почвообразования, является каталаза. Динамика ее активности наиболее информативна при оценке почвенной экосистемы, подвергшейся антропогенному нефтяному загрязнению. В наших экспериментах ее активность снижалась по мере увеличения концентрации нефти в почве.

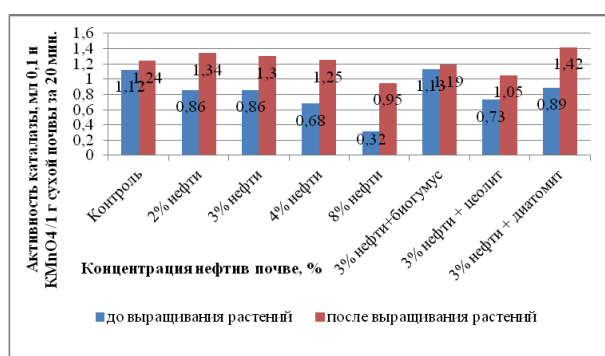


Рис. 3 - Влияние различных доз нефти на активность каталазы

Максимальное ингибирование наблюдалось при 8%-м нефтяном загрязнении, когда работа фермента замедлилась на 71% по сравнению с контролем (рис. 3). Добавление биогумуса снимало ингибирующий эффект 3% нефтяного загрязнения и возвращало степень активности каталазы к контрольным показателям.

Внесение других адсорбирующих агентов (цеолита и диатомита) не оказывало столь выраженного воздействия на активность каталазы в серии опытных образцов до выращивания пшеницы, однако во второй серии наблюдалось повышение активности фермента и при внесении диатомита.

В опытных вариантах после выращивания растений активность каталазы при низких дозах нефтяного загрязнения незначительно увеличивалась, а при высоких дозах понижалась на 23,4% от контрольного значения.

Активность гидролитического фермента фосфатазы имела обратную корреляционную зависимость от концентрации нефти в почвенном образце. Максимально низкий уровень ак-

тивности фермента, а именно трехкратное снижение наблюдалось в почве с высокой концентрацией нефти (8%) (рис. 4). Аналогичная динамика активности фосфатазы прослеживалась и в серии почвенных образцов после выращивания растений. Добавление биогумуса и цеолита незначительно активировало фермент, приближая показатель к контрольным цифрам.

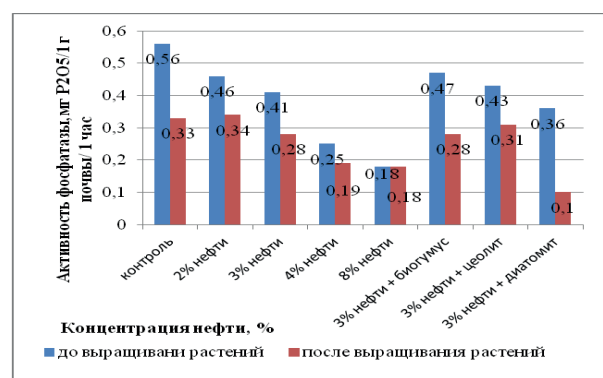


Рис. 4 - Влияние различных доз нефти на активность фосфатазы

Низкие концентрации нефти (2%) оказывали стимулирующее действие на фермент, повышая его активность на 51% по сравнению с контролем.

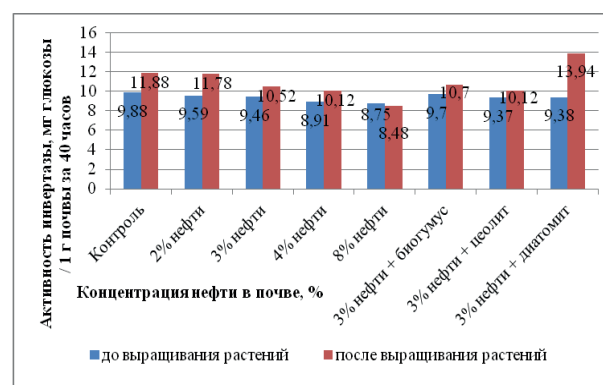


Рис. 5 - Влияние различных доз нефти на активность инвертазы

Главным гидролитическим ферментом, определяющим уровень плодородия почвы и ее биохимический потенциал, является инвер-

таза. В наших исследованиях прослеживалась обратная корреляционная зависимость между активностью фермента и уровнем нефтяного загрязнения (рис. 5).

Низкие концентрации нефти вызывали незначительное уменьшение активности инвертазы. Действие высоких доз нефтяного загрязнения снижало работу фермента на 11,4% в образцах до выращивания растений и на 28,6% - в образцах после выращивания растений. Внесение биогумуса было эффективным в почвенных образцах до выращивания растений пшеницы, тогда как в серии после растений наибольшее влияние оказал диатомит.

Важнейшим биохимическим показателем, характеризующим плодородие почв и степень антропогенного воздействия, является активность почвенных ферментов, таких как полифенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, фосфатаза, инвертаза. Активность этих ферментов зависит от концентрации нефти в почве [3, 4].

Рядом ученых отмечалось повышение активности полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы при нефтехимическом загрязнении почвы [5, 6]. В наших исследованиях был получен противоположный результат, а именно подавление активности большинства ферментов высокими дозами нефти, что согласуется с работами Сулейманова Р.Р. и Шориной Т.С. [3]. Данный факт можно объяснить токсическим действием нефтепродуктов на структуру ферментов, степень их сродства к субстрату [7].

Снижение активности почвенных ферментов класса оксидоредуктаз обусловлено обволакиванием частиц почвы углеводородами нефти, что затрудняет взаимодействие активного центра фермента с субстратом [8,9]. Второй возможной причиной уменьшения ферментативной активности является прямое ингибирование фермента содержащимися в составе нефти ионами тяжелых металлов, фенольными соединениями, продуктами окисления некоторых углеводородов [8, 9, 10]. Ингибиторы прямого действия нарушают конформацию активного центра фермента, затрудняют сорбцию субстрата, что приводит к резкому замедлению скорости катализируемой реакции.

Ферменты класса оксидоредуктаз катализируют окислительно-восстановительные реакции, играющие основную роль в процессах самоочищения почвы от экзогенных веществ, в частности нефтепродуктов [10]. Наиболее информативной в этом плане является динамика

активности каталазы, которая может использоваться для энзимологической диагностики состояния загрязненности почв и изменения окислительно-восстановительных условий среды. Активность каталазы напрямую зависит от уровня низкомолекулярных углеводородных соединений [6, 10, 12]. В нефти преобладают высокоуглеродистые соединения ароматического ряда, которые не могут служить субстратом для данного фермента, что объясняет снижение активности каталазы в наших экспериментах.

Для оценки степени нефтяного загрязнения почв также используется активность инвертазы и является достаточно информативным показателем [9, 14]. Снижение активности данного фермента по мере роста концентрации нефти в почве можно объяснить замедлением почвенных окислительно-восстановительных реакций в результате нефтяного загрязнения. Известно, что инвертаза катализирует гидролиз сахарозы и фруктотрансферазные реакции глюкозы, галактозы и рамнозы [10, 12, 14]. В почвах, подвергшихся нефтяному загрязнению, данные процессы затруднены, что отражается на каталитических параметрах инвертазы. Рост численных показателей активности инвертазы в серии образцов после возделывания пшеницы объясняется интенсивными выделениями данного фермента корнями вегетирующих растений.

#### **Заключение**

В результате проведенных исследований установлено, что нефтяное загрязнение снижает активность оксидоредуктазных и части гидролитических ферментов. Степень ингибирования коррелирует с концентрацией нефти в почве.

Внесение адсорбирующих и ионно-обменных агентов в почву, загрязненную нефтью, оказывает неоднозначное воздействие. Добавление биогумуса приводит к незначительному усилению активности фосфатазы в почве, свободной от растений. Внесение диатомита активирует пероксидазу и инвертазу. Применение цеолита как адсорбирующего агента повышает активность фосфатазы. Нефтяное загрязнение изменяет коэффициент накопления гумуса.

Таким образом, для диагностики состояния почв, подвергшихся нефтяному загрязнению, целесообразно определять активность базовых ферментов: полифенолоксидазы, пероксидазы, каталазы, фосфатазы и инвертазы.

#### **Библиографический список**

1. Лапа, В.В. Активность оксидаз в высоко окультуренной дерново-подзолистой легкосу-

глинистой почве при разных уровнях минерального питания сельскохозяйственных культур / В.В. Лапа, Н.А. Михайловская, С.А. Касьянчик, Т.В. Погирницкая // Почвоведение и агрохимия. – 2016. – №2. – С.124–134.

2. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев // Институт биологии Уфим. НЦ РАН. – М.: Наука. – 2005. – 252 с.

3. Сулейманов, Р.Р. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного (Оренбургская область) / Р.Р. Сулейманов, Т.С. Шорина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – Т.14. – №1. – 2012. – С.240–243.

4. Колесников, С.И. Изменение ферментативной активности чернозема обыкновенного при загрязнении нефтью и нефтепродуктами в модельных экспериментах / С.И. Колесников, М.Л. Татосян, Д.К. Азнаурьян // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2007. – № 5. – С. 32–34.

5. Влияние мелафена и микроэлементов на ферментативную активность почвы в агрофитоценозе сахарной свеклы на фоне гербицидного стресса / В.И. Костин, В.А. Исайчев, В.А. Ошкин, И.Л. Федорова, Т.Д. Игнатова // Сахарная свекла. – 2018. – № 8. – С. 29–33.

6. Костин, В.И. Экологическая оценка ферментативной активности почвы агрофитоценоза сахарной свёклы при совместном применении гербицидов и мелафена / В.И. Костин, В.А. Ошкин, И.Л. Федорова // В сборнике: Современные проблемы эволюции и экологии. XXX Люблинские чтения. – 2016. – С. 372–375.

7. Влияние низких уровней нефтезагрязнения почвы на активность оксидоредуктаз / В.И. Полонский, И.Ю. Борцова, Д.Е. Полонская, Т.С. Бородулина // Вестник Красноярского ГАУ. –

2011. – №6. – С.90–94.

8. 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.

9. Дырин, В.А. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в торфе целинного и культивируемого участков болотной экосистемы низинного типа / В.А. Дырин // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2015. – №2(155). – С. 164-170.

10. Методы биодиагностики наземных экосистем / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, Ю.В. Акименко, Е.В. Даденко. – Ростов-на-Дону: Издательство ЮФУ, – 2016. – 356 с.

11. Chen, M. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals bycomposting: Applications, microbes and future research needs / M. Chen, P. Xua, G. Zeng et al. // Biotechnology Advances. – 2015. – V. 33. –P. 745–755.

12. Руденко, Е.Ю. Биологическая рекультивация нефтезагрязненной почвы отработанным кизельгуром / Е.Ю. Руденко, В.В. Бахарев // Экологические системы и приборы. – 2013. – № 5. – С. 22-27.

13. Русанов, А.М. Динамика биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении / А.М. Русанов, Т.С. Шорина // Вестник ОГУ. – 2009. – № 10. – С. 600-603.

14. Бородулина, Т.С. Влияние нефтезагрязнения почвы на физиологические характеристики растений пшеницы / Т.С. Бородулина, В.И. Полонский // Вестник Красноярского ГАУ. – 2010. – № 5. – С. 50–55.

## INFLUENCE OF OIL POLLUTION ON ACTIVITY OF SOIL ENZYMES OF OXIDOREDUCTASE AND HYDROLASE CLASSES

*Sergatenko S.N., Fedorova I.L., Ignatova T.D.*

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University*

*432017, Ulyanovsk, NovyiVenetsboulevard, 1,*

*E-mail: tatyaignatova@yandex.ru*

**Key words:** oil, oil pollution, soil enzymatic activity, biohumus, zeolite, diatomite.

Soil enzymatic activity is the most important biochemical parameter of soil fertility and it is determined by chemical composition, species and quantitative diversity of soil microbiota and plants, and the set and degree of activity of soil enzymes. The article shows the dynamics of enzymatic activity of the soil contaminated with oil from Vishenskoyedeposit in Melekesskiy district of Ulyanovsk region before and after spring wheatcultivation, as well as using biohumus, zeolite and diatomite sorbents. To assess the biological state of the soil contaminated with oil products, the activity of the main enzymes of the soil pool of the class of oxidoreductases (polyphenol oxidase), peroxidase, catalase) and the class of hydrolases (phosphatase, invertase) was determined. As a result of the studies, it was found that oil pollution reduces activity of oxidoreductase and part of hydrolytic enzymes. The inhibitiondegree correlates with oilconcentration in the soil. A direct dependence of inhibitiondegree of polyphenol oxidase, catalase, phosphatase and invertase on oil concentration was found. It was found that introduction of diatomite increased the activity of peroxidase and invertase, zeolite and biohumus - phosphatase. To assess the state of soil fertility, humus accumulation coefficient (humification coefficient) is used, which is defined as the ratio of polyphenol oxidase activity to peroxidase activity. This coefficient allowsto assess the tendencies of humus formation processes: humification or mineralization. It was determined that the introduction of low doses of oil (2-3%) increases humification coefficient, and high concentrations (8%) reduce it. To diagnose the state of oil-contaminated soils, it is recommended to determine the activity of basic enzymes: polyphenol oxidase, peroxidase, catalase, phosphatase, and invertase.

**Bibliography:**

1. Lapa, V.V. Oxidase activity in highly cultivated soddy-podzolic light loamy soil at different levels of mineral nutrition of agricultural crops / V.V. Lapa, N.A. Mikhailovskaya, S.A. Kasyanchik, T.V. Pogirnikskaya // *Soil science and agrochemistry*. - 2016. - № 2. - P.124–134.
2. Khaziev, F.Kh. Methods of soil enzymology / F.Kh. Khaziev // *Institute of Biology Ufa SC RAS*. - M.: Nauka. - 2005. - 252 p.
3. Suleimanov, R.R. Influence of oil pollution on dynamics of biochemical processes of typical black soil (Orenburg region) / R.R. Suleimanov, T.S. Shorin // *Izvestiya of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. - V.14. - № 1. - 2012. - P.240–243.
4. Kolesnikov, S.I. Change of enzymatic activity of typical black soil when contaminated with oil and oil products in model experiments / S.I. Kolesnikov, M.L. Tatasyan, D.K. Aznauryan // *Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2007. - № 5. - P. 32–34.
5. Influence of melafen and microelements on soil enzymatic activity of sugar beetrootagrophytocenosis case of herbicide stress / V.I. Kostin, V.A. Isaychev, V.A. Oshkin, I.L. Fedorova, T.D. Ignatova // *Sugar beetroot*. - 2018. - № 8. - P. 29–33.
6. Kostin, V.I. Ecological assessment of soil enzymatic activity of sugar beetrootagrophytocenosis case of combined usage of herbicides and melafen / V.I. Kostin, V.A. Oshkin, I.L. Fedorova // *In the collection: Modern problems of evolution and ecology. XXX Lyubishchev readings*. - 2016. - P. 372–375.
7. Influence of low levels of soil oil pollution on activity of oxidoreductases / V.I. Polonskiy, I.Yu. Bortsova, D.E. Polonskaya, T.S. Borodulina // *Vestnik of Krasnoyarsk State Agrarian University*. - 2011. - № 6. - P.90–94.
8. Suleimanov, R.R. Influence of oil pollution on dynamics of biochemical processes of typical black soil (Orenburg region) / R.R. Suleimanov, T.S. Shorin // *Izvestiya of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. - V.14. - № 1. - 2012. - P.240–243.
9. Dyrin, V.A. Activity of peroxidase and polyphenol oxidase in peat of virgin and cultivated areas of lowland swamp ecosystem / V.A. Dyrin // *Vestnik of Tomsk State Pedagogical University*. - 2015. - № 2 (155). - P. 164–170.
10. Methods of biodiagnostics of terrestrial ecosystems / K.Sh. Kazeev, S.I. Kolesnikov, Yu.V. Akimenko, E.V. Dadenko. - Rostov-on-Don: SFU Publishing House, - 2016. - 356 p.
11. 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.
12. Rudenko E.Yu. Biological reclamation of oil-contaminated soil with waste diatomaceous earth / E.Yu. Rudenko, V.V. Bakharev // *Ecological systems and devices*. - 2013. - № 5. - P. 22–27.
13. Rusanov, A.M. Dynamics of biochemical processes in soils in case of oil pollution / A.M. Rusanov, T.S. Shorina // *Vestnik of OSU*. - 2009. - № 10. - P. 600–603.
14. Borodulina, T.S. Influence of soil oil pollution on physiological characteristics of wheat plants / T.S. Borodulina, V.I. Polonskiy // *Vestnik of Krasnoyarsk State Agrarian University*. - 2010. - № 5. - P. 50–55.