

УДК 631.95:631.4

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ В БИОДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ПОЧВ

Е. В. Даденко, Т. В. Денисова, К. Ш. Казеев, С. И. Колесников

*Южный федеральный университет
Россия, 344006, Ростов-на-Дону, Б. Садовая, 105/42
E-mail: dadenko@mail.ru*

Поступила в редакцию 08.05.13 г.

Оценка применимости показателей ферментативной активности в биодиагностике и мониторинге почв. – Даденко Е. В., Денисова Т. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И. – Проведена сравнительная оценка показателей ферментативной активности и содержания гумуса с учетом чувствительности, точности показателя и сложности анализа. Показатели ферментативной активности в разной степени пригодны для диагностики деградационных процессов различного происхождения. Для оценки последствий влияния сельскохозяйственного использования на биологическую активность почв наиболее информативными являются активность дегидрогеназы и инвертазы. В целях диагностики последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами, тяжелыми металлами, ионизирующими излучениями и гидро-морфизма более пригодны активность каталазы и дегидрогеназы.

Ключевые слова: каталаза, инвертаза, дегидрогеназа, сельскохозяйственное использование, переувлажнение, тяжелые металлы, нефтепродукты, СВЧ и ионизирующее излучение.

Applicability of enzyme activity indices for soil bioindication and monitoring. – Dadenko E.V., Denisova T.V., Kazeev K. Sh., and Kolesnikov S. I. – Soil biological parameters are potentially early, sensitive indicators of soil degradation and contamination. Among these, special emphasis is given to enzyme activity. The activity of soil enzymes can be an additional diagnostic indicator of soil management, pollution and perturbation. Application of enzyme activity as a diagnostic index promotes high sensitivity to external effects, simplicity of evaluation and low errors in an experiment. We have determined most sensitive enzymes depending on their influence on several factors (heavy metals, oil and oil products, radioactive contamination, and agricultural use). Dehydrogenase and invertase are the best indicators to assess the effect of agricultural use on soil biological activity. Catalase and dehydrogenase are more suitable for diagnosis of pollution and waterlogged conditions.

Key words: catalase, invertase, dehydrogenase, agricultural use, water logging, heavy metal, oil products, microwave radiation, ionizing radiation.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних десятилетий идет поиск наиболее информативных диагностических показателей состояния почв. До сих пор нет однозначного мнения среди ученых в выборе наиболее информативных показателей, и связано это, в первую очередь, с их большим количеством, их различием по значимости и функциональной роли.

При выборе показателя необходимо учитывать несколько факторов. Индикаторы должны: коррелировать с естественными процессами, происходящими в эко-

системе; интегрировать физические, химические, биологические свойства и процессы и служить основными индикаторами, необходимыми для оценки свойств и функций почвы, которые трудно непосредственно измерить и оценить; быть относительно удобными и простыми в применении; быть чувствительными к изменениям воздействий; по возможности, быть достаточно изученными. Необходимо учитывать чувствительность показателей, вариабельность получаемых результатов, сложность метода и длительность анализа, универсальность применения для различных почв и различных условий проведения анализа, селективность для различных загрязнителей и типов деградации почв (Biological Indicators..., 1997; Деградация..., 2002).

При планировании исследований необходимо правильно оценивать свои силы и средства. Возникает противоречие: с одной стороны, желание определить как можно больший набор показателей, с другой стороны, ограничения, связанные с финансированием, приборным оснащением, доступностью химреактивов, физическими затратами труда и т.п. (Казеев и др., 2003).

Почвенные ферменты играют ведущую роль в биохимических процессах, происходящих в почве, и имеют большое значение среди показателей биологической активности почвы. Многолетними исследованиями показана максимальная эффективность диагностики и мониторинга почвенного покрова биохимическими методами. Применению ферментативной активности (ФА) в качестве диагностического показателя способствует низкая ошибка опытов, простота определения, высокая чувствительность к внешним воздействиям. Доказана ведущая роль показателей ФА при оценке влияния загрязнения различными продуктами техногенеза (нефтью и нефтепродуктами, тяжелыми металлами, пестицидами и др.) на экологическое состояние почв (Галстян, 1974; Хазиев, 1976; Звягинцев, 1978; Даденко, 2004; Казеев и др., 2004, 2008, 2010; Денисова и др., 2005; Колесников и др., 2007, 2008 и др.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведена сравнительная оценка показателей ФА и содержания гумуса в целях дальнейшего совершенствования их применения в диагностике и мониторинге почв. Изучена применимость этих показателей при оценке влияния длительного сельскохозяйственного использования, переувлажнения, загрязнения тяжелыми металлами, нефтью и нефтепродуктами, воздействия СВЧ и ионизирующего излучений на экологическое состояние почв Юга России. Выбранные факторы являются наиболее распространенными антропогенными воздействиями на почву.

Анализ применимости показателей проведен на основании многолетних данных, полученных авторами с 1993 по 2012 гг. Приведенная оценка дает общее представление о биохимических методах биодиагностики с учетом некоторых категорий показателей (чувствительность, точность и сложность анализа).

В качестве объектов исследования были использованы основные зональные и интразональные почвы Юга России. Территория исследования: Ростовская область, Краснодарский край, Ставропольский край, Астраханская область, Волгоградская область, Республика Адыгея, Республика Калмыкия, Карачаево-Черкесская Республика, Республика Северная Осетия, Республика Дагестан. Почвы: чер-

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

нозёмы обыкновенные, чернозёмы выщелоченные, чернозёмы выщелоченные слитые, чернозёмы южные, темно-каштановые почвы, каштановые почвы, светло-каштановые почвы, серые лесные почвы, бурые лесные почвы, дерново-карбонатные почвы (рендзины), горно-луговые (субальпийские) почвы, бурые полупустынные почвы, песчаные почвы степной зоны (серопески), песчаные почвы полупустынной зоны (буропески), песчаные почвы зоны каштановых почв, солонцы, солончаки и другие. Эти почвы занимают основную территорию Юга России и существенно различаются между собой по генезису и свойствам: содержанию гумуса, реакции среды (рН), содержанию карбонатов, гранулометрическому составу, поглощательной способности, биологической активности и другим свойствам, определяющим устойчивость почвы к антропогенному воздействию.

Оценивали активность каталазы и инвертазы как наиболее изученных и чаще всего применяемых в экологических исследованиях представителей своих классов. Кроме того, определяли активность дегидрогеназы, существующей только в живых клетках и зависящей от биомассы и активности микроорганизмов в почве (Microbiological Methods..., 2006). Показатель содержания гумуса выбран как важнейший показатель почвенного плодородия.

Показатели активности каталазы, инвертазы и дегидрогеназы, а также содержания гумуса оценивались по десятибалльной системе. Чем выше балл, тем больше метод пригоден для диагностики и мониторинга почв.

Характеристики изучаемых воздействий представлены в табл. 1. В основу исследования были положены полевые натурные (отбор образцов почв, подвергающихся воздействию в реальных условиях) и модельные (полевые и лабораторные) исследования. Определение показателей осуществлялось в смешанных почвенных образцах. Модельные эксперименты проведены по единой методике. Почва для модельных экспериментов была отобрана из верхних горизонтов (0 – 25 см). Именно в этом слое накапливается основное количество загрязняющих почву веществ. Модельные эксперименты ставили в 3-кратной повторности. Аналитические определения биохимических показателей выполняли в 4 – 6-кратной повторности. Анализ активности ферментов проводился в воздушно-сухих образцах. Предпочтительность такого способа пробоподготовки и консервации образцов была обоснована нами ранее (Даденко, 2004; Даденко и др., 2009).

Таблица 1

Характеристика изучаемых видов антропогенного воздействия

Вид воздействия	Характеристики (дозы)	Условия исследования
1	2	3
Сельскохозяйственное использование	Сравнительная оценка целинных (или залежных) и пахотных почв. Длительность распашки от нескольких лет до более чем 100 лет.	Полевые
Загрязнение нефтью и нефтепродуктами	Органические загрязнители: нефть, бензин, солярка, моторное масло. Действие различных концентраций – 1, 5, 10 и 25% от массы почвы. Различные сроки экспозиции.	Полевые, модельные

Окончание табл. 1

1	2	3
Загрязнение тяжелыми металлами	В качестве загрязняющих веществ были выбраны Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, V, W, Zn в форме различных химических соединений: оксидов, ацетатов, хлоридов, нитратов, сульфатов. Действие разных концентраций в почве: 1, 2, 5, 10, 100 ПДК и другие значения. Различные сроки экспозиции.	Полевые, модельные
СВЧ-излучение	Мощность 800 Вт и 450 Вт. Различные сроки экспозиции (от нескольких секунд до часа).	Модельные
Ионизирующее излучение	Облучение почвы гамма-излучением Дозы воздействия: 1, 5, 10 и 20 КГр. Различные сроки экспозиции. Облучение почвы рентгеновским излучением. Дозы воздействия: 0.04, 2.68 и 4.64 мЗв. Различные сроки экспозиции.	То же
Гидроморфизм	Изучены показатели в гидроморфных почвах Ростовской области. Данные модельных экспериментов по затоплению почв водопроводной водой и растворами солей NaCl, Na ₂ CO ₃ , CaCl ₂ .	Полевые, модельные
Загрязнение пестицидами	Инсектициды (децис, данадим и др.) и гербициды (харнес, агритокс, пивот и др) в концентрациях 0.1 – 10 мг/кг почвы и 50 – 100000 мг/кг почвы. Различные сроки экспозиции.	Модельные

Активность каталазы и дегидрогеназы определяли по А. Ш. Галстяну (1978), инвертазы – по А. Ш. Галстяну с фотокolorиметрическим окончанием по Ф. Х. Хазиеву (1990). Содержание органического вещества – общий гумус определяли по методу И. В. Тюрина в модификации Б. А. Никитина (1972).

Таблица 2
Оценка чувствительности показателей по степени их снижения, % от контроля

Значение показателя	Балл
≤ 60	10
61 – 70	9
71 – 80	8
81 – 85	7
86 – 90	6
91 – 92	5
93 – 94	4
95 – 96	3
97 – 98	2
99	1
≥ 100	0

Чувствительность показателя – это степень снижения его значений, выраженная в % по отношению к контролю. Оценка чувствительности проведена на основании многолетних данных, полученных авторами по разным типам воздействия, для разных почв, доз и сроков экспозиций. Причем для оценки используется не значение показателя для каждой дозы и срока экспозиции, а усредненное значение. Балльная оценка проводилась на основании табл. 2.

Точность оценивалась на основании полученного в ходе статистической обработки данных коэффициента вариации (табл. 3). За основу взята оценка варьирования, по величине коэффициента вариации предложенная В. И. Савичем (1971). Для оценки сложности анализа учитывались количество операций, возможное количество анализов в сутки, необходимые

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

реактивы (стоимость реактивов для проведения 100 анализов), посуда (на 100 образцов) и оборудование, а также необходимая квалификация исследователя. Количество операций и вытекающее отсюда возможное количество анализов в сутки максимально значимы при осуществлении массовых исследований, особенно если сроки проведения анализов ограничены. Финансовая сторона – это тоже зачастую определяющий момент для многих исследователей.

Таблица 3
Оценка точности определения показателей по величине коэффициента вариации, CV, %

Коэффициент вариации (Савич, 1971)	Варьирование, (Савич, 1971)	Балл
0 – 5	Незначительное	10
6 – 10		9
11 – 15	Небольшое	8
16 – 20		7
21 – 30	Среднее	6
31 – 40		5
41 – 45	Высокое	4
46 – 50		3
51 – 60		2
> 60	Очень высокое	1

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования, литературные и фондовые материалы свидетельствуют, что активность каталазы как показатель биологического состояния почвы отличается следующими характеристиками: высокая чувствительность показателя, хорошая воспроизводимость результатов, незначительное варьирование показателя (значения коэффициента вариации не превышает 10), простота, малая трудоёмкость и высокая скорость метода определения, широкая распространенность метода и т.д. (табл. 4).

Таблица 4
Оценка показателей ферментативной активности и содержания гумуса для диагностики различных воздействий

Показатель	Вид антропогенного воздействия	Чувствительность*	Сложность анализа**	Точность определения*	Средний балл по воздействию	Средний балл по методу
1	2	3	4	5	6	7
Каталаза	Сельскохозяйственное использование	2	10	10	7.3	8.6
	Загрязнение нефтью и нефтепродуктами	9	10	9	9.3	
	Загрязнение тяжелыми металлами	8	10	10	9.3	
	СВЧ-излучение	6	10	10	8.7	
	Ионизирующее излучение	6	10	10	8.7	
	Гидроморфизм	9	10	9	9.3	
	Загрязнение пестицидами	3	10	10	7.7	

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6	7
Инвертаза	Сельскохозяйственное использование	10	6	7	7.7	5.4
	Загрязнение нефтью и нефтепродуктами	3	6	5	4.7	
	Загрязнение тяжелыми металлами	4	6	5	5.0	
	СВЧ-излучение	1	6	5	4.0	
	Ионизирующее излучение	6	6	6	6.0	
	Гидроморфизм	7	6	6	6.3	
Дегидрогеназа	Загрязнение пестицидами	1	7	5	4.3	6.7
	Сельскохозяйственное использование	10	7	7	8.0	
	Загрязнение нефтью и нефтепродуктами	9	7	6	7.3	
	Загрязнение тяжелыми металлами	9	7	6	7.3	
	Ионизирующее излучение	9	7	6	7.3	
	СВЧ-излучение	1	7	7	5.0	
Гумус	Гидроморфизм	8	7	6	7.0	7.0
	Загрязнение пестицидами	1	7	6	4.7	
	Сельскохозяйственное использование	10	8	10	9.3	
	Загрязнение нефтью и нефтепродуктами	2	8	8	6.0	
	Загрязнение тяжелыми металлами	3	8	10	7.0	
	Ионизирующее излучение	1	8	10	6.3	
	Гидроморфизм	5	8	6	6.3	

* Прямая зависимость балла оценки от величины показателя; ** обратная зависимость балла оценки от величины показателя.

Активность каталазы показала очень хорошие результаты в качестве диагностического показателя состояния почв (см. табл. 4). Данный фермент чувствителен, и на воздействие большинства изучаемых факторов, кроме сельскохозяйственного использования и загрязнения пестицидами, он реагировал в сторону снижения активности.

Активность инвертазы в среднем набрала лишь 5.4 балла (см. табл. 4). Активность инвертазы оказалась малочувствительной к загрязнению почвы тяжелыми металлами, нефтью и нефтепродуктами и пестицидами. Большую чувствительность инвертаза продемонстрировала при оценке последствий воздействия ионизирующих загрязнений и гидроморфизма. Но и для данных видов воздействия общая оценка показателя достаточно низкая (см. табл. 4). Это связано со значительным варьированием показателя активности инвертазы (коэффициент вариации более 30), что делает необходимым соблюдать большую повторность. Также метод определения инвертазы достаточно трудоемок (10 разных операций) и требует большого количества лабораторной посуды и оборудования.

Активность дегидрогеназы отличается от инвертазной меньшим варьированием (значения коэффициента вариации в пределах 18 – 30). Этот показатель чувствителен и приемлем для диагностики последствий сельскохозяйственного использования, переувлажнения, загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами, тяжелыми металлами, воздействия ионизирующих излучений (см. табл. 4). Несмотря на высокую чувствительность, средний балл для дегидрогеназной активности ниже, чем балл для активности каталазы, ввиду большего варьирования и трудоемкости

определения. Метод определения активности дегидрогеназы достаточно сложен, требует затрат на реактивы и значительного количества посуды и оборудования.

Для сравнения применимости ферментативной активности в диагностике и мониторинге оценили показатель содержания гумуса (см. табл. 4). Показатель содержания гумуса имеет ряд преимуществ: варьирует незначительно, прост в применении, его использование не требует сложного оборудования и реактивов. Однако для оперативной диагностики он малопригоден в силу своей большой консервативности. Именно поэтому в наших экспериментах показана низкая чувствительность данного показателя для диагностики последствий большинства воздействий кроме длительного использования под пашню (см. табл. 4). Наши многолетние данные свидетельствуют о прямолинейной коррелятивной зависимости между активностью инвертазы и дегидрогеназы и содержанием гумуса в почвах, находящихся под длительным антропогенным прессом, и почвах, не испытывающих значительных воздействий. Показатель содержания гумуса получил такие же высокие баллы, как и активность инвертазы и дегидрогеназы при длительном сельскохозяйственном использовании.

Если рассматривать отдельно каждый вид воздействия, то наиболее информативными при оценке последствий влияния сельскохозяйственного использования на биологическую активность почв являются содержание гумуса, дегидрогеназа и инвертаза. Для диагностики загрязнения нефтью и нефтепродуктами, тяжёлыми металлами, ионизирующих излучений и гидроморфизма более пригодны активность каталазы и дегидрогеназы. Показатели ферментативной активности наименее пригодны для изучения СВЧ излучений и пестицидного загрязнения. Активность каталазы можно применять при изучении воздействия СВЧ излучения высокой мощности (Денисова и др., 2011).

Изменение активности ферментов при внесении в почву пестицидов требует дальнейшего изучения. Внесение малых доз не вызывало однозначного изменения в активности каталазы и дегидрогеназы. Активность инвертазы в еще меньшей степени пригодна для диагностики загрязнения почвы пестицидами. Значения этого показателя мало того, что не имели связи с дозами препаратов, но еще и сильно варьировали (Казеев и др., 2010).

Если оценивать применимость в целом методов ферментативной активности для диагностических целей, то наивысший балл и, следовательно, большую эффективность эти методы имеют при диагностике сельскохозяйственного использования, загрязнения тяжёлыми металлами, нефтью и нефтепродуктами, гидроморфизма и ионизирующих излучений.

ВЫВОДЫ

Показатели ферментативной активности целесообразно широко использовать в целях биологической диагностики и мониторинга почв. Изучаемые показатели в разной степени пригодны для диагностики деграционных процессов различного происхождения.

Применение ферментативной активности почв в качестве диагностического показателя наиболее эффективно при диагностике сельскохозяйственного исполь-

зования, загрязнения тяжёлыми металлами, нефтью и нефтепродуктами, гидроморфизма и воздействия ионизирующих излучений.

Для оценки последствий влияния сельскохозяйственного использования на биологическую активность почв наиболее информативными являются активность дегидрогеназы и инвертазы.

В целях диагностики последствий загрязнения нефтью и нефтепродуктами, тяжёлыми металлами, ионизирующих излучений и гидроморфизма более пригодны активность каталазы и дегидрогеназы.

Показатели ферментативной активности наименее пригодны для изучения СВЧ излучений и пестицидного загрязнения.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (проекты № 14.А18.21.1269, 14.А18.21.0187).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Галстян А. Ш. Унификация методов исследования активности ферментов почв // Почвоведение. 1978. № 2. С. 107 – 113.

Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван : Айастан, 1974. 275 с.

Даденко Е. В. Методические аспекты применения показателей ферментативной активности в биодиагностике и биомониторинге почв : автореф. ... канд. биол. наук. Ростов н/Д, 2004. 24 с.

Даденко Е. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Изменение ферментативной активности почвенных образцов при их хранении // Почвоведение. 2009. № 12. С. 1 – 7.

Деградация и охрана почв / под общ. ред. Г. В. Добровольского. М. : Изд-во МГУ, 2002. 654 с.

Денисова Т. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Влияние гамма-излучения на биологические свойства почвы (на примере чернозема обыкновенного) // Почвоведение. 2005. № 7. С. 877 – 881.

Денисова Т. В., Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Влияние электромагнитных полей на биологические свойства почв. Ростов н/Д : Ростиздат, 2011. 286 с.

Звягинцев Д. Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение. 1978. № 6. С. 48 – 54.

Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Биологическая диагностика и индикация почв : методология и методы исследований. Ростов н/Д : Изд-во Ростов. гос. ун-та, 2003. 350 с.

Казеев К. Ш., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Биология почв Юга России. Ростов н/Д : Изд-во «Центры валеологии вузов России», 2004 г. 350 с.

Казеев К. Ш., Даденко Е. В., Везденеева Л. С., Денисова Т. В., Колесников С. И., Вальков В. Ф. Биогеография и биодиагностика почв Юга России. Ростов н/Д : Ростиздат, 2008. 226 с.

Казеев К. Ш., Лосева Е. С., Боровикова Л. Г., Колесников С. И. Влияние загрязнения современными пестицидами на биологическую активность чернозема обыкновенного // Агрохимия. 2010. № 11. С. 39 – 44

Колесников С. И., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф., Азнаурьян Д. К., Жаркова М. Г. Биодиагностика экологического состояния почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Ростов н/Д : Ростиздат, 2007. 192 с.

ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Колесников С. И., Пономарева С. В., Казеев К. Ш., Вальков В. Ф. Экологические последствия загрязнения почв тяжелыми металлами : Ba, Mn, Sb, Sn, Sr, V, W. Ростов н/Д : Изд-во «Эверест», 2008. 200 с.

Никитин Б. А. Методика определения содержания гумуса в почве // *Агрохимия*. 1972. № 3. С. 123 – 125.

Савич В. И. Варьирование свойств почв во времени и пространстве // Докл. Тимирязевской с.-х. академии. 1971. Вып. 162. С. 111 – 115.

Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М. : Наука. 1990. 189 с.

Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв. М. : Наука, 1976. 180 с.

Biological Indicators of Soil Health / eds. C. Pankhurst, B. Doube, V. V. S. R. Gupta. Wallingford : CABI Publishing, 1997. 464 p.

Microbiological Methods For Assessing Soil Quality / eds. J. Bloem, D. W. Hopkins, A. Benedetti. Oxford ; Cambridge : CABI Publishing, 2006. 336 p.