

УДК 631.878:631.465:631.421.2

ДЕЙСТВИЕ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ В МОДЕЛЬНОМ ОПЫТЕ*

© 2017 г. М. А. Пукальчик¹, М. И. Панова¹, В. А. Терехова^{1,2},
О. С. Якименко¹, Е. В. Федосеева³

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова
119992 Москва, Ленинские горы, 1–12, Россия

² Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
119071 Москва, Ленинский просп., 33, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова
117997 Москва, ул. Островитянова, 1, Россия

E-mail: pukalchik@soil.msu.ru

Поступила в редакцию 08.03.2017 г.

Проведена экспериментальная оценка влияния коммерческих гуминовых препаратов различного происхождения (из торфа, угля, лигносульфоната) и гуминовой кислоты (Sigma-Aldrich) на активность фосфатазы, уреазы и дегидрогеназы автохонного сообщества дерново-подзолистых окультуренных почв, интродуцированных в модельный грунт, в условиях, когда внесенные препараты выступили единственным источником углерода. Установлено, что активность микроорганизмов, содержащих и вырабатывающих уреазу, зависела преимущественно от присутствия азотсодержащих соединений, внесенных с препаратами. Микроорганизмы, отвечающие за синтез дегидрогеназы в почве, использовали гуминовые продукты и гуминовую кислоту с одинаковой скоростью, что могло свидетельствовать о сходном механизме потребления этих субстратов, а гуминовые препараты из торфа и угля стимулировали активность фосфатазы по сравнению с гуматом из лигносульфоната и гуминовой кислотой, что свидетельствовало о существенных различиях в их биологической активности, возможно обусловленной различиями в углеродном скелете и соотношении фульво- и гуминовых кислот.

Ключевые слова: гуминовые препараты, активность почвенных ферментов, модельный опыт.

DOI: 10.7868/S0002188117080105

ВВЕДЕНИЕ

Гуминовые кислоты (ГК), входящие в органическое вещество почв, играют значительную роль в процессах почвообразования, поддержания и функционирования почвенной биоты, растительности, регулировании биотических процессов в почвах [1]. Известно, что ГК могут не только использоваться микроорганизмами в качестве единственного источника углерода и азота, но и являться биологически активными веществами по отношению к живым организмам в почвах. Среди множества теорий биологической активности выделяют следующие возможные механизмы и пути воздействия ГК на живые организмы: активация процессов окислительно-фотосинтетического фосфорилирования и синтеза белков в клетках [2, 3], влияние на скорость электрон-

но-донорно-акцепторных реакций, неспецифическое взаимодействие с мембранами клеток с последующим влиянием на биохимические процессы [4, 5], проникновение ГК внутрь клеток и взаимодействие с внутриклеточными структурами [6–11] и др. Под действием различных антропогенных факторов, таких как интенсивное земледелие и загрязнение почвенного покрова, происходят изменения в структурно-функциональной организации почвенной биоты, следовательно, трансформируется органическое вещество почв, происходит его деградация и снижается скорость образования и накопления гумуса в почвах.

Коммерческие гуминовые препараты (ГП), произведенные из различного природного сырья, содержат значительное количество гуминовых и фульвокислот, а также соединений азота и фосфора и рассматриваются как средство для восполнения органического углерода и других питательных элементов в почвах, интенсификации биологических процессов, а также в качестве ремедиантов. Положительный эффект от их применения чаще всего отмечают на растениях по показа-

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках проекта № 16-34-60011 мол_а_дк и проекта РНФ № 14-50-00029 (50%/50%).

телям всхожести семян [9, 11–14], роста и развития побегов [14, 15], протекторного действия в условиях стресса [17–21]. Однако вопросы биологической активности ГП, полученных из различных сырьевых источников, на микроорганизмы почв и их функциональную активность исследованы значительно слабее [22, 23].

Среди множества микробиологических и биохимических методов исследования активности почвенных микроорганизмов выбор ферментативной активности как интегрального показателя для оценки влияния ГП основывался на том, что: 1 – активность ферментов тесно связана с органическим веществом и микробной активностью почв, 2 – они имеют свойство реагировать на изменение условий среды быстрее, чем многие другие почвенные показатели, 3 – методы определения относительно просты и отличаются высокой точностью [23, 24].

В настоящей работе изучали влияние гуминовых препаратов из торфа, угля и лигносульфоната, а также гуминовой кислоты на функционирование интродуцированных почвенных микроорганизмов по показателям ферментативной активности в смоделированных условиях, когда препараты выступали единственным источником углерода. Изучение их биологической активности при условии стандартизации физико-химических свойств почвенных субстратов позволяет значительно уменьшить количество действующих факторов, исключить влияние природного гумуса почв и вариабельности гранулометрического состава на результаты [25]. Кроме того, известно, что стерильные грунты активно колонизируются внесенной биотой и способны длительно

время поддерживать ее функционирование, вследствие чего внесение автохонного сообщества, экстрагированного из почв, в модельный грунт представляется разумной стратегией для исключения влияния неоднородности состава микробного комплекса [26–28]. Цель работы – изучение влияния гуминовых препаратов на активность почвенных ферментов в модельном опыте.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили гуминовые препараты, произведенные из различного сырья (торф, бурый уголь и лигносульфонат). Краткая характеристика препаратов приведена в таблице. В ряде предыдущих исследований было показано, что эти препараты обладают биологической активностью по отношению к живым организмам различного уровня организации и таксономической принадлежности [29–32], однако их влияние на ферментативный комплекс подробно не изучали. В контрольный образец модельного почвенного грунта в качестве единственного источника углерода вносили коммерческий препарат гуминовой кислоты (х.ч., CAS#1415-93-6, Sigma-Aldrich, UK), свойства и химические характеристики которой широко обсуждены в литературе [33].

Модельный грунт. Для изучения особенностей функционирования нативного микробного комплекса почв на гуминовых препаратах использовали модельный грунт (МГ), подготовленный по протоколу OECD [34] в модификации для проведения микробиологических исследований [26, 35] в следующих пропорциях: 10 г каолинита, 5 г

Характеристика гуминовых препаратов и гуминовой кислоты

Название препарата	Внесенный препарат	С	N	P	Н	К, мг/г	Зольность, %	рН
		%						
Pe-FlexK*	Гумат калия из торфа	42.3	1.06	3.6	4.34	103	25.8	7.75
BC-HumNa	Гумат натрия из бурого угля	41.8	0.39	0.0	3.80	1.5	38.8	8.51
OW-LhK	Гумат калия из лигносульфоната	33.5	0.25	0.0	3.64	125	40.0	8.96
HA**	Гуминовая кислота	84.0	3.6	0.0	н/о	2.3	Не измеряли	

*Данные представлены на сухое вещество.

**Данные по содержанию углерода, азота, калия и фосфора приведены по [33].

бентонита, 35 г кварцевого песка, 0.1 г CaCO_3 , 1 г $\text{C}_{\text{орг}}$. Реакция почвенной среды получившегося МГ (рН) была равна 5.5 ед. Концентрация $\text{C}_{\text{орг}}$ в МГ соответствовала уровню его содержания в дерново-подзолистых окультуренных почвах, из которых выделяли автохонное сообщество для эксперимента (2%). Таким образом, к 50 г минеральной основы вносили эквивалентные по доле углерода концентрации препаратов: 1.19 г гуминовой кислоты (НА), или 2.98 г препарата из лигносульфоната (OW-LhK), или 2.39 г препарата из бурого угля (BC-HumNa), или 2.36 г препарата из торфа (Pe-FlexK). Все препараты, кроме Pe-FlexK, вносили в сухом виде, Pe-FlexK — в жидком. Полученные образцы МГ запечатывали в пластиковые пакеты для автоклавирования и стерилизовали при 121°C, 1.1 атм., 20 мин (двукратно), хранили в герметично запаянных пакетах до момента внесения суспензии автохонного сообщества.

Выделение автохонного сообщества. Выделение автохонного сообщества производили из дерново-подзолистых среднесуглинистых окультуренных почв (горизонт А, слой 0–15 см), отобранных на территории учебного центра «Чашниково» Московской обл. Навеску почв помещали в коническую колбу, заливали стерильной дистиллированной водой, всыпали гравий в соотношении 1 ч почвы : 1 ч мелкого гравия : 1 ч воды и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 2 ч (180 об./мин). Полученную суспензию центрифугировали (6000 об./мин, 12 мин), надосадочная жидкость представляла собой бактериальную и грибную суспензию. Суспензию готовили непосредственно перед внесением в МГ из свежесобранной почвы.

В навеску МГ (200 г) вносили по 12 мл суспензии с автохонным сообществом, оптимальный уровень влажности (60% ПВ) достигали путем внесения на первом этапе 0.01 М CaCl_2 в целях воссоздания ионной силы почвенного раствора, далее оптимальную влажность поддерживали периодическим поливом дистиллированной водой. Контроль влажности опытных емкостей осуществляли весовым методом, потеря веса за счет испарения воды в каждом сосуде не должна была превышать 5%. Повторность в опыте — трехкратная.

Полученные смеси инкубировали при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 28 сут. На 7-, 14-, 21- и 28-е сут с момента начала эксперимента серию образцов отбирали для оценки ферментативной активности. Отобранные пробы хранили в герметичных п/э пакетах в холодильнике при 4°C. Длительность хранения проб не превышала 5-ти сут с момента отбора образцов на испытания.

Методы определения ферментативной активности. Определение дегидрогеназы проводили по методике [36] в модификации. В навеску почв 1 г вносили 0.1 г CaCO_3 и 1%-ный раствор глюкозы до 90%-ного насыщения от общей влагоемкости почвы, инкубировали 24 ч при 30°C в термостате. Затем в колбу вносили 3 мл раствора 1%-ного трифенилтетразолия хлористого и 1%-ной глюкозы, повторно инкубировали 3 ч при 30°C. Образовавшийся трифенилформазан (ТФФ), являющийся продуктом разложения трифенилтетразолия хлористого, экстрагировали 25 мл этанола, после центрифугирования и в супернатане определяли оптическую плотность при длине волны 456 нм. Показания прибора пересчитывали по калибровочной кривой в мкг ТФФ/г/24ч.

Активность кислотных фосфомоноэстераз (фосфатазы) определяли по методу [37]. 1 г почвы помещали в пробирки, вливали 4 мл универсального буферного раствора MUB (рН 6.5) и 1 мл 5 mM раствора *пара*-нитрофенил фосфата натрия. Пробирки закрывали и инкубировали в термостате 2 ч при 37°C. Образовавшийся в ходе реакции *пара*-нитрофенол (*пНФ*) экстрагировали 1 мл 0.5 М CaCl_2 и 4 мл 0.5 М NaOH. Оптическую плотность получившихся окрашенных растворов определяли после фильтрования проб через фильтр «белая лента» при длине волны 405 нм. Показания прибора пересчитывали по калибровочной кривой в мкг *пНФ*/г/ч.

Определение активности уреазы проводили по методу [38]. К навеске почвы 1 г приливали 2 мл калий-фосфатного буферного раствора (рН 6.7), 0.1 мл толуола и 2 мл 10%-ного раствора мочевины. Длительность инкубации — 48 ч при 37°C, после чего в пробирки вносили по 4 мл 1М KCl и 30 мин перемешивали на орбитальном шейкере (180 об./мин). После фильтрования через фильтр «белая лента» 1 мл аликвоты переносили в мерные колбы на 25 мл, в которые вносили дистиллированную воду, 4 мл 1 М NaOH, 1 мл 50%-ного водного раствора сегнетовой соли, 0.4 мл реактива Несслера и доводили объем до метки. Оптическую плотность измеряли на светофилт্রে с длиной волны 460 нм. Результаты пересчитывали в мкг NH_3 /г/24 ч по калибровочной кривой.

Получившиеся величины оптической плотности корректировали с учетом холостых опытов для МГ после стерилизации (150°C, 3 ч) и с учетом влажности образцов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 10. Достоверность различий наблюдаемых откликов оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа

и попарного сравнения средних с использованием критерия Тьюки (Tukey HSD test) для каждого показателя. Проверку гипотезы о влиянии концентрации азота и фосфора, внесенных с ГП в МГ, на активность почвенных ферментов проводили с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. При выполнении кластерного анализа использовали пакет XLSTAT-Ecology. Применяли иерархический агломеративный алгоритм, в качестве меры расстояния (сходства) — евклидово расстояние по стандартизованным данным. Классификацию проводили методом Уорда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что существование и развитие микробного комплекса почв сопряжено с целым рядом биохимических процессов, таких как синтез и разложение органического вещества, мобилизация элементов минерального питания растений, специфичность катализа химических реакций. Результаты исследования показали, что ГП различного происхождения оказывали достоверное влияние на динамику ферментативной активности почвенной биоты из дерново-подзолистой почвы в МГ уже через 7 сут экспозиции. Динамика активности уреазы исследованных образцов представлена на рис. 1а.

Общий уровень уреазной активности в контрольных пробах с ГК характеризовался низкими величинами и изменялся в диапазоне от 11.5 ± 5.3 до 56.8 ± 33.3 мкг $\text{NH}_3/\text{г}/24$ ч. В пробах с ГП активность этого фермента была значительно больше: максимальный прирост относительно контроля ГК зафиксирован для гуминового препарата из торфа Pe-FlexK (4400%); изменение активности уреазы в МГ с препаратами из лигносульфоната OW-LhK и бурого угля BC-HumNa было одинаковым и значительно больше контроля, но достоверно меньше, чем для ГП из торфа Pe-FlexK. Известно, что препараты из торфа, как правило, содержат больше азота, чем ГП из угля [16, 19, 29], и для исследованных ГП это подтверждено: активность уреазы достоверно ($r = 0.843$, $p < 0.05$) зависела от дозы внесенного с ГП азота.

Изменение активности кислотной фосфатазы исследованных образцов представлено на рис. 1б. Обнаружены различия в активности между контрольными пробами с ГК и образцами с ГП. Диапазон активности фосфатазы во всех исследованных пробах характеризовался низким уровнем от 12.0 ± 3.4 до 48.1 ± 3.3 мкг $\text{nHФ}/\text{г}/\text{ч}$, тогда как в естественных почвах нормальная активность фосфатазы характеризуется диапазоном 100–700 мкг

$\text{nHФ}/\text{г}/\text{ч}$ [40]. Для проб, отобранных на 7-е сут экспозиции, активность в контроле была на 32% больше, чем в пробах ГП из бурого угля BC-HumNa, и не отличалась от активности препарата из торфа Pe-FlexK; только препарат из лигносульфоната ха-

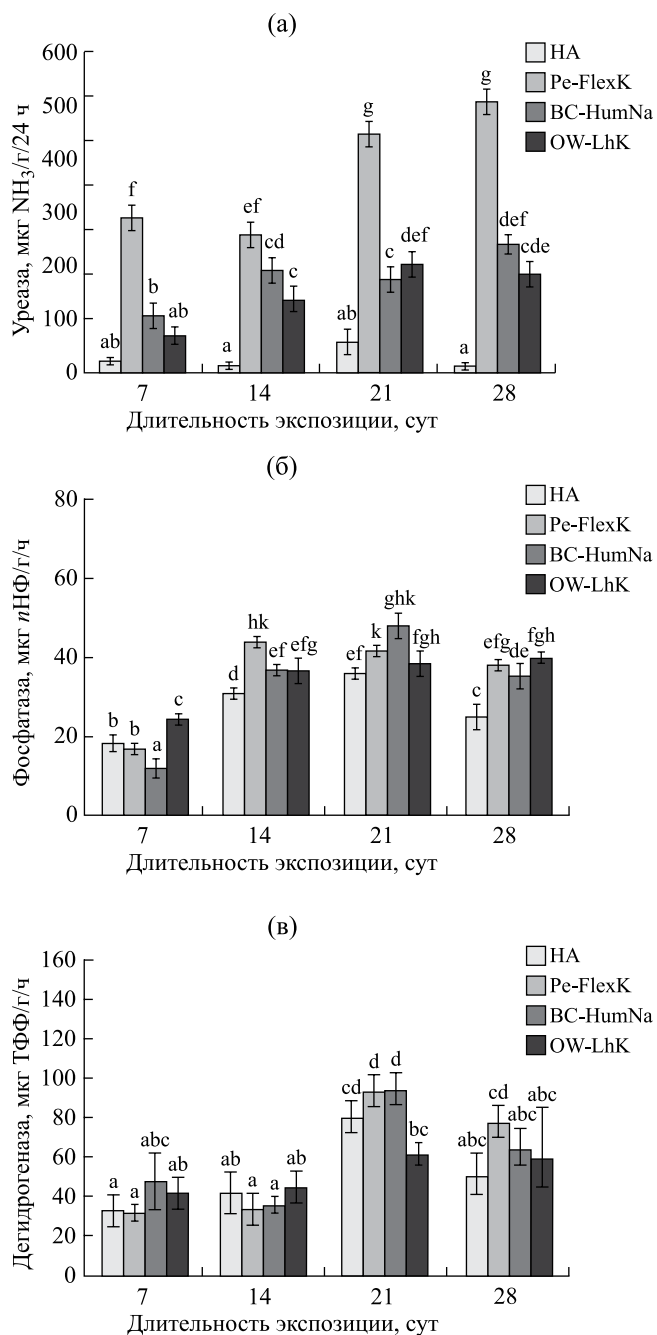


Рис 1. Влияние гуминовых препаратов и гуминовой кислоты на активность: (а) – уреазы, (б) – фосфатазы, (в) – дегидрогеназы. На диаграммах представлены средние показатели ($n = 9$), планка погрешностей отражает стандартные отклонения от среднего. Величины, обозначенные различными буквами, различаются достоверно по критерию Тьюки. НА – коммерческая гуминовая кислота, OW-LhK – гуминовый препарат из лигносульфоната, BC-HumNa – гуминовый препарат из угля, Pe-FlexK – гуминовый препарат из торфа.

рактиковался стимулирующим откликом на фосфатазы (прирост активности на 52% относительно контроля). Начиная с 14-х сут экспозиции, активность фосфатазы в пробах с ГП из угля и торфа была достоверна больше, чем в пробах с ГК.

Известно, что фосфатаза играет ведущую роль в расщеплении ортофосфорных моноэфиров органического вещества почв до спиртов и неорганических соединений фосфора [41], вследствие чего уровень ее активности связывают с содержанием в почве фосфора и иногда азота [42, 43]. Наши исследования показали, что активность фосфатазы в МГ с ГП зависела не от содержания N и P (коэффициенты корреляции $r = 0.18$ и 0.15 соответственно), а от иных действующих факторов, среди которых можно назвать малую растворимость ГК в нейтральных средах (МГ характеризовался $pH_{H_2O} 5.5$), а также наличие диссоциированных солей и фульвокислот (ФК) в ГП, отсутствующих в ГК, поскольку, по данным [44], доступность углерода для микроорганизмов также может влиять на активность фосфатаз. Таким образом, можно говорить о предпочтительном использовании почвенной биотой, отвечающей за синтез фосфатазы, молекул ГК и ФК из ГП, чем молекул ГК.

Действие ГП и ГК на активность дегидрогеназы было идентичным, показатель активности не зависел от дозы внесенного с гуминовыми веществами N и P (коэффициент корреляции $r = 0.102$ и 0.094 соответственно) (рис. 1в). Аналогичный эффект от внесения веществ с повышенным содержанием гуминовых веществ (из компоста) при контроле ГК был отмечен в работе [45]. Согласно литературным данным, роль дегидрогеназ в почвах сводится к катализу окислительно-восстановительных реакций путем дегидрирования неспецифических органических соединений (углеводов, органических кислот, аминокислот,

спиртов, жиров, фенолов и т. п.) и специфических гумусовых веществ. Таким образом, они связаны с общим метаболическим состоянием почвенной биоты [46]. В качестве одной из возможных причин низкой чувствительности дегидрогеназы к внесенным препаратам могло быть наличие фенольных групп в их составе, которые, согласно данным ряда исследователей, могут выступать в роли ингибиторов активности фермента [47].

Результаты кластерного анализа массива полученных данных для всех временных интервалов по влиянию внесенных ГП и ГК на активность ферментов и содержание N и P показаны в виде дендрограммы (рис. 2), наглядно иллюстрирующей последовательность объединения внесенных препаратов в 3 группы.

Первую и вторую группу составили пробы, в которых в качестве единственного источника углерода была внесена гуминовая кислота, а также препараты из бурого угля (BC-HumNa) и лигносульфоната (OW-LhK). Центроидами этих групп являются пробы OW-LhK, отобранные на 14-е сут, и с гуминовой кислотой (HA) — на 21-е сут соответственно. Активность уреазы, дегидрогеназы и фосфатазы в группах характеризовалась меньшими показателями, чем активности этих ферментов в группе 3, в которой были пробы с препаратом из торфа Pe-FlexK.

Полученные результаты могут быть объяснены как с позиции «ядерной теории» строения ГК с различной доступностью ароматических, алифатических структур, а также периферических частей молекул ГК и ФК из препаратов для микроорганизмов, так и с позиции «супрамолекулярной теории», согласно которой ГК представляют собой совокупность молекул с относительно небольшой молекулярной массой, объединенных в некую мицеллоподобную структуру [48, 49]. Таким образом, можно предположить, что под влиянием живых организмов и выделяемых ими органических веществ некоторые водородные и гидрофобные связи разрывались, что приводило к высвобождению различных для ГП, полученных из разных источников веществ, обладающих различной биологической доступностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение ферментативной активности почвенного автохонного сообщества из дерново-подзолистых окультуренных почв, интродуцированного в стандартизированный модельный грунт, с гуминовыми препаратами в качестве единственного источника

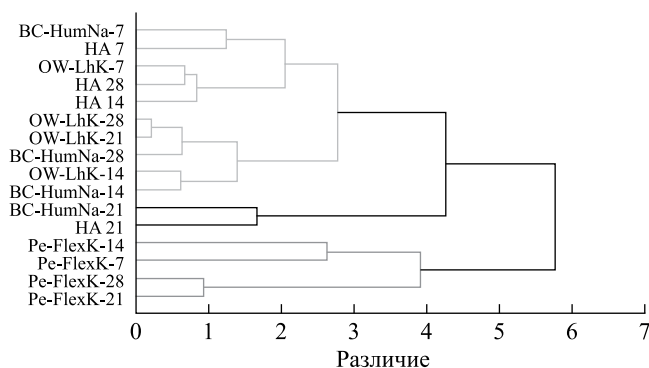


Рис. 2. Дендрограмма кластеризации проб с гуминовыми препаратами и гуминовой кислотой для каждой временной точки отбора.

углерода позволило выявить и сравнить биологическое действие 3-х гуминовых препаратов (ГП) из торфа, угля и лигносульфоната с действием чистой гуминовой кислоты (ГК).

Результаты показали, что активность уреазы, фосфатазы и дегидрогеназы была больше в случае внесения ГП, чем ГК. Микроорганизмы, от-

вечающие за синтез дегидрогеназы, использовали ГП и ГК с одинаковой скоростью, что могло свидетельствовать о сходном механизме потребления этих субстратов. Выявлена тенденция к увеличению активности фосфатазы в пробах с ГП из торфа и угля по сравнению с пробами с ГК и ГП из лигносульфоната.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чуков С. Н. Формирование и роль гуминовых веществ в биосфере // Теор. и прикл. экол. 2015. № 4. С. 461–464.
2. Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. Physiological effects of humic substances on higher plants // Soil Biol. Biochem. 2002. V. 34. P. 1527–1536.
3. Trevisan S., Francioso O., Quaggiotti S., Nardi S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. № 6. P. 635–643. DOI:10.4161/psb.5.6.1121.
4. Бирюков М. В. Биологическое действие гуминовых кислот и его пространственная локализация в почве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2006. 24 с.
5. Vaccaro S., Ertani A., Nebbioso A., Muscolo A., Quaggiotti S., Piccolo A., Nardi S. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level // Abstr. Chem. Biol. Technol. Agricult. 2015. V. 2. № 5. P. 1–12. DOI: 10.1186/s40538-015-0033-5.
6. Чуков С. Н. Структурно-функциональные параметры органического вещества почв в условиях антропогенного воздействия. СПб: Изд-во СПбГУ, 2001. 216 с.
7. Попов А. И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. 248 с.
8. Zandonadi D. B., Canellas L. P., Façanha A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation // Planta. 2007. V. 225. P. 1583–1595. DOI:10.1007/s00425-006-0454-2
9. Куликова Н. А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М.: МГУ, 2008. 48 с.
10. Schiavon M., Pizzeghello D., Muscolo A., Vaccaro S., Francioso O., Nardi S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.) // J. Chem. Ecol. 2010. V. 36. P. 662–669. DOI:10.1007/s10886-010-9790-6
11. Воронина Л. П., Якименко О. С., Терехова В. А. Оценка биологической активности промышленных гуминовых препаратов // Агрохимия. 2012. № 6. С. 50–57.
12. Piccolo A., Celano G., Pietramellara G. Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicon esculentum*) // Biol. Fertil. Soils. 1993. V. 16. P. 11–15. DOI:10.1007/BF00336508
13. Iakimenko O. S. Commercial humates from coal and their influence on soil properties and initial plant development // Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice / Eds. Perminova I. V., Hatfield K., Hertkorn N. Springer, 2005. V. 52. P. 365–378. DOI:10.1007/1-4020-3252-8_19.
14. Аброськин Д. П., Фуентес М., Гарсиа-Мина Х. М., Кляйн О. И., Сеник С. В., Волков Д. С., Перминова И. В., Куликова Н. А. Влияние гуминовых кислот и их комплексов с железом на функциональное состояние растений, выращенных в условиях дефицита железа // Почвоведение. 2016. № 10. С. 1–10.
15. Bettoni M., Mogor A., Pauletti V., Goicoechea N., Aranjuelo I., Garmendia I. Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances // J. Food Composit. Anal. 2016. V. 51. P. 37–44. DOI:10.1016/j.jfca.2016.06.008.
16. Якименко О. С., Терехова В. А. Гуминовые препараты и оценка их биологической активности для целей сертификации // Почвоведение. 2011. № 11. С. 1334–1343.
17. Стом Д. И., Коновалов А. С., Богданов А. В. Возможность детоксикации модельных субстратов, загрязненных солями мышьяка, с помощью гуминовых препаратов // Вестн. ИРГЦХА. 2012. Т. 50. С. 81–86.
18. Kulikowska D., Gusiati Z. M., Bulkowska K., Klik B. Feasibility of using humic substances from compost to remove heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) from contaminated soil aged for different periods of time // J. Hazard. Mater. 2015. V. 300. P. 882–891. DOI:10.1016/j.jhazmat.2015.08.022.
19. Pukalchik M. A., Terekhova V. A., Yakimenko O. S., Kydrallieva K. A., Akulova M. I. Triad method for assessing the remediation effect of humic preparations on urban soils // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 654–663. DOI:10.1134/S1064229315060083.
20. Изосимов А. А. Физико-химические свойства, биологическая активность и детоксицирующая способность гуминовых препаратов, отличающихся генезисом органического сырья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2016. 26 с.

21. Постникова М.А. Использование гуминовых кислот почвенными бактериями: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2007. 25 с.
22. Тихонов В.В., Якушев А.В., Завгородняя Ю.А., Бызов Б.А., Демин В.В. Действие гуминовых кислот на рост бактерий // Почвоведение. 2010. № 3. С. 333–341.
23. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
24. Soil microbiology, ecology and biochemistry (4th ed.) / Eds. Paul A. 2015. 582 p.
25. Hill K.E., Top E.M. Gene transfer in soil systems using microcosms // FEMS Microbiol. Ecol. 1998. V. 25. P. 319–329. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00483.x.
26. Ellis R.J. Artificial soil microcosms: a tool for studying microbial autecology under controlled conditions // J. Microbiol. Method. 2004. V. 2. P. 287–290. DOI:10.1016/j.mimet.2003.10.005.
27. Vogel C., Babin D., Pronk G.J., Heister K., Smalla K., Kögel-Knabner I. Establishment of macro-aggregates and organic matter turnover by microbial communities in long-term incubated artificial soils // Soil Biol. Biochem. 2014. V. 79. P. 57–67. DOI:10.1016/j.soilbio.2014.07.012.
28. Оленева О.С., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Биотестирование почв на содержание доступного органического вещества с помощью микробных популяций // Почвоведение. 1995. № 4. С. 461–464.
29. Федосеева Е.В., Терехова В.А., Якименко О.С., Гладкова М.М. Экоотоксикологическая оценка гуминовых препаратов разного происхождения с применением микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* // Теор. и прикл. экол. 2009. № 4. С. 45–49.
30. Горленко М.В., Якименко О.С., Голиченков М.В., Костина Н.В. Функциональное биоразнообразие почвенных микробных сообществ при внесении органических субстратов различной природы // Вестн. МГУ. Сер. 17: Почвоведение. 2012. № 2. С. 20–27.
31. Кыдралиева К.А., Жоробекова Ш.Ж., Топильская О.М., Акулова М.И., Терехова В.А. Экспериментальная характеристика ремедиационных свойств гуминовых препаратов разного генезиса по фону загрязнения почв медью // Теор. и прикл. экол. 2015. № 2. С. 74–79.
32. Терехова В.А., Иванова А.Е., Акулова М.И., Пукальчик М.А., Федосеева Е.В., Якименко О.С., Шитиков В.К. Динамика структуры сообществ микроскопических грибов в почвах при химическом загрязнении и внесении гуминовых веществ // Агрохимия. 2016. № 4. С. 85–91.
33. Perumplavil R. Surface analysis of a black coating from little lost river. Master's Theses and Doctoral Dissertations, 2006. 64 p.
34. OECD. Guideline for testing of chemicals. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*). 2004. No. 222.
35. Guenet B., Leloup J., Hartmann C., Barot S., Abbadie L. A new protocol for an artificial soil to analyse soil microbiological processes // Appl. Soil Ecol. 2011. V. 2. P. 243–246. DOI:10.1016/j.apsoil.2011.04.002.
36. Lenhard G. The dehydrogenase activity for the study of soils and river deposits // Soil Sci. 1966. V. 101. P. 400–402.
37. Tabatabai M.A., Bremner J.M. Use of p-nitrophenyl-phosphate for assay of soil phosphatase activity // Soil Biol. Biochem. 1969. V. 1. P. 301–307.
38. Kong L., Wang Y.-B., Zhao L.-N., Chen Z.-H. Enzyme and root activities in surface-flow constructed wetlands // Chemosphere. 2009. V. 76. P. 601–608. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.04.056.
39. Якименко О.С., Изосимов А.А. Сравнительная химическая характеристика гуминовых кислот из промышленных гуматов различного генезиса // Тр. V Всерос. конф. «Гуминовые вещества в биосфере». СПб.: Изд-во СПбГУ, 2010. Ч. 1. С. 474–479.
40. Tabatabai M., Fung M. Extraction of enzymes from soil // Soil Biochemistry / Eds. Stotzky G., Bollag J.-M. 1992. V. 7. N.Y.: Dekker. P. 197–227.
41. Галстян А.Ш. Унификация методов исследования активности ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2. С. 107–114.
42. Juma N.G., Tabatabai M.A. Distribution of phosphomonoesterases in soils // Soil Sci. 1978. V. 126. P. 101–108.
43. Olander P.L., Vitousek P.M. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability // Biogeochemistry. 2000. V. 49. P. 175–190. DOI: 10.1023/A:1006316117817.
44. Spohn M., Kuzyakov Y. Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon // Soil Biol. Biochem. 2013. V. 61. P. 69–75.
45. Benitez E., Nogales R., Elvira C., Masciandaro G., Ceccanti B. Enzymes activities as indicators of the stabilization of sewage sludges composting by *Eisenia foetida* // Bioresource Technol. 1999. V. 67. P. 1829–1835.
46. Garcia C., Hernandez T., Costa F. Potencial use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils // Commun. Soil Sci. Plant Anal. 2012. V. 28. P. 123–134.
47. Pflug W., Ziechmann W. Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids // Soil Biol. Biochem. 1981. V. 4. P. 293–299. DOI:10.1016/0038-0717(81)90065-1.
48. Piccolo A. New insights on the conformational structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography // The Role of humic substances in the ecosystems and in environmental processes / Eds. Drozd J., Gonet S.S., Senesi N., Weber J. Wroclaw, Poland: IHSS Polish Society of Humic Substances, 1997. P. 19–35.
49. Семенов В.М., Козыт Б.М. Почвенное органическое вещество. М.: ГЕОС, 2015. 233 с.

Effect of Humic Preparations on the Activity of Soil Enzymes in Model Experiment

M.A. Pukal'chik¹, M.I. Panova¹, V.A. Terekhova^{1, 2}, O.S. Yakimenko¹, E.V. Fedoseeva³

¹M. V. Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory 1–12, Moscow 119992, Russia

²A. N. Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution RAS
Leninsky prosp. 33, Moscow 119071, Russia

³N. I. Pirogov Russian National Research Medical University
ul. Ostrovityanova 1, Moscow 117997, Russia

E-mail: pukalchik@soil.msu.ru

Experimental evaluation of commercial humic preparations of different origin (peat, coal, lignosulfonate) and humic acid (SigmaAldrich) effect on the activity of phosphatase, urease and dehydrogenase of indigenous community of cultivated sod-podzolic soils was carried out. These soils were introduced into the model subsoil as a sole carbon source. It was established that activity of urease-producing microorganisms depended mainly on the presence of nitrogen-containing compounds applied with the preparations. The microorganisms responsible for the synthesis of dehydrogenase in soil used humus products and humic acid with the same rate that can indicate a similar mechanism of these substrates consumption. Humic preparations from peat and coal stimulated the activity of phosphatase compared to humate from lignosulfonate and from humic acid, indicating substantial differences in their biological activity, possibly due to the difference in the carbon skeleton and the ratio of fulvic and humic acids.

Key words: humic preparations, activity of soil enzymes, model experiment.