

10. Моделирование развития искусственных лесных биогеоценозов / Л.С. Шугалей, М.Г. Семечкина, Г.И. Яшихин [и др.]. – Новосибирск: Наука, 1984. – 152 с.
11. Шугалей Л.С. Влияние лесных культур на свойства плантажированной почвы // Почвоведение. – 2002. – № 3. – С. 345–354.
12. Binkley D., Giardina C. Why do trees species affect soils? The warp and woof of tree-soil interactions // Biogeochemistry. – 1998. – № 42. – P. 89–106.
13. Linking litter calcium, earthworms, and soil properties: a common garden test with 14 temperate tree species / J. Oleksyn, J. Modrzynski, P. Mrozinski [et al.] // Ecology Letters 8. – 2005. – P. 811–818.
14. Szuwiecki A. Comparison of macrofauna of afforested field with that of forest soil // The process of forest soil macrofauna formation after afforestation of farmland. – Warsaw Agricultural University Press, 1983. – P. 116–122.



УДК 631.4

Р.В. Окунев, Л.М. Сунгатуллина, Б.Р. Григорьян

ВЛИЯНИЕ АРСЕНАТА (V) НАТРИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ АМИНОКИСЛОТ РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧВЫ

В лабораторном опыте установлено влияние арсената (V) натрия на количественный состав и качественное содержание свободных и связанных аминокислот растворенного органического вещества темно-серой лесной почвы. В зависимости от дозы внесения As(V) содержание свободных аминокислот изменялось от $53,0 \pm 7,5$ до $240,2 \pm 53,7$ мкг/кг, а связанных от $106,9 \pm 13,9$ до $527,5 \pm 93,4$ мкг/кг. Качественный состав аминокислот при мышьяковом загрязнении не изменялся.

Ключевые слова: почва, свободные аминокислоты, растворенное органическое вещество, мышьяк, аминокислоты почвы.

R.V. Okunev, L.M. Sungatullina, B.R. Grigoryan

THE INFLUENCE OF THE (V) SODIUM ARSENATE ON THE CONTENT OF THE FREE AND BOUND AMINO ACIDS OF THE SOIL DISSOLVED ORGANIC MATTER

In the laboratory experiment the influence of (V) sodium arsenate on the quantitative composition and qualitative content of free and bound amino acids of the dissolved organic matter in the dark-gray forest soil is established. Depending on the As(V) introduction dose, the free amino acid content varied from $53,0 \pm 7,5$ to $240,2 \pm 53,7$ microgram/kg, the bound amino acids content varied from $106,9 \pm 13,9$ to $527,5 \pm 93,4$ microgram/kg. The amino acid quality composition in the arsenic contamination didn't change.

Key words: soil, free amino acids, dissolved organic matter, arsenic, soil amino acids.

Введение. Влияние одного из самых токсичных элементов – мышьяка на свойства почв активно изучается во многих странах [1–3]. Известно, что элемент влияет на ферментативную активность почв, состав и количество почвенных микроорганизмов и т.д. [2–4]. Свободные и связанные аминокислоты растворенного органического вещества (РОВ) являются биохимически активными соединениями. Их количество, с одной стороны, зависит от ферментативного (протеолитического) разложения органического вещества почвы, а с другой – от переработки аминокислот в NH_4 микроорганизмами [5]. Согласно рабочей гипотезе, мышьяковое загрязнение может привести к изменению состава или содержания аминокислот РОВ. Изменение состава свободных аминокислот, в свою очередь, может оказать воздействие на азотное питание растений и микроорганизмов [6].

Цель работы. Установить влияние различных доз мышьяка на количественное содержание и качественный состав свободных и связанных аминокислот РОВ темно-серой лесной почвы. Мышь-як в почву вносился в виде водного раствора арсената (V) натрия, так как арсенаты являются одной из самых распространенных форм нахождения элемента в почвах [7].

Материалы и методы исследований. В качестве объекта исследования использовали верхний горизонт темно-серой лесной почвы на делювиальных суглинках. Образцы имели следующие характеристики: содержание органического углерода – 4,8 %; содержание валового азота – 0,42 %; pH – 6,0; сумма фракций размерностью <0,01 мм – 34 %; содержание мышьяка – 3,4 мг/кг.

Воздушно-сухие образцы почвы (20 г) насыщались водными растворами $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ различных концентраций так, чтобы содержание мышьяка в пробах составило 0, 5, 50, 200, 1200, 4000 мг/кг. Затем пробы доводились бидистиллированной стерильной водой до 60–70 % от полной влагоемкости и инкубировались 10 дней при постоянной влажности при 28°C [4]. После инкубационного периода для извлечения растворенного органического вещества брали навески почвы 2 г, приливали 20 мл бидистиллированной воды и экстрагировали на ротаторе в течение 30 минут. Затем суспензии фильтровали через бумажный складчатый фильтр и мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Для определения аминокислотного состава почвы навески 0,2 г гидролизовали 6н HCl в герметичных сосудах в течение 4 часов при 145°C по методу, описанному в работе [8].

В состав РОВ входят как связанные в полипептиды, так и свободные аминокислоты. Содержание свободных аминокислот РОВ определяли в водных вытяжках без стадии гидролиза. Суммарное содержание аминокислот РОВ (свободные+связанные) определяли в гидролизатах сухого остатка водной вытяжки. Для этого фильтрат водной вытяжки объемом 1 мл выпаривали под вакуумом при 60°C. К сухому остатку добавляли 500 мкл 6н HCl и гидролизовали вышеописанным способом. Содержание связанных аминокислот РОВ определяли по формуле: связанные аминокислоты = аминокислоты РОВ – свободные аминокислоты.

Содержание аминокислот в вытяжках и гидролизатах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с модификацией аминокислот фенилизотиоцианатом, как указано в работе [9].

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программы Statistica. Данные в тексте и на диаграммах представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=2$; $p<0,05$). Корреляционный анализ проводился по Спирмену. Значимость различий между вариантами определяли с помощью теста ANOVA при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Аминокислоты органического вещества почвы являются источником и резервом свободных аминокислот и связанных аминокислот РОВ [10]. В результате анализа гидролизата в изучаемой темно-серой лесной почве обнаружено 16 аминокислот, суммарное содержание которых составило $2,3 \pm 0,1$ г/кг. Значительная часть аминокислотного фонда представлена глицином ($33,6 \pm 1,2\%$), аланином и пролином (Ala+Pro $11,1 \pm 0,9\%$), аспарагиновой кислотой ($9,7 \pm 0,2\%$), серином ($8,2 \pm 0,4\%$) и глутаминовой кислотой ($6,3 \pm 0,1\%$). Следует учитывать, что при гидролизе данным способом (обработка 6н HCl в течение 4 часов при 145°C) часть аминокислот разрушается. Теряется около 40–47 % серина, 14–15 % изолейцина и лейцина, 25 % аспарагина и треонина, 20 % тирозина. Триптофан при таком способе гидролиза разрушается полностью [8].

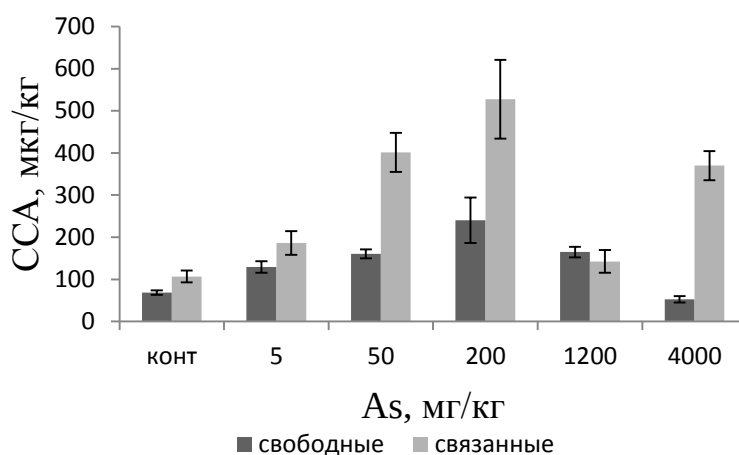
Доля азота аминокислот в азотном фонде почвы составила $54 \pm 0,7\%$. Для сравнения, доля азота гидролизующихся аминокислот в большинстве почв варьирует от 20 до 54 % [10–13]. Наши результаты совпадают с работой [13]. Обработка почвы 6н HCl не разрушает белковые структуры полностью, и в почвенном гумусе всегда остается негидролизующийся остаток. Кроме того, часть белковых образований (около 10%) и аминокислот находится в кремниевых структурах и высвобождается лишь после обработки HF [13].

В данном опыте инкубация почвы проводилась в наиболее благоприятных для развития микроорганизмов условиях. Микробиологическая активность в таких почвах обычно намного выше, чем в полевых условиях. Так, в почвах, загрязненных мышьяком, с одной стороны, идет стимуляция жизнедеятельности сообщества микробов, а с другой стороны – влияние одного из самых токсичных элементов. Так как содержание свободных и связанных аминокислот во многом зависит от деятельности микроорганизмов, в данных условиях под влиянием мышьяка их содержание заметно изменяется в зависимости от дозы (рис., табл.).

**Содержание аминокислот и разность с контрольным значением (n=2, p<0,05)
при различных дозах As(V)**

Доза As(V), мг/кг	Суммарное содержание аминокислот	Стандартное отклонение	Разность с контролем
Свободные аминокислоты РОВ			
0 (контроль)	68,6	5,1	-
5	129,4	13,3	-62,2*
50	160,6	10,9	-93,0*
200	240,2	53,7	-172,6*
1200	164,9	12,5	-97,3*
4000	53,0	7,5	14,5
НСР	-	-	58,0
Связанные аминокислоты РОВ			
0 (контроль)	106,9	13,9	-
5	186,7	28,1	-79,7
50	401,4	46,2	-294,4*
200	527,5	93,4	-420,5*
1200	142,5	26,9	-35,5
4000	369,9	34,4	-263,0*
НСР	-	-	117,1

Примечание. НСР – наименьшая существенная разница; * – статистически значимые различия.



*Суммарное содержание свободных и связанных аминокислот (ССА) РОВ
при различных дозах арсената As(V)*

Сумма свободных аминокислот (ССА) в контрольной пробе составила 68,6±5,1 мг/кг. При 5 мг/кг As(V) значение ССА возрастает до 129,4±13,3 мг/кг. Максимальная концентрация аминокислот составляет 240,2±53,7 мг/кг при 200 мг/кг As(V). При 1200 и 4000 мг/кг As(V) содержание аминокислот значительно снижается по сравнению с максимумом и составляет 164,9±12,5 и 53,0±7,5 мг/кг соответственно, причем при 4000 мг/кг ССА не отличается от контрольного образца.

Содержание связанных аминокислот РОВ изменяется в диапазоне от 106,9±13,9 до 527,5±93,4 мг/кг. Их содержание, так же как и свободных, увеличивается при дозах As(V) 50, 200 мг/кг. Максимальное значение 527,5±107,5 мг/кг достигается при дозе мышьяка 200 мг/кг. При дозе арсената 1200 мг/кг содержание связанных аминокислот РОВ совпадает с контрольным значением, а при 4000 мг/кг As(V) снова увеличивается и составляет 369,9±43,1 мг/кг.

Качественный состав аминокислот во всех испытываемых вариантах оставался неизменным. Всего было обнаружено 16 свободных аминокислот.

Качественный состав аминокислот не зависел от воздействия различных концентраций мышьяка на жизнедеятельность почвенных микроорганизмов, а определялся только генезисом органического вещества данной почвы.

Вне зависимости от дозы As(V), в образцах профиль свободных и связанных аминокислот РОВ, как и в контрольном образце, главным образом представлен глицином и серином. Для свободных аминокислот их содержание находилось в диапазоне от 26,0 до 31,6 % и от 20,8 до 24,3 % соответственно от ССА, для связанных аминокислот варьировало от 34,9 до 42,1 % и от 7,8 до 29,8 % соответственно. Содержание свободных и связанных аминокислот не имеет достоверной линейной корреляционной связи с дозами арсената ($r=0,06$ и $0,41$ соответственно при $n=12$).

Выводы. Таким образом, инкубирование почвы с различными дозами As(V) в наиболее благоприятных для микроорганизмов условиях не привело к изменению качественного состава свободных и связанных аминокислот РОВ почвы. В целом загрязнение почвы арсенатом привело к накоплению свободных и связанных аминокислот РОВ. Их содержание нелинейно изменялось в зависимости от дозы As(V).

Литература

1. Ghosh A.K., Bhattacharyya P., Pal R. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India // *Environ. Int.* – 2004. – V. 30, № 4. – P. 491–499.
2. Lorenz N., Hintemann T., Kramarewa T. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure // *Soil Biol. Biochem.* – 2006. – V. 38. – P. 1430–1437.
3. Das S., Jean J.-S., Kar S. Effect of arsenic contamination on bacterial and fungal biomass and enzyme activities in tropical arsenic-contaminated soils // *Biol. Fertil. Soils.* – 2013. – V. 49. – P. 757–765.
4. Prasad P., George J., Masto R.E. Evaluation of microbial biomass and activity in different soils exposed to increasing level of arsenic pollution: a laboratory study // *Soil Sediment. Contam.* – 2013. – V. 22. – P. 483–497.
5. Полуэктов Р.А. Описание процесса аммонификации в рамках модели трансформации углерода и азота в почве // *Проблемы агрохимии и экологии* – 2011. – № 4. – С. 25–28.
6. Jamtgard S. The occurrence of amino acids in agricultural soil and their uptake by plants: doctoral thesis – Umea, 2010. – 52 p.
7. Moreno-Jimenez E., Esteban E., Penalosa J.M. The fate of arsenic in soil-plant systems // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2012. – V. 215. – P. 1–37.
8. Adebisi A.P., Jin D.-H., Ogawa T. Acid hydrolysis of protein in microcapillary tube for recovery of tryptophan // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2005. – V. 69. – P. 255–257.
9. Okunev R.V., Grigoryan B.R., Sharipova A.I. Determination of free proteinogenic amino acids in soil solutions by HPLC with phenyl isothiocyanate derivatization // *J. of Siberian Federal University. Chemistry.* – 2014. – V.7, № 4. – P. 480–486.
10. Friedel J.K., Dcheller E. Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass // *Soil Biol. Biochem.* – 2002. – V.34. – P. 315–325.
11. Senwo Z.N., Tabatabai M.A. Amino acid composition of soil organic matter // *Biol. Fertil. Soils.* – 1998. – V. 26. – P. 235–242.
12. Мошкина Е.В. Азотные соединения в почвах Северо-Запада России и динамика их под влиянием антропогенного воздействия: на примере Карелии: дис. ... канд. с.-х. наук: 03.00.27. – Петрозаводск, 2009. – 173 с.
13. Schnitzer M., Hindle D.A. Effects of different methods of acid hydrolysis on the nitrogen distribution in two soils // *Plant and Soil.* – 1981. – V. 60. – P. 237–243.